Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►**B** **REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE**

del 30 maggio 2008

che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 142 del 31.5.2008, pag. 1)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Regolamento (CE) n. 761/2009 della Commissione del 23 luglio 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Regolamento (UE) n. 1152/2010 della Commissione dell'8 dicembre 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Regolamento (UE) n. 640/2012 della Commissione del 6 luglio 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Regolamento (UE) n. 260/2014 della Commissione del 24 gennaio 2014	L 81	1	19.3.2014

Rettificato da:

►**C1** Rettifica, GU L 11 del 16.1.2014, pag. 12 (440/2008)

▼B

REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE

del 30 maggio 2008

che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE ([1]) e, in particolare, l'articolo 13, paragrafo 3, del medesimo,

considerando quanto segue:

(1) A norma del regolamento (CE) n. 1907/2006, ai fini dello svolgimento di test sulle sostanze occorre adottare metodi di prova a livello comunitario qualora tali test siano finalizzati ad acquisire informazioni sulle proprietà intrinseche delle sostanze.

(2) La direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose ([2]) istituiva, all'allegato V, i metodi per determinare le proprietà fisico-chimiche, la tossicità e l'ecotossicità delle sostanze e dei preparati. L'allegato V della direttiva 67/548/CEE è stato soppresso dalla direttiva 2006/121/CE del Parlamento europeo e del Consiglio a decorrere dal 1º giugno 2008.

(3) I metodi di prova contenuti nell'allegato V della direttiva 67/548/CEE devono essere integrati nel presente regolamento.

(4) Questo regolamento non esclude l'uso di altri metodi di prova, a condizione che il loro uso sia conforme all'articolo 13, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 1907/2006.

([1]) GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1, rettifica nella GU L 136 del 29.5.2007, pag. 3.

([2]) GU 196 del 16.8.1967, pag. 1. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2006/121/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, rettifica nella GU L 136 del 29.5.2007, pag. 281, (GU L 396 del 30.12.2006, pag. 850) [*da aggiornare con i riferimenti corretti al momento della pubblicazione del 30º adeguamento al progresso tecnico*].

▼B

(5) Nella concezione dei metodi di prova occorre tener conto dei principi finalizzati a rimpiazzare, ridurre e raffinare le tecniche per l'uso degli animali nelle procedure, in particolare quando diventano disponibili opportuni metodi convalidati per sostituire, ridurre o raffinare la sperimentazione sugli animali.

(6) Le disposizioni di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato istituito dall'articolo 133 del regolamento (CE) n. 1907/2006,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

I metodi di prova applicabili ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006 sono definiti nell'allegato al presente regolamento.

Articolo 2

La Commissione riesamina, ove opportuno, i metodi di prova contenuti nel presente regolamento al fine di sostituire, ridurre o raffinare i test sugli animali vertebrati.

Articolo 3

I riferimenti all'allegato V della direttiva 67/548/CEE si intendono fatti al presente regolamento.

Articolo 4

Il presente regolamento entra in vigore il giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 1º giugno 2008.

▼B

ALLEGATO

PARTE A: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE

INDICE

A.1. TEMPERATURA DI FUSIONE/CONGELAMENTO

A.2. TEMPERATURA DI EBOLLIZIONE

A.3. DENSITÀ RELATIVA

A.4. TENSIONE DI VAPORE

A.5. TENSIONE SUPERFICIALE

A.6. IDROSOLUBILITÀ

A.8. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

A.9. PUNTO D'INFIAMMABILITÀ

A.10. INFIAMMABILITÀ (SOLIDI)

A.ll INFIAMMABILITÀ (GAS)

A.12 INFIAMMABILITÀ (CONTATTO CON L'ACQUA)

A.13 PROPRIETÀ PIROFORICHE DI SOLIDI E LIQUIDI

A.14 PROPRIETÀ ESPLOSIVE

A.15 TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE (LIQUIDI E GAS)

A.16 TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE RELATIVA DEI SOLIDI

A.17 PROPRIETÀ OSSIDANTI (SOLIDI)

A.18. PESO MOLECOLARE MEDIO NUMERICO E DISTRIBUZIONE DEL PESO MOLECOLARE DI POLIMERI

A.19. CONTENUTO DI FRAZIONI A BASSO PESO MOLECOLARE IN POLIMERI

A.20. COMPORTAMENTO DI SOLUZIONE/ESTRAZIONE DEI POLIMERI IN ACQUA

A.21. PROPRIETÀ COMBURENTI (LIQUIDI)

A.22. DIAMETRO GEOMETRICO MEDIO DELLE FIBRE PONDERATO RISPETTO ALLA LUNGHEZZA

▼M4

A.23. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (1-OTTANOLO/ACQUA): METODO DELL'AGITAZIONE LENTA

▼B

A.1. TEMPERATURA DI FUSIONE/CONGELAMENTO

1. METODO

La maggior parte dei metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1). I principi fondamentali sono riportati nei riferimenti (2) e (3).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi e le apparecchiature qui illustrati si applicano alla determinazione della temperatura di fusione di sostanze senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La scelta del metodo più idoneo dipende dalla natura delle sostanze in esame. Di conseguenza, il fattore limitante sarà inerente ai fatto che la sostanza sia facilmente, difficilmente o per nulla polverizzabile.

Per alcune sostanze, la determinazione della temperatura di congelamento o di solidificazione risulta più appropriata e pertanto in questo metodo sono state incluse anche le norme per queste determinazioni.

Dove, a motivo delle particolari proprietà della sostanza, non sia possibile misurare in modo adatto alcuni dei parametri suddetti, può essere appropriato un punto di scorrimento.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

La temperatura di fusione è definita come la temperatura alla quale si verifica la transizione di fase dallo stato solido allo stato liquido a pressione atmosferica, e questa temperatura nel caso ideale corrisponde alla temperatura di congelamento.

Poiché per molte sostanze la transizione di fase si verifica in un intervallo di temperatura ampio, questo viene spesso descritto come intervallo di fusione.

Conversione delle unità (da K a ºC):

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsius, gradi Celsius (ºC)

T: temperatura termodinamica, kelvin (K)

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono principalmente venire impiegate per controllare periodicamente i risultati ottenuti col metodo e per permettere confronti con i risultati ottenuti con altri metodi.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nel riferimento bibliografico (4).

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Si determina la temperatura (o l'intervallo di temperatura) della transizione di fase dallo stato solido allo stato liquido o dallo stato liquido allo stato solido. In pratica si determina la temperatura di fusione/congelamento incipiente e di fusione/congelamento finale curante il riscaldamento/raffreddamento di un campione della sostanza in esame a pressione atmosferica. Sona descritti 5 metodi, e precisamente il metodo del capillare, il metodo degli elementi riscaldanti, la determinazione del punto di congelamento, i metodi di analisi termica e la determinazione del punto di scorrimento (come è stata sviluppata per gli olii di origine petrolifera).

In alcuni casi, può essere conveniente misurare la temperatura di congelamento invece della temperatura di fusione.

1.4.1. **Metodo del capillare**

1.4.1.1. *Apparecchi per la determinazione del punto di fusione tramite bagno liquido*

Una piccola quantità della sostanza finemente macinata viene introdotta in un tubo capillare e compattata fortemente. Il tubo viene riscaldato, insieme ad un termometro, e l'aumento di temperatura viene regolato in modo che sia inferiore a circa 1 K/min durante la fusione propriamente detta. Si determinano quindi le temperature iniziale e finale di fusione.

1.4.1.2. *Apparecchi per la determinazione del punto di fusione a blocco metallico*

Si procede come indicato al punto 1.4.1.1, salvo il fatto che i tubo capillare ed il termometro sono collocati in un blocco di metallo riscaldante, attraverso alcuni fori del quale è possibile la loro osservazione.

1.4.1.3. *Determinazione tramite fotocellula*

Il campione contenuto nel tubo capillare viene riscaldato automaticamente in un cilindro metallico. Attraverso un foro praticato nel cilindro un raggio luminoso viene convogliato sulla sostanza e raggiunge poi una fotocellula accuratamente tarata. Per la maggior parte delle sostanze le proprietà ottiche si modificano durante la fusione, passando dall'opacità alla trasparenza. L'intensità della luce che raggiunge la fotocellula aumenta fino ad inviare un segnale di arresto all'indicatore numerico di un termometro a resistenza di platino collocato nella camera di riscaldamento. Questo metodo non è adatto per alcune sostanze fortemente colorate.

1.4.2. **Elementi riscaldanti**

1.4.2.1. *Banco riscaldante di Kofler*

Il banco riscaldante di Kofler fa uso di due corpi metallici di diversa conducibilità termica, riscaldati elettricamente; la sbarra è progettata in modo tale che per tutta la sua lunghezza il gradiente di temperatura è virtualmente costante. La temperatura dell'elemento riscaldante può variare da 283 K a 573 K; essa viene letta su un apposito strumento costituito da un cursore provvisto di indice e di linguetta specificamente realizzati per ogni banco. Per determinare una temperatura di fusione, la sostanza viene distribuita in uno strato sottile direttamente sulla superficie dell'elemento riscaldante. In pochi secondi appare una linea di separazione netta tra la fase solida e quella liquida. La temperatura corrispondente a questa linea di separazione viene letta facendovi coincidere l'indice dello strumento.

▼B

1.4.2.2. *Microscopio di fusione*

Numerosi sono gli elementi riscaldanti forniti di microscopio utilizzati per la determinazione del punto di fusione con quantità molto piccole di materiale. Nella maggioranza di questi strumenti, la temperatura viene determinata mediante una termocoppia sensibile, ma talvolta si usano anche termometri a mercurio. La versione tipica di un apparecchio per la determinazione del punto di fusione ad elemento riscaldante con microscopio è dotata di una camera di riscaldamento contenerne una piastra metallica sopra la quale si pone il campione, distribuito su un vetrino. Al centro della piastra metallica si trova un foro che permette il passaggio della luce proveniente dallo specchio di illuminazione del microscopio. Durante la misura la camera viene chiusa da una piastra di vetro in modo da escludere l'aria dalla zona del campione.

Il riscaldamento del campione è regolato da un reostato. Per misure di grande precisione e nel caso di sostanze otticamente anisotrope, si può utilizzare luce polarizzata.

1.4.2.3. *Metodo del menisco*

Questo metodo è specifico per le poliammidi.

Si determina visivamente la temperatura alla quale si verifica lo spostamento di un menisco di olio siliconico compreso tra un elemento riscaldante e un copri-oggetti sostenuto dal campione di poliammide in esame.

1.4.3 **Metodo per determinare la temperatura di congelamento**

Il campione viene posto in una provetta speciale e inserito in un apparecchio per la determinazione della temperatura di congelamento. Il campione viene agitato con delicatezza e continuità durante il raffreddamentoe la temperatura viene misurata ad intervalli adatti. Non appena la temperatura si mantiene costante per qualche lettura, si registra tale temperatura (corretta per l'errore termometrico) come temperatura di congelamento.

Si deve evitare un sovraraffreddamento mantenendo l'equilibrio tra le fasi solida e liquida.

1.4.4. **Analisi termica**

1.4.4.1. *Analisi termica differenziale (ATD)*

Questa tecnica registra la differenza di temperatura tra la sostanza e un materiale di riferimento in funzione della temperatura stessa mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di temperatura. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da una deviazione endotermica (fusione) o esotermica (congelamento) dalla linea di base del tracciato della temperatura.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetria differenziale a scansione (CDS)*

Questa tecnica registra la differenza tra l'energia introdotta in una sostanza e quella introdotta in un materiale di riferimento, in funzione della temperatura, mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di temperatura. Questa energia è l'energia necessaria per mantenere nulla la differenza di temperatura tra la sostanza e il materiale di riferimento. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da una deviazione endotermica (fusione) o esotermica (congelamento) dalla linea di base del tracciato del flusso termico.

1.4.5. **Punto di scorrimento**

Questo metodo è stato sviluppato per l'uso con gli olii di origine petrolifera ed è adatto per l'uso con sostanze oleose aventi una bassa temperatura di fusione.

Dopo un riscaldamento preliminare, il campione viene raffreddato ad una velocità specifica mentre, ad intervalli di 3 K, se ne esaminano le caratteristiche di scorrimento. La temperatura più bassa alla quale si osserva un movimento della sostanza viene registrata come punto di scorrimento.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

L'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi impiegati per la determinazione della temperatura di fusione/intervallo di fusione sono indicate nella seguente tabella.

TABELLA: APPLICABILITÀ DEI METODI

A. **Metodi con impiego di capillare**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata [1]	Norme esistenti
Apparecchi per il punto di fusione a bagno liquido	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 a 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Apparecchi per il punto di fusione con blocco metallico	Sì	Soltanto per alcune	Da 293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Determinazione con fotocellula	Sì	Svariate, con uso di accessori	Da 253 a 573 K	± 0,5 K	

[1] In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

▼B

B. **Metodi con impiego di elementi riscaldanti e metodi di congelamento**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Banco riscaldante di Kofler	Sì	No	Da 283 a > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Microscopio di fusione	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 a > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metodo del menisco	No	Specifico per le poliammidi	Da 293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metodo del punto di congelamento	Sì	Sì	Da 223 a 573 K	± 0,5 K	per esempio BS 4695

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

C. **Analisi termica**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostarne difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Analisi termica differenziale	Sì	Sì	Da 173 a 1 273 K	Fino a 600 K ± 0,5 K Fino a 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776
Calorimetria differenziate a scansione	Sì	Sì	Da 173 a 1 273 K	Fino a 600 K ± 0,5 K Fino a 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza

D. **Punto di scorrimento**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Punto di scorrimento	Per olii di origine petrolifera e sostanze oleose	Per olii di origine petrolifera e sostanze oleose	Da 223 a 323 K	± 0,3 K	ASTM D 9766

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

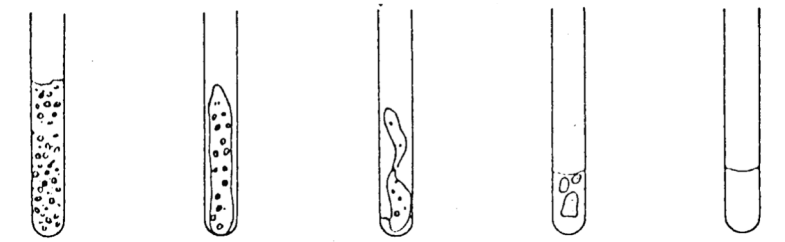
Le procedure relative a quasi tutti i metodi di determinazione sono state descritte in varie norme internazionali nazionali (vedi appendice 1).

1.6.1. **Metodi con tubo capillare**

Quando vengono sottoposte ad un lento aumento di temperatura, sostanze finemente polverizzate mostrano solitamente gli stadi di fusione mostrati in figura 1.

▼B

figura 1.



Stadio A (inizio della fusione): minuscole goccioline aderiscono uniformemente alla parete interna del capillare;

Stadio B in seguito alla contrazione del fuso, va evidenziandosi uno spazio libero tra il campione e la parete interna;

Stadio C dopo essersi contratto, il campione inizia a scivolare in basso ed a liquefarsi;

Stadio D si ha la formazione di un menisco completo alla superficie, ma una quantità apprezzabile del campione rimane solida;

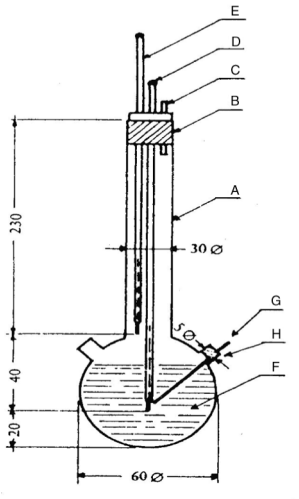
Stadio E (stadio finale della fusione): non restano più particelle solide.

Durante la determinazione della temperatura di fusione viene registrata la temperatura all'inizio delia fusione e nello stadio finale.

1.6.1.1. *Apparecchi per il punto di fusione a bagno liquido*

La figura 2 presenta un tipo di apparecchio normalizzato, realizzato in vetro, per la temperatura di fusione (JIS K0064): tutte le quote sono date in mm.

Figura 2



A: Recipiente di misura
B: Tappo di sughero
C: Sfogo
D: Termometro
E: Termometro ausiliario
F: Bagno liquido
G: Tubo capillare in vetro: lunghezza da 80 a 10 mm ; diametro interno 1 ± 0,2 mm ; spessore da 0,2 a 0,3 mm
H: Tubo laterale

▼B

Bagno liquido:

Si deve scegliere un liquido adatto. La scelta del liquido dipende dalla temperatura di fusione da determinare, per esempio paraffina liquida per temperature di fusione non superiori a 473 K, olio di silicone per temperature di fusione non maggiori di 573 K.

Per temperature di fusione superiori a 523 K, si può usare una miscela costituita da 3 parti di acido solforico e 2 parti di solfato di potassio (rapporto in peso). Se si usa una miscela di questo tipo occorre prendere opportune precauzioni.

Termometro:

Vanno impiegati soltanto termometri che soddisfano le prescrizioni delle norme ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001, o di norme equivalenti.

ASTM E 1671, DIN 12770, JIS K 8001.

Modalità operative:

La sostanza secca va polverizzata finemente in un mortaio e posta in un tubo capillare, chiuso per fusione ad una estremità, in modo che, dopo assestamento nella maniera più compatta possibile, l'altezza del riempimento sia di 3 mm circa. Per ottenere un assestamento uniforme del campione, il tubo capillare deve essere lasciato cadere attraverso una canna di vetro su un vetro da orologio da un'altezza di circa 700 mm.

Il capillare riempito viene posto nel bagno in modo tale che la parte centrale del bulbo del termometro a mercurio sia in contatto con il tubo capillare nella zona dove è collocato il campione. Il tubo capillare viene di solito introdotto nell'apparecchio a temperatura inferiore di circa 10 K a quella della temperatura di fusione.

Il bagno liquido viene riscaldato in modo che l'aumento di temperatura corrisponda a circa 3 K/min. Il liquido va mantenuto sotto agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura prevista di fusione, la velocità di incremento della temperatura va regolata ad un massimo di 1 K/min.

Calcolo:

La temperatura fusione si calcola con la formula seguente:

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

dove:

T = temperatura di fusione corretta, in K,

T_D = temperatura letta sul termometro D, in K,

T_E = temperatura letta sul termometro E, in K,

n = numero di graduazioni della colonnina di mercurio sul termometro D sulla parte di stelo emergente.

1.6.1.2. *Apparecchi per la temperatura di fusione con blocco metallico*

Apparecchiatura:

La strumentazione consiste in:

— un blocco cilindrico di metallo, la cui parte superiore è cava e forma una camera (vedi figura 3);

— un tappo metallico provvisto di due o più fori per permettere l'inserimento dei tubi capillari nel blocco metallico;

▼B

— un sistema di riscaldamento per il blocco metallico realizzato, per esempio, tramite una resistenza elettrica incorporata nel blocco;

— un reostato per la regolazione della potenza applicata, se si fa uso del riscaldamento elettrico;

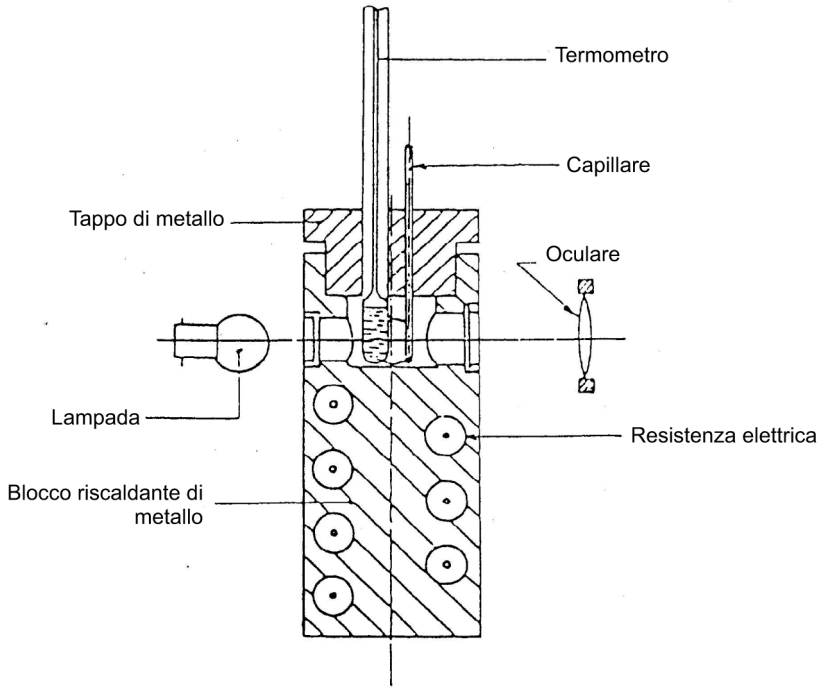
— quattro finestre di vetro resistente al calore sulle pareti laterali della camera, disposte diametralmente ad angolo retto l'una rispetto all'altra. Di fronte ad una di esse è montato un oculare per l'osservazione del capillare. Le altre tre finestre vengono usate per illuminare l'interno per mezzo di lampade;

— un capillare di vetro resistente al calore chiuso ad una estremità (vedi punto 1.6.1.1).

Termometro:

Vedi norme citate al punto 1.6.1.1. Possono utilizzarsi anche strumenti di misura termoelettrici di analoga accuratezza.

Figura 3



1.6.1.3. *Determinazione tramite fotocellula*

Apparecchiatura e modalità operative:

La strumentazione consiste in una camera metallica con un sistema automatico di riscaldamento. Si riempiono tre capillari secondo le indicazioni del punto 1.6.1.1 e si pongono nella camera.

▼B

Per la taratura dell'apparecchio sono disponibili diverse velocità di incremento lineare della temperatura e l'aumento di temperatura opportuno viene regolato elettricamente su una velocità costante e lineare preselezionata. La temperatura effettiva nel forno e la temperatura della sostanza nei tubi capillari sono indicare da registratori.

1.6.2. **Elementi riscaldanti**

1.6.2.1. *Banco riscaldante di Kofler*

Vedi appendice.

1.6.2.2. *Microscopio di fusione*

Vedi appendice.

1.6.2.3. *Metodo del menisco (per poliammidi)*

Vedi appendice.

La velocità di riscaldamento nella zona di passaggio attraverso la temperatura di fusione deve essere inferiore a 1 K/min.

1.6.3. **Metodi per la determinazione della temperatura di congelamento**

Vedi appendice.

1.6.4. **Analisi termica**

1.6.4.1. *Analisi termica differenziale*

Vedi appendice.

1.6.4.2. *Calorimetria differenziale a scansione*

Vedi appendice.

1.6.5. **Determinazione del punto di scorrimento**

Vedi appendice.

2. **DATI**

In alcuni casi si rende necessaria una correzione della lettura termometrica.

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo utilizzato;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze) ed eventuale stadio preliminare di purificazione;

— stima dell'accuratezza.

Come temperatura di fusione viene riportata la media di almeno due misure che cadano nel campo di accuratezza stimata (vedi tabelle).

▼B

Se la differenza tra la temperatura all'inizio e allo stadio finale della fusione ricade nei limiti di accuratezza del metodo, si prende come punto di fusione la temperatura dello stadio finale della fusione; altrimenti vengono riportate ambedue le temperature.

Se la sostanza si decompone o sublima prima del raggiungimento della temperatura di fusione, si riporterà la temperatura alla quale si osserva l'effetto.

Devono essere riportate tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials, from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol, 48, 505-515.

▼B

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono consultare ad esempio le seguenti norme:

1. **Metodi basati sull'impiego di capillari**

1.1. Apparecchi per la determinazione del punto di fusione a bagno liquido

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Apparecchi per la determinazione della temperatura di fusione a blocco di metallo

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyarnides — determination of «melting point»

2. **Apparecchi ed elementi riscaldanti**

2.1. Banco riscaldante di Kofler

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

2.2. Microscopio di fusione

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Metodo del menisco (poliammidi)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyarnides — determination of «melting point»

▼B

ANSI/ASTM D2133-66	Standard specification for acetal resin injection; moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. **Metodi per la determinazione della temperatura di congelamento**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for determination of melting point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristalisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Analisi termica**

4.1. Analisi termica differenziale

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetria differenziale a scansione

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Determinazione del punto di scorrimento**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monstememing en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

A.2. TEMPERATURA DI EBOLLIZIONE

1. METODO

La maggior parte dei metodi descritti sono basati sulle linee direttrici OCSE (1). I principi fondamentali sono riportati nei riferimenti (2) e (3).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi e le apparecchiature qui illustrati possono essere applicati a sostanze liquide e a bassa temperatura di fusione, purché queste non siano soggette a reazioni chimiche al di sotto della temperatura di ebollizione (per esempio: autoossidazione, trasposizione, degradazione, ecc.). I metodi possono essere applicati a sostanze liquide sia pure che impure.

Si dà particolare risalto ai metodi che utilizzano la determinazione tramite fotocellula e l'analisi termica perché questi metodi permettono la determinazione sia della temperatura di fusione che della temperatura di ebollizione. Inoltre, le misure possono essere eseguite in automatico.

Il «metodo dinamico» ha il vantaggio di poter essere applicato anche alla determinazione della tensione di vapore e di non richiedere la correzione della temperatura di ebollizione per riferirla alla pressione normale (101,325 kPa) dal momento che la pressione normale può essere regolata durante la misura mediante un manostato.

Osservazioni:

L'influenza delle impurezze sulla determinazione della temperatura di ebollizione dipende in notevole misura dalla natura delle impurezze. Quando il campione contiene impurezze volatili che possono alterare i risultati, la sostanza può venire purificata.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

La temperatura di ebollizione normale è definita come la temperatura alla quale la tensione di vapore di un liquido è di 101,325 kPa.

Se la temperatura di ebollizione non viene misurata alla pressione atmosferica normale, la dipendenza della tensione di vapore dalla temperatura può essere descritta mediante l'equazione di Clausius-Clapeyron:

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

dove:

p = tensione di vapore della sostanza in Pascal,

ΔH_v = calore di evaporazione in J mol^{-1},

R = costante universale dei gas = 8,314 J mol^{-1} K^{-1},

T = temperatura termodinamica in K.

La temperatura di ebollizione è riferita alla pressione ambiente al momento della misura.

▼B

Fattori di conversione

Pressione (unità: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(«bar» è ancora ammissibile, ma non raccomandato).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(le unità «mm Hg» e «Torr» non sono permesse).

1 atm = atmosfera standard = 101 325 Pa

(l'unità «atm» non è permessa).

Temperatura (unità: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsius, gradi Celsius (ºC)

T: temperatura termodinamica, Kelvin (K)

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento in tutti i casi in cui si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente l'accuratezza del metodo e per permettere un confronto coi risultati ottenuti con altri metodi.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nei metodi riportati in appendice.

1.4. PRINCIPIO DEI METODI

Cinque metodi per la determinazione della temperatura di ebollizione (intervallo di ebollizione) sono basati sulla misura della temperatura di ebollizione, altri due sono basati sull'analisi termica.

1.4.1. **Determinazione tramite ebulliometro**

Gli ebulliometri sono stati originariamente concepiti per la determinazione del peso molecolare tramite l'innalzamento della temperatura di ebollizione, ma si prestano anche per accurate misure della temperatura di ebollizione. Una apparecchiatura molto semplice è descritta nella norma ASTM D 1120-72 (vedi appendice). Con questo strumento il liquido viene riscaldato fino all'ebollizione in condizioni di equilibrio a pressione atmosferica.

1.4.2. **Metodo dinamico**

Questo metodo implica la misura della temperatura di ricondensazione del vapore mediante un appropriato termometro nella zona di riflusso durante l'ebollizione. Questo metodo permette di variare la pressione.

1.4.3. **Metodo della distillazione per la temperatura di ebollizione**

Il metodo si basa sulla distillazione del liquido e sulla misura della temperatura di ricondensazione del vapore con determinazione della quantità di distillato.

▼B

1.4.4. **Metodo di Siwoloboff**

Il campione viene riscaldato in una provetta immersa a sua volta nel liquido di un bagno riscaldante. Nella provetta contenente il campione viene introdotto un capillare, chiuso per fusione ad un estremo e contenente una bollicina d'aria nella parte inferiore.

1.4.5. **Determinazione tramite fotocellula**

Si impiega il metodo Siwoloboff, applicando tuttavia la misura fotoelettrica della fase di emissione delle bollicine.

1.4.6. **Analisi termica differenziale**

Questa tecnica registra la differenza di temperatura tra la sostanza e un materiale di riferimento, in funzione della temperatura, mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di variazione della temperatura. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da un allontanamento endotermico (ebollizione) dalla linea di base nella registrazione della temperatura.

1.4.7. **Calorimetria differenziale a scansione**

Questa tecnica registra la differenza di energia introdotta in una sostanza e in un materiale di riferimento in funzione della temperatura mentre la sostanza e il materiale di riferimento vengono sottoposti allo stesso programma controllato di variazione della temperatura. Questa energia è l'energia necessaria per mantenere a zero la differenza di temperatura tra la sostanza e il materiale di riferimento. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da un allontanamento endotermico (ebollizione) dalla linea di base della registrazione del flusso di calore.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La tabella 1 riporta l'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi utilizzati per la determinazione della temperatura di ebollizione/-intervallo di ebollizione.

Tabella 1

Confronto dei metodi

Metodo di misura	Accuratezza stimata	Norme esistenti
Ebulliometro	± 1,4 K (fino a 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (fino a 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Metodo dinamico	± 0,5 K (fino a 600 K) (2)	
Processo di distillazione (intervallo di ebollizione)	± 0,5 k (fino a 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Metodo di Siwoloboff	± 2 K (fino a 600 K) (2)	
Rivelazione mediante fotocellula	± 0,3 K (a 373 K) (2)	
Analisi termica differenziale	± 0,5 K (fino a 600 K) ± 2,0 K (fino a 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetria differenziale a scansione	± 0,5 K (fino a 600 K) ± 2,0 K (fino a 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Questo livello di accuratezza è valido soltanto nel caso di una strumentazione semplice, come ad esempio quella descritta nella norma ASTM D 1120-72; esso può essere migliorato con ebulliometri più perfezionati.
(2) Valida solo per sostanze pure. L'uso in altre circostanze deve essere giustificato.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

I procedimenti relativi ad alcuni dei metodi citati sono descritti in varie norme internazionali e nazionali (vedi appendice).

1.6.1. **Ebulliometro**

Vedi appendice.

1.6.2. **Metodo dinamico**

Vedi metodo A.4. per la determinazione della tensione di vapore.

Si assume come temperatura di ebollizione quella misurata in corrispondenza di una pressione di 101,325 kPa.

1.6.3. **Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)**

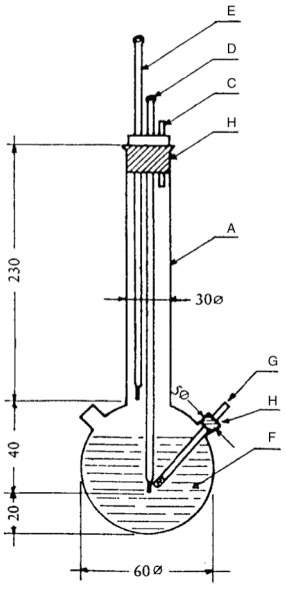
Vedi appendice.

1.6.4. **Metodo di Siwoloboff**

Il campione viene riscaldato in una apparecchiatura per il punto di fusione in una provetta di diametro approssimato di 5 mm (figura 1).

La figura 1 presenta un tipo di apparecchiatura standardizzata per la determinazione della temperatura di fusione e di ebollizione (JIS K 0064) (realizzata in vetro; tutte le quote sono in mm).

Figura 1



A: Recipiente di misura
B: Tappo
C: Sfogo
D: Termometro
E: Termometro ausiliario
F: Bagno liquido
G: Provetta contenente il campione: diametro esterno massimo 5 mm; contenente un tubo capillare di lunghezza di 100 mm circa, diametro interno di 1 mm circa e con spessore della parete da 0,2 a 0,3 mm
H: Tubo laterale

Nella provetta viene posto un tubo capillare (capillare di ebollizione) fuso a circa 1 cm dall'estremità inferiore. Il livello di riempimento della sostanza in esame deve essere tale che la parte fusa del capillare si trovi al di sotto della superficie del liquido. La provetta contenente il capillare di ebollizione può essere assicurata al termometro con un elastico oppure fissata tramite un sostegno laterale (vedi figura 2).

▼B

Figura 2

Principio secondo Siwoloboff

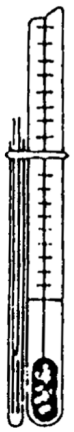
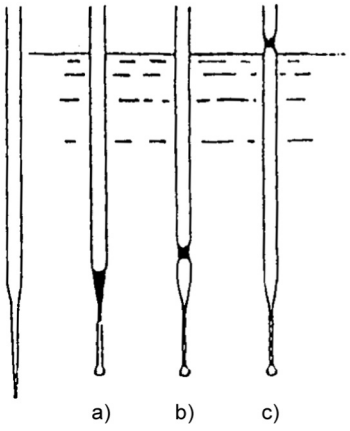


Figura 3

Principio modificato



Il liquido per il bagno va scelto in funzione della temperatura di ebollizione. Per temperature fino a 573 K si può impiegare olio di silicone. La paraffina liquida può essere impiegata solo fino a 473 K. Il riscaldamento del bagno liquido deve essere regolato in modo che l'incremento di temperatura sia inizialmente di circa 3 K/min. Il liquido del bagno va tenuto in agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura di ebollizione prevista, il riscaldamento va diminuito in maniera da ridurre la velocità di aumento della temperatura a meno di 1 K/min. In prossimità della temperatura di ebollizione, dal capillare in ebollizione incominciano a emergere rapidamente delle bollicine.

La temperatura di ebollizione è la temperatura alla quale, per raffreddamento temporaneo, la serie di bollicine s'arresta e il fluido inizia improvvisamente a risalire nel capillare. La corrispondente lettura termometrica rappresenta la temperatura di ebollizione della sostanza.

Secondo il principio modificato (vedi figura 3) la temperatura di ebollizione viene determinata in un capillare per la temperatura di fusione. Questo viene sfinato per circa 2 cm (a) e con esso si aspira una piccola quantità del campione. L'estremità aperta della parte sfinata viene chiusa alla fiamma in modo da far restare una bollicina d'aria in vicinanza della punta. Durante il riscaldamento nell'apparecchio per la temperatura di fusione (b) la bolla d'aria si dilata. La temperatura di ebollizione corrisponde alla temperatura alla quale il menisco superiore della sostanza raggiunge il livello della superficie del bagno liquido (c).

1.6.5. **Determinazione tramite fotocellula**

Il campione viene riscaldato in un tubicino capillare all'interno di un blocco metallico riscaldante.

Tramite opportune aperture sul blocco, un raggio di luce viene fatto passare attraverso la sostanza e colpisce una fotocellula accuratamente tarata.

Durante l'aumento della temperatura del campione, dal capillare di ebollizione emergono bollicine d'aria isolate. Quando viene raggiunta la temperatura di ebollizione, il numero di bollicine aumenta enormemente. Ciò fa variare l'intensità della luce misurata dalla fotocellula, inviando un segnale di arresto all'indice di un termometro a resistenza di platino collocato nel blocco.

Questo metodo risulta particolarmente vantaggioso poiché permette determinazioni al di sotto della temperatura ambiente fino a 253,15 K (- 20 °C) senza modifiche dell'apparecchiatura. È semplicemente necessario porre lo strumento in un bagno di raffreddamento.

▼B

1.6.6. **Analisi termica**

1.6.6.1. *Analisi termica differenziale*

Vedi appendice

1.6.6.2. *Calorimetria differenziale a scansione*

Vedi appendice

2. **DATI**

Per piccole deviazioni dalla pressione normale (max. ± 5 kPa), le temperature di ebollizione vengono normalizzate a T_n mediante la seguente equazione numerica di Sidney-Young:

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

dove:

Δp = (101,325 — p) [notare il segno],

p = valore misurato della pressione, in kPa,

f_T = coefficiente di correzione della temperatura di ebollizione con la pressione, in K/kPa,

T = valore misurato della temperatura, in K,

T_n = temperatura di ebollizione corretta a pressione normale, in K.

Per molte sostanze i coefficienti di correzione della temperatura f_T e le equazioni per il calcolo approssimativo sono indicati nelle norme internazionali e nazionali prima citate.

A titolo di esempio, il metodo DIN 53171 cita i seguenti coefficienti approssimativi per i solventi contenuti nelle vernici:

Tabella 2

Coefficienti di correzione della temperatura f_T

Temperatura T in K	Coefficiente di correzione f_T (K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo usato;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze) e dell'eventuale stadio preliminare di purificazione;

— una stima dell'accuratezza.

Come temperatura di ebollizione viene riportata la media di almeno due misure che ricadano nel campo dell'accuratezza stimata (vedi tabella 1).

Devono essere riportate le temperature di ebollizione misurate e la loro media, e le pressioni alle quali sono state effettuate le misure devono essere riportate in kPa. La pressione deve preferibilmente essere prossima alla normale pressione atmosferica.

Vanno fornite tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono ad esempio consultare le seguenti norme:

1. **Ebulliometro**

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

2. **Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analisi termica differenziale e calorimetria differenziale a scansione**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3. DENSITÀ RELATIVA

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici (OCSE) (1). I principi fondamentali sono riportati nel riferimento (2).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi qui illustrati si applicano alle sostanze solide e liquide senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza. I vari metodi da utilizzare sono elencati nella tabella 1.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

La densità relativa, D^{20}_4, di solidi o liquidi è il rapporto tra la massa di un determinato volume della sostanza in esame, misurata a 20 °C, e la massa di un ugual volume di acqua, misurata a 4 °C. La densità relativa è una grandezza adimensionale.

La densità, ρ, di una sostanza è il rapporto tra una determinata massa m e il volume corrispondente v.

In unità SI la densità, ρ, viene espressa in kg/m^3.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO (1) (3)

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento in rutti i casi in cui si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente l'accuratezza del metodo e per permettere un confronto con risultati ottenuti con altri metodi.

1.4. PRINCIPIO DEI METODI

Si utilizzano quattro classi di metodi.

1.4.1. **Metodi per galleggiamento**

1.4.1.1. *Idrometro* (per sostanze liquide)

Determinazioni rapide e sufficientemente accurate della densità possono essere eseguite per mezzo di idrometri galleggianti, che permettono di dedurre la densità di un liquido dal grado di immersione desunto da una scala graduata.

1.4.1.2. *Bilancia idrostatica* (per sostanze solide e liquide)

La differenza tra il peso di un campione in aria e quello in un liquido adatto (per esempio acqua) può essere utilizzata per determinare la densità.

Nel caso dei solidi, la densità cosi misurata va considerata valida solo per il particolare campione in esame. Per la determinazione della densità dei liquidi, un corpo di volume V noto viene pesato prima in aria e poi nel liquido stesso.

1.4.1.3. *Metodo ad immersione di sfera* (per sostanze liquide) (4)

In questo metodo la densità di un liquido viene determinata in base alla differenza tra i valori ottenuti pesando il liquido prima e dopo l'immersione di una sfera di volume noto nel liquido stesso.

▼B

1.4.2. **Metodi picnometrici**

Per solidi o liquidi possono impiegarsi picnometri di varia forma e di volume noto. La densità si calcola in base alla differenza di peso tra il picnometro pieno e quello vuoto ed in base al suo volume noto.

1.4.3. **Picnometro di comparizione ad aria** (per solidi)

La densità di un solido di forma qualsiasi può essere determinata a temperatura ambiente con il picnometro di comparazione a gas. Il volume di una sostanza viene misurato in aria o in un gas inerte all'interno di un cilindro tarato di volume variabile. Per il calcolo della densità va effettuata una misura di massa successivamente a quella di volume.

1.4.4. **Densimetro oscillante** (5) (6) (7)

La densità di un liquido può essere determinata per mezzo di un densimetro oscillante. Un oscillatore meccanico costruito a forma di un tubo a U viene fatto vibrare alla frequenza di risonanza dell'oscillatore, che dipende dalla sua massa. L'introduzione di un campione modifica! a frequenza di risonanza dell'oscillatore. L'apparecchio deve essere calibrato mediante due sostanze liquide di densità nota. Tali sostanze vanno preferibilmente selezionate in modo da coprire l'intervallo di densità in cui si effettuano le misure.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

L'applicabilità dei vari metodi impiegati per la determinazione della densità relativa è indicata nella tabella.

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

Nell'appendice sono riportate a titolo di esempio alcune delle norme da consultare per ulteriori dettagli tecnici.

Le prove vanno eseguite a 20 ºC effettuando almeno due misure.

2. **DATI**

Vedi norme

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo usato;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze) e dell'eventuale stadio preliminare di purificazione;

La densità relativa D_4^{20} deve essere indicata secondo quanto prescritto al punto 1.2., insieme allo stato fisico della sostanza esaminata.

Vanno fomite tutte le informazioni ed osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in modo particolare per quel che riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

▼B

Tabella

Applicabilità dei metodi

Metodi di misura	Densità		Viscosità dinamica massima possibile	Norme esistenti
	solidi	liquidi		
1.4.1.1. Idrometro		sì	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. bilancia idrostatica				
a) solidi	sì			ISO 1183 (A)
b) liquidi		sì	5 Pa s	ISO 901 e 758
1.4.1.3. metodo della sfera immersa		sì	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. picnometro				ISO 3507
a) solidi	sì			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) liquidi		sì	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. picnometro di comparazione ad aria	sì			DIN 55990 parte 3, DIN 53243
1.4.4. densimetro oscillante		sì	5 Pa s	

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253—255.

▼B

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, possono essere consultate, a titolo d'esempio, le seguenti norme:

1. **Metodi per galleggiamento**

1.1. Idrometro

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

1.2. Bilancia idrostatica

Per sostanze solide

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

Per sostanze liquide

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metodo della sfera immersa

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

2. **Metodi picnometrici**

2.1. Per sostanze liquide

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100,10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100,10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

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

▼B

2.2. Per sostanze solide

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.
NT T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Picnometro di comparazione ad aria**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. TENSIONE DI VAPORE

1. METODO

Questo metodo è equivalente al metodo OCSE TG 104 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

La presente versione riveduta del metodo A.4 (1) comprende un metodo supplementare, il metodo di effusione mediante termogravimetria isotermica, ideato per sostanze chimiche con livelli di pressione molto bassi (fino a 10^{-10} Pa). Alla luce della necessità di disporre di procedure atte a ricavare la tensione di vapore, specie nel caso di sostanze con bassa tensione di vapore, le altre procedure di questo metodo sono state riesaminate rispetto ad altri intervalli d'applicazione.

All'equilibrio termodinamico, la tensione di vapore di una sostanza pura è funzione della sola temperatura. I principi fondamentali sono illustrati altrove (2)(3).

Non esiste un unico procedimento di misura che sia applicabile all'intero spettro di tensione di vapore compreso tra valori inferiori a 10^{-10} e 10^5 Pa. Il metodo qui illustrato comprende otto procedure per misurare la tensione di vapore, utilizzabili in diversi intervalli di tensione di vapore. La tabella 1 offre un quadro sinottico dei vari metodi sotto il profilo dell'applicazione e dei relativi intervalli di misura. I metodi possono essere utilizzati unicamente per quei composti che non subiscono decomposizione nelle condizioni di prova. Qualora per ragioni tecniche non sia possibile effettuare misure sperimentali, la tensione di vapore può essere stimata. Un metodo consigliato è illustrato nell'appendice.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ DI MISURA

La tensione di vapore di una sostanza è definita come la pressione di saturazione al di sopra di un solido o di un liquido.

Deve essere utilizzata l'unità SI di pressione, che è il pascal (Pa). Altre unità impiegate in passato sono qui di seguito elencate con i relativi fattori di conversione:

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

L'unità SI di temperatura è il kelvin (K). La conversione dei gradi Celsius in kelvin è eseguita mediante la formula:

$$T = t + 273{,}15$$

dove T rappresenta la temperatura kelvin o termodinamica, mentre t è la temperatura Celsius.

▼**M1**

Tabella 1

Metodo di misura	Sostanze		Ripetibilità stimata	Riproducibilità stimata	Intervallo raccomandato
	Solide	Liquide			
Metodo dinamico	basso- fondenti	sì	fino al 25 % 1-5 %	fino al 25 % 1-5 %	da 10^3 Pa a 2×10^3 Pa da 2×10^3 Pa a 10^5 Pa
Metodo statico	sì	sì	5-10 %	5-10 %	da 10 Pa a 10^5 Pa da 10^{-2} Pa a 10^5 Pa ([1])
Metodo isoteniscopico	sì	sì	5-10 %	5-10 %	da 10^2 Pa a 10^5 Pa
Metodo di effusione: bilancia a tensione di vapore	sì	sì	5-20 %	fino al 50 %	da 10^{-3} a 1 Pa
Metodo di effusione: cellula di Knudsen	sì	sì	10-30 %	—	da 10^{-10} a 1 P
Metodo di effusione: termogravimetria isotermica	sì	sì	5-30 %	fino al 50 %	da 10^{-10} a 1 Pa
Metodo di saturazione del gas	sì	sì	10-30 %	fino al 50 %	da 10^{-10} a 10^3 Pa
Metodo del rotore	sì	sì	10-20 %	—	da 10^{-4} a 0,5 Pa

([1]) Utilizzando un manometro capacitivo.

1.3. PRINCIPIO DELLA PROVA

Generalmente la tensione di vapore è determinata a varie temperature. In un intervallo di temperatura ristretto, il logaritmo della tensione di vapore di una sostanza pura è funzione lineare del reciproco della temperatura termodinamica, secondo l'equazione semplificata di Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + costante$$

dove:

p = tensione di vapore in pascal

ΔHv = calore di vaporizzazione in J mol^{-1}

R = costante universale dei gas 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura in K

▼M1

1.4. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non occorre utilizzare sostanze di riferimento. Queste servono principalmente a controllare periodicamente la prestazione del metodo e a permettere il confronto tra i risultati ottenuti con metodi differenti.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO

1.5.1. **Metodo dinamico (metodo di Cottrell)**

1.5.1.1. *Principio*

La tensione di vapore è determinata misurando la temperatura di ebollizione della sostanza a varie pressioni prestabilite comprese approssimativamente tra 10^3 e 10^5 Pa. Questo metodo è raccomandato anche per la determinazione della temperatura di ebollizione e a tal fine è utilizzabile fino a 600 K. La temperatura di ebollizione dei liquidi rilevata a 3-4 cm di profondità è di circa 0,1 °C superiore a quella rilevata in superficie, a causa della pressione idrostatica esercitata dalla colonna di liquido. Con il metodo di Cottrell (4) il termometro è posto nel vapore sopra la superficie del liquido; il liquido in ebollizione è pompato continuamente sul bulbo del termometro, sul quale forma un sottile strato di liquido in stato di equilibrio con il vapore a pressione atmosferica. Il termometro rileva quindi il vero punto di ebollizione, senza gli errori causati dal surriscaldamento o dalla pressione idrostatica. La pompa originariamente usata da Cottrell è illustrata in figura 1. Il tubo A contiene il liquido in ebollizione. Un filo di platino B incorporato nel fondo favorisce l'uniformità dell'ebollizione. Il tubo laterale C conduce ad un condensatore e la guaina D impedisce al condensato freddo di entrare in contatto con il termometro E. Quando il liquido in A bolle, le bollicine e il liquido intrappolati dall'imbuto si riversano sul bulbo del termometro attraverso i due bracci della pompa F.

Figura 1

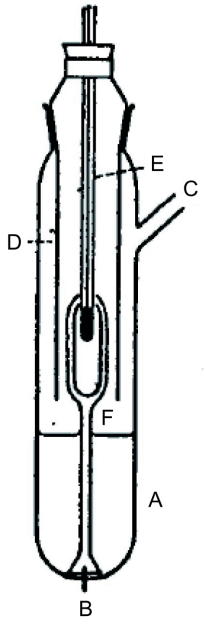
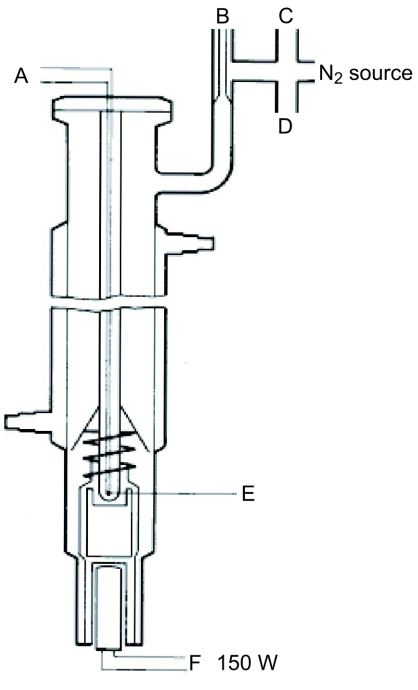


Figura 2



▼**M1**

Pompa Cottrell (4)

A: Termocoppia

B: Polmone per il vuoto

C: Manometro

D: Al vuoto

E: Punto di misura

F: Elemento riscaldante (150 W circa)

1.5.1.2. *Apparecchiatura*

La figura 2 mostra un'apparecchiatura molto accurata che sfrutta il principio di Cottrell. La sezione di ebollizione è nella parte inferiore del tubo, mentre il dispositivo di raffreddamento è in quella centrale. Nella parte superiore si trovano un'uscita ed una flangia. La pompa Cottrell è posta nella sezione di ebollizione, che è riscaldata mediante una cartuccia elettrica. La temperatura è misurata con una termocoppia incamiciata o un termometro a resistenza infilato attraverso la flangia in alto. L'uscita è collegata al sistema di regolazione della pressione, composto da una pompa da vuoto, un polmone, un manostato attraverso il quale è introdotto l'azoto per regolare la pressione ed un manometro.

1.5.1.3. *Procedimento*

La sostanza è posta nella sezione di ebollizione. Con i solidi che si presentano in forma diversa dalla polvere è possibile incontrare dei problemi, che tuttavia possono essere talvolta risolti riscaldando la camicia di raffreddamento. L'apparecchio viene sigillato in corrispondenza della flangia e la sostanza viene degassata. Questo metodo non è adatto per effettuare misure su sostanze schiumogene.

Si imposta quindi la pressione minima desiderata e si aziona il riscaldamento, attivando contemporaneamente il collegamento del sensore di temperatura ad un registratore.

L'equilibrio è raggiunto quando si registra una temperatura di ebollizione costante a pressione costante. Bisogna prestare molta attenzione al fine di evitare la formazione di grosse bolle durante l'ebollizione. Inoltre, sul refrigerante deve avvenire una condensazione completa. Quando si determina la tensione di vapore di solidi basso-fondenti, occorre stare attenti ad evitare il blocco del condensatore.

Dopo aver registrato tale punto di equilibrio, si regola la pressione su un valore più elevato. Tale operazione è ripetuta fino a raggiungere una pressione di 10^5 Pa (per un totale di circa 5-10 punti di misura). A titolo di controllo, la determinazione dei punti di equilibrio deve essere ripetuta a pressioni decrescenti.

1.5.2. **Metodo statico**

1.5.2.1. *Principio*

Nel metodo statico (5), si determina la tensione di vapore ad una data temperatura in condizioni di equilibrio termodinamico. Questo metodo si presta sia per sostanze che per solidi e liquidi multicomponenti nell'intervallo da 10^{-1} a 10^5 Pa, nonché nell'intervallo da 1 a 10 Pa, purché si proceda con attenzione.

▼**M1**

1.5.2.2. *Apparecchiatura*

La strumentazione consiste in un bagno mantenuto a temperatura costante (tolleranza pari a ± 0,2 K), un contenitore per il campione collegato ad una linea da vuoto, un manometro ed un sistema per regolare la pressione. La camera del campione (figura 3a) è collegata alla linea da vuoto mediante una valvola ed un manometro differenziale (un tubo ad U contenente un opportuno fluido manometrico), che funge da indicatore di zero. Per il manometro differenziale è possibile utilizzare mercurio, fluidi siliconici e ftalati, a seconda dell'intervallo di pressione e del comportamento chimico della sostanza esaminata. Tuttavia, sulla base di considerazioni di ordine ambientale, l'uso del mercurio, se possibile, dovrebbe essere evitato. È necessario che la sostanza di prova non si sciolga in modo apprezzabile nel fluido contenuto nel tubo ad U o che non reagisca con esso. Il tubo ad U può essere sostituito da un manometro (figura 3b). Per il manometro, nell'intervallo compreso tra pressione normale e 10^2 Pa può essere utilizzato il mercurio, mentre i fluidi siliconici e gli ftalati sono adatti per l'uso nell'intervallo da 10^2 Pa a 10 Pa. Esistono poi altri misuratori di pressione che possono essere utilizzati per pressioni inferiori a 10^2 Pa. I manometri capacitativi a membrana riscaldabile possono essere impiegati anche al di sotto di 10^{-1} Pa. La temperatura è misurata sulla parete esterna del recipiente contenente il campione oppure nel recipiente stesso.

1.5.2.3. *Procedimento*

Servendosi della strumentazione descritta in figura 3a, riempire il tubo ad U con il liquido scelto, che deve essere degassato a temperatura elevata prima di effettuare le letture. La sostanza di prova è posta nell'apparecchiatura e degassata a temperatura ridotta. Nel caso di campioni multicomponenti, la temperatura deve essere sufficientemente bassa da assicurare che la composizione del materiale non venga alterata. L'equilibrio può essere raggiunto più rapidamente mediante agitazione. Il campione può essere raffreddato con azoto liquido o ghiaccio secco, avendo cura tuttavia di non far condensare l'aria o il fluido della pompa. L'aria viene eliminata attivando l'aspirazione per diversi minuti, mantenendo aperta la valvola posta al di sopra del recipiente del campione. Se necessario, l'operazione di degassaggio può essere ripetuta varie volte.

Figura 3a

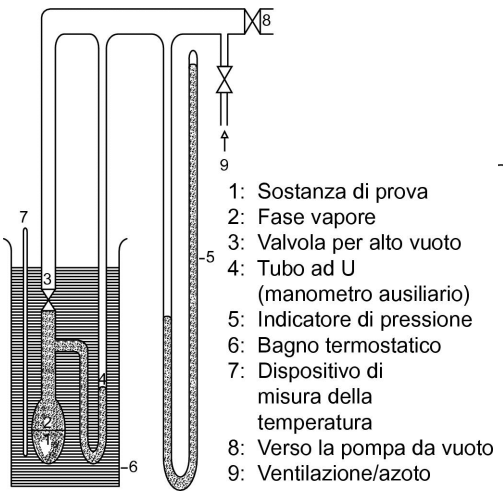
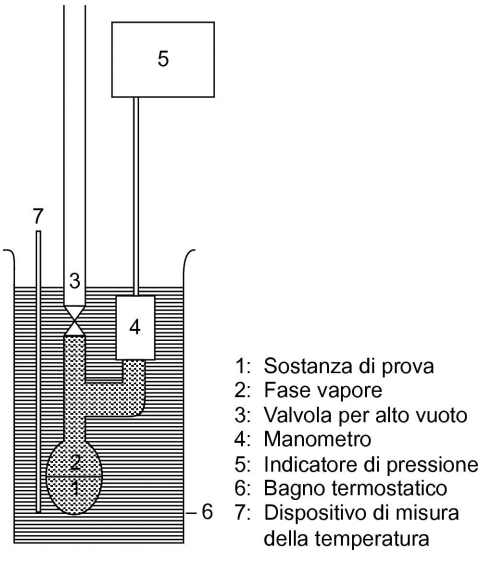


Figura 3b



▼**M1**

Quando il campione è riscaldato con la valvola chiusa, la tensione di vapore aumenta. Ciò altera l'equilibrio del fluido contenuto nel tubo a U. Per compensare questo effetto, si immette azoto o aria nell'apparecchio fino a che l'indicatore di pressione differenziale è nuovamente a zero. La pressione richiesta a questo scopo può essere letta dal manometro o da uno strumento di maggiore precisione. Tale pressione corrisponde alla tensione di vapore della sostanza alla temperatura di misura. Utilizzando la strumentazione illustrata in figura 3b, la tensione di vapore è letta direttamente.

La tensione di vapore è determinata ad intervalli adeguatamente ridotti (per un totale di circa 5-10 punti di misura) fino al massimo valore di temperatura desiderato.

Le letture a bassa temperatura devono essere ripetute per verifica. Se i valori ottenuti dalla ripetizione delle letture non coincidono con la curva ottenuta a temperatura crescente, la ragione può essere una delle seguenti:

i) il campione contiene ancora aria (come nel caso, per esempio, di materiali ad elevata viscosità) o sostanze basso-bollenti, che è/sono liberata/e durante il riscaldamento;

ii) la sostanza subisce una reazione chimica nell'intervallo di temperatura considerato (per esempio decomposizione, polimerizzazione).

1.5.3. **Metodo isoteniscopico**

1.5.3.1. *Principio*

L'isoteniscopio (6) è basato sul principio del metodo statico. Il metodo prevede che il campione sia posto in un bulbo tenuto a temperatura costante, collegato ad un manometro e ad una pompa da vuoto. Le impurezze più volatili della sostanza sono eliminate degassando a pressione ridotta. La tensione di vapore del campione in corrispondenza dei valori di temperatura prescelti è bilanciata da una pressione nota di gas inerte. Benché sia stato messo a punto per misurare la tensione di vapore di alcuni idrocarburi liquidi, l'isoteniscopio si presta anche per l'esame di solidi. Il metodo non è solitamente adatto per sistemi multicomponenti. I risultati sono soggetti solo a lievi errori qualora i campioni contengano impurezze non volatili. L'intervallo raccomandato è da 10^2 a 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Apparecchiatura*

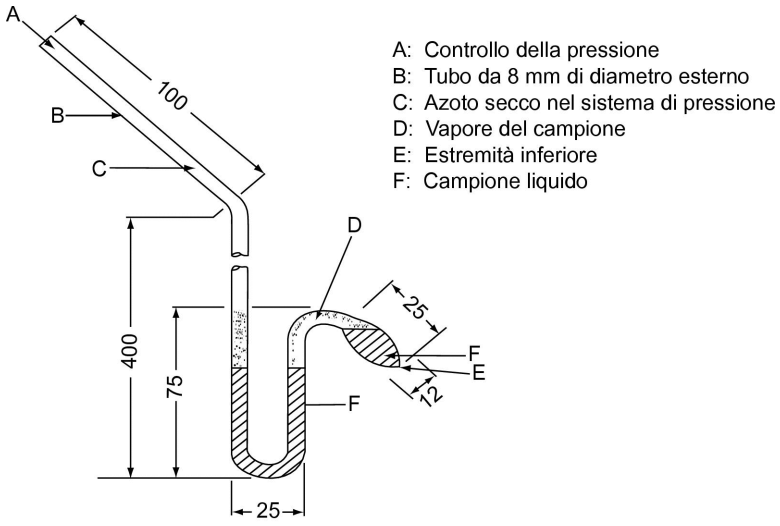
Un esempio di dispositivo di misura è illustrato in figura 4. Per la descrizione completa si consulti la norma ASTM D 2879-86 (6).

▼M1

1.5.3.3. *Procedimento*

Nel caso di liquidi, la sostanza medesima funge da fluido per il manometro differenziale. Una quantità di liquido sufficiente a riempire il bulbo ed il ramo corto del manometro viene introdotta nell'isoteniscopio. Questo è quindi collegato ad un sistema da vuoto e svuotato, per poi essere successivamente riempito con azoto. Lo svuotamento e la pulizia del sistema sono ripetuti due volte per eliminare l'ossigeno residuo. Una volta riempito, l'isoteniscopio è messo in posizione orizzontale, in modo che il campione si sparga in uno strato sottile nel bulbo del campione e nella sezione manometrica. La pressione del sistema è ridotta a 133 Pa ed il campione è riscaldato delicatamente, fino a quando incomincia a bollire (eliminazione dei gas disciolti). L'isoteniscopio viene poi disposto in modo che il campione ritorni nel bulbo e riempia il ramo corto del manometro. La pressione viene mantenuta a 133 Pa. L'estremità del bulbo portacampione viene riscaldata con una piccola fiamma, fino a quando i vapori del campione liberati si espandono al punto da spostare parte del campione dalla parte superiore del bulbo e del braccio manometrico nella sezione manometrica dell'isoteniscopio, creando uno spazio riempito di vapore ed esente da azoto. L'isoteniscopio è quindi posto in un bagno a temperatura costante e la pressione dell'azoto viene regolata fino a coincidere con quella del campione. All'equilibrio, la pressione dell'azoto è uguale alla tensione di vapore della sostanza.

Figura 4



(Dimensioni in mm)

Nel caso di solidi, ed in funzione degli intervalli di pressione e temperatura, sono usati come liquidi manometrici fluidi siliconici e ftalati. Il liquido manometrico degassato viene introdotto in una boccia sul braccio lungo dell'isoteniscopio. Il solido da analizzare è quindi posto nel bulbo portacampione e degassato a temperatura elevata. Dopo questa operazione, l'isoteniscopio è inclinato così che il liquido manometrico possa defluire nel tubo ad U.

▼M1

1.5.4. **Metodo di effusione: bilancia a tensione di vapore** (7)

1.5.4.1. *Principio*

Un campione della sostanza di prova è riscaldato in un piccolo forno e posto in una campana evacuata. Il forno è coperto mediante un coperchio recante dei piccoli fori di diametro noto. Il vapore della sostanza che fuoriesce da uno dei fori è convogliato sul piatto di una bilancia ad alta sensibilità, anch'essa racchiusa nella campana evacuata. In alcuni modelli, il piatto è collocato in una cassetta di refrigerazione, che provvede alla dissipazione del calore verso l'esterno per conduzione termica, ed è raffreddato per irraggiamento così che il vapore che fuoriesce dal forno si condensi sul piatto. La quantità di moto del getto di vapore agisce come una forza sulla bilancia. La tensione di vapore può essere ricavata in due modi: direttamente dalla forza esercitata sul piatto della bilancia oppure dalla velocità di evaporazione applicando l'equazione di Hertz-Knudsen (2):

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

dove:

G = velocità di evaporazione (kg s^{-1} m^{-2})

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

T = temperatura (K)

R = costante universale del gas (J mol^{-1} K^{-1})

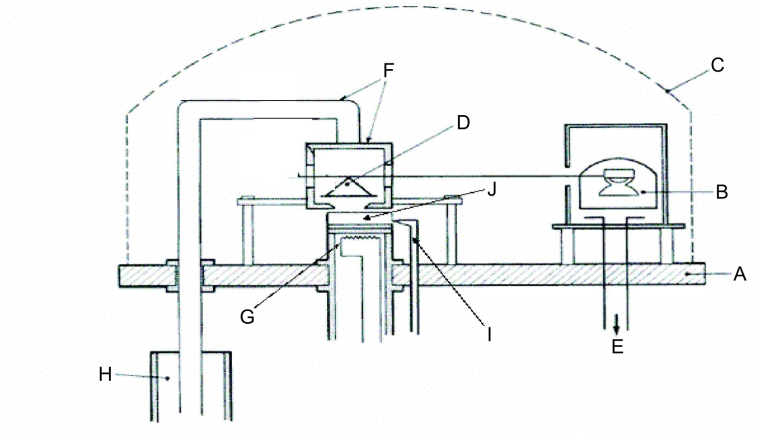
p = tensione di vapore (Pa)

L'intervallo raccomandato è da 10^{-3} a 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparecchiatura*

Il principio generale dell'apparecchiatura è illustrato in figura 5.

Figura 5



A: Piastra di base

B: Strumento a spirale mobile

C: Campana

D: Bilancia con piatto

E: Vacuometro

F: Cassetta di refrigerazione e barra di raffreddamento

G: Forno evaporatore

H: Dewar con azoto liquido

I: Misura della temperatura del campione

J: Sostanza di prova

▼M1

1.5.5. **Metodo ad effusione: cella di Knudsen**

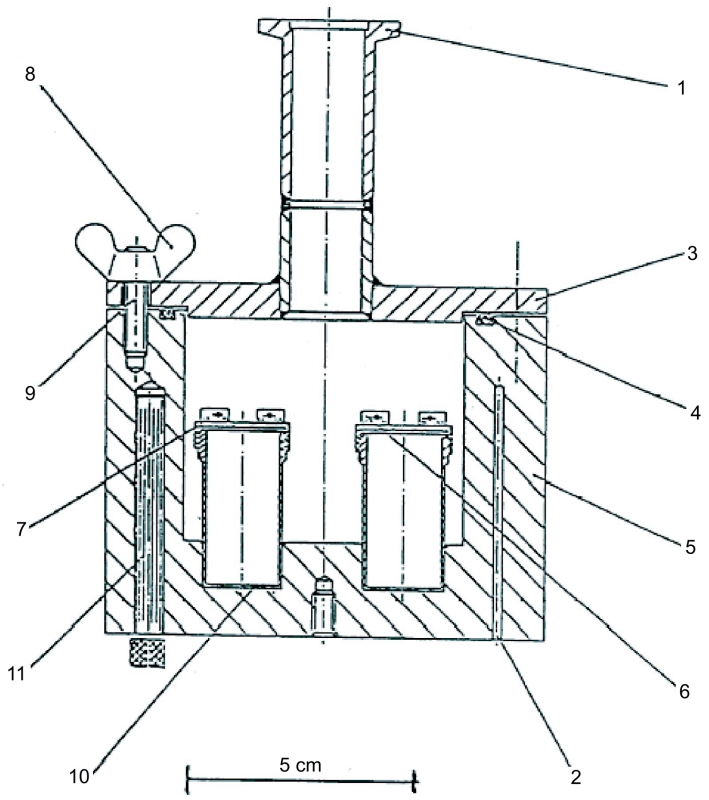
1.5.5.1. *Principio*

Il metodo è basato sulla stima della massa della sostanza di prova liberata per unità di tempo da una cella di Knudsen sotto forma di vapore, attraverso un micro-orifizio in condizioni di vuoto spinto (8). La massa di vapore effuso può essere ricavata misurando la perdita di massa della cella oppure facendo condensare il vapore a bassa temperatura e determinando la quantità di sostanza volatilizzata mediante cromatografia. La tensione di vapore è calcolata tramite la relazione di Hertz-Knudsen (cfr. punto 1.5.4.1), applicando dei fattori di correzione definiti in funzione dei parametri dell'apparecchiatura (9). L'intervallo raccomandato è da 10^{-10} a 1 Pa (10)(11)(12)-(13)(14).

1.5.5.2. *Apparecchiatura*

Il principio generale della strumentazione è illustrato in figura 6.

Figura 6



1: Collegamento al vuoto

2: Pozzetti per il termometro a resistenza di platino o per la misura e il controllo della temperatura

3: Coperchio del recipiente da vuoto

4: O-ring

5: Recipiente da vuoto in alluminio

6: Dispositivo per installare e rimuovere le celle di effusione

7: Coperchio a vite

8: Dadi ad alette

9: Bulloni

10: Celle di effusione in acciaio inossidabile

11: Cartuccia riscaldante

▼M1

1.5.6. **Metodo di effusione: termogravimetria isotermica**

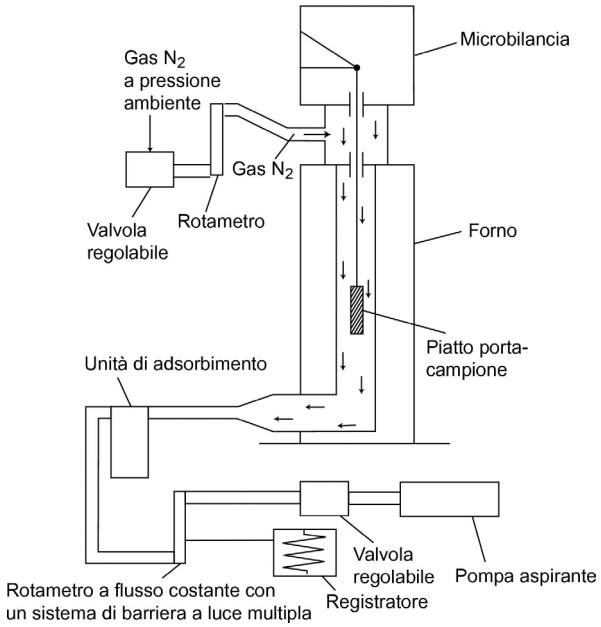
1.5.6.1. *Principio*

Il metodo è basato sulla determinazione della velocità di evaporazione accelerata della sostanza di prova a temperature elevate e pressione ambiente mediante termogravimetria (10)(15)(16)(17)(18)-(19)(20). La velocità di evaporazione v_T è ricavata esponendo il composto scelto ad un lento flusso di gas inerte e controllando la perdita di peso a definiti valori di temperatura costante T in kelvin, per opportuni lassi di tempo. La tensione di vapore p_T è calcolata dai valori di v_T utilizzando la relazione lineare tra il logaritmo della tensione di vapore ed il logaritmo della velocità di evaporazione. Se necessario, i valori a temperatura di 20 e 25 °C possono essere estrapolati mediante analisi di regressione del logaritmo log p_T vs. 1/T. Questo metodo si presta per quelle sostanze che hanno tensione di vapore pari a 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) e la cui purezza è il più possibile prossima al 100 %, onde evitare che le perdite di peso misurate siano interpretate in modo erroneo.

1.5.6.2. *Apparecchiatura*

Il principio generale della strumentazione è illustrato in figura 7.

Figura 7



Il piatto portacampione, appeso ad una microbilancia all'interno di una camera a temperatura controllata, è investito da un flusso di gas di azoto secco che trasporta le molecole vaporizzate della sostanza di prova. All'uscita della camera, il flusso di gas è purificato da un'unità di adsorbimento.

1.5.6.3. *Procedimento*

La sostanza di prova è distribuita sotto forma di strato omogeneo su un piatto di vetro ruvido. Qualora la sostanza sia solida, il piatto è bagnato in modo uniforme con una soluzione della sostanza in un opportuno solvente ed è poi asciugato in atmosfera inerte. Il piatto così ricoperto è sospeso in un analizzatore termogravimetrico, che misura la perdita di peso in modo continuo in funzione del tempo.

▼M1

La velocità di evaporazione v_T ad una determinata temperatura è calcolata dalla perdita di peso Δm del piatto del campione mediante la formula

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}\left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}}\right)$$

dove F è l'area superficiale dello strato della sostanza di prova, che solitamente corrisponde all'area superficiale del piatto del campione, mentre t è il tempo durante il quale è osservata la perdita di peso Δm.

La tensione di vapore p_T è calcolata in funzione della velocità di evaporazione v_T:

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

dove C e D sono costanti specifiche del dispositivo sperimentale utilizzato che dipendono dal diametro della camera di misura e dalla velocità del flusso del gas. Tali costanti devono essere stabilite una volta per tutte misurando una serie di composti di cui si conosce la tensione di vapore e mediante regressione del logaritmo log p_T vs. log v_T (11)(21)(22).

La relazione tra la tensione di vapore p_T e la temperatura T in kelvin è data da

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

dove A e B sono costanti ricavate mediante regressione del logaritmo log p_T vs. 1/T. Questa equazione permette di estrapolare la tensione di vapore a qualsiasi altra temperatura.

1.5.7. **Metodo di saturazione del gas** (23)

1.5.7.1. *Principio*

Un flusso di gas inerte, di cui si conosce la portata, viene fatto passare a temperatura ambiente sopra o attraverso un campione della sostanza di prova a velocità sufficientemente ridotta da assicurare la saturazione. È determinante che si raggiunga la saturazione nella fase gassosa. La sostanza trasportata è intrappolata, solitamente mediante un adsorbente; se ne determina poi la quantità. In alternativa all'uso di trappole adsorbenti ed alla successiva analisi, è possibile determinare la quantità di sostanza trasportata mediante tecniche analitiche a flusso continuo, quali la gascromatografia. La tensione di vapore è calcolata partendo dall'ipotesi che sia soddisfatta la legge dei gas ideali e che la pressione totale di una miscela gassosa sia uguale alla somma delle pressioni esercitate dai singoli gas che la compongono. La pressione parziale della sostanza di prova, ossia la tensione di vapore, è ricavata dal volume complessivo noto del gas e dalla massa del materiale trasportato.

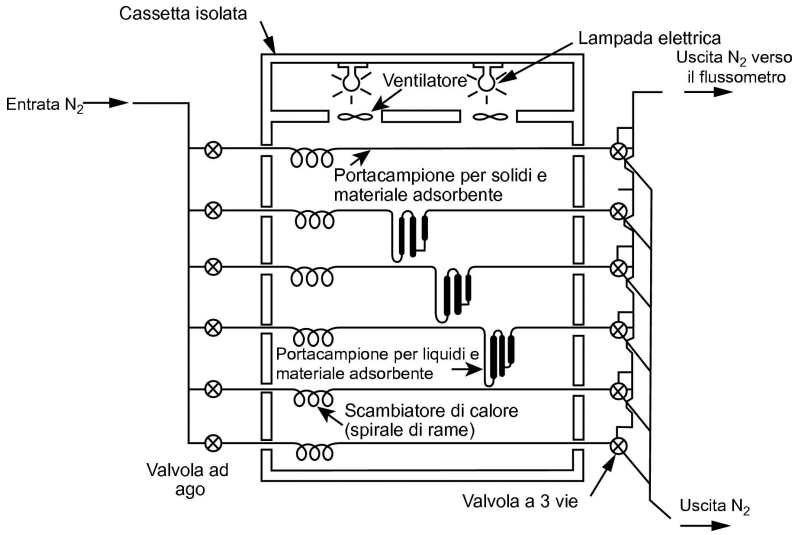
Il metodo di saturazione del gas può essere utilizzato sia per sostanze solide che liquide e per valori di tensione di vapore fino a 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Il metodo offre la massima affidabilità per valori inferiori a 10^3 Pa. Al di sopra di 10^3 Pa, la tensione di vapore è di solito sovrastimata, probabilmente a causa della formazione di aerosol. Essendo le misure della tensione di vapore effettuate a temperatura ambiente, non occorre estrapolare i dati a temperature elevate, evitando un'operazione che è spesso fonte di gravi errori.

1.5.7.2. *Apparecchiatura*

Il metodo richiede l'impiego di una cassetta mantenuta a temperatura costante. Lo schema riportato in figura 8 mostra una cassetta dotata di tre portacampioni per solidi e di altrettanti portacampioni per liquidi, tale da consentire l'analisi in triplo di un campione liquido o solido. La temperatura è controllata con una tolleranza pari a ± 0,5 °C o inferiore.

▼**M1**

Figura 8



Generalmente come gas inerte di trasporto è utilizzato l'azoto, ma alle volte può essere richiesto l'impiego di un altro gas (24). Il gas vettore deve essere secco. Il flusso di gas, ripartito in sei flussi regolati da valvole ad ago (aventi un foro di circa 0,79 mm) entra nella cassetta attraverso un tubo di rame avente un diametro interno di 3,8 mm. Equilibrata la temperatura, il gas attraversa il campione e la trappola adsorbente, per poi fuoriuscire dalla cassetta.

I campioni solidi sono introdotti in un tubo con un diametro interno di 5 mm, tra due strati di lana di vetro (cfr. figura 9). La figura 10 mostra un portacampione per liquidi ed il sistema di adsorbimento. Il modo più riproducibile per misurare la tensione di vapore di liquidi consiste nel ricoprire con uno strato di liquido delle palline di vetro o un materiale adsorbente inerte, quale la silice, con cui riempire il portacampione. In alternativa, è possibile far passare il gas di trasporto in una fritta ruvida ed una bolla attraverso una colonna della sostanza di prova liquida.

Figura 9

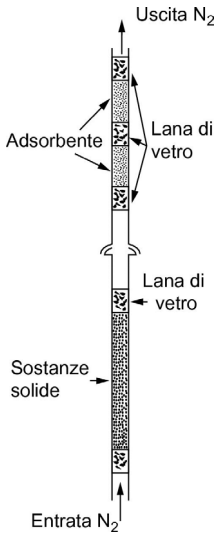
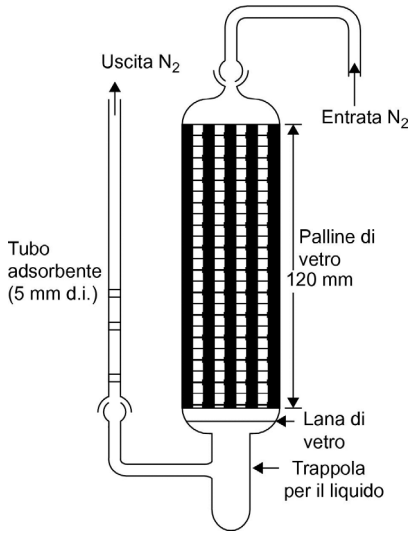


Figura 10



▼M1

Il dispositivo di adsorbimento consta di due sezioni adsorbenti: una anteriore ed una posteriore con funzione di riserva. Nel caso di valori di tensione di vapore molto bassi, l'adsorbente trattiene solo piccole quantità. In tal caso l'adsorbimento sulla lana di vetro e sul tubo di vetro nella sezione tra il campione e l'adsorbente può rappresentare un grave problema.

Un modo altrettanto efficiente per raccogliere il materiale vaporizzato consiste nell'impiego di trappole raffreddate con CO_2 solida. Non producono alcuna contropressione sulla colonna del saturatore ed inoltre consentono con facilità di rimuovere completamente il materiale intrappolato.

1.5.7.3. *Procedimento*

La portata del flusso in uscita del gas di trasporto è misurata a temperatura ambiente. Durante l'esperimento, la portata del flusso deve essere controllata frequentemente per garantire un valore esatto del volume totale del gas di trasporto. È preferibile un controllo continuo mediante un flussimetro di massa. La saturazione della fase gassosa può richiedere un tempo di contatto considerevole, per cui i valori della portata del flusso del gas possono essere alquanto bassi (25).

Al termine dell'esperimento, sia la sezione adsorbente anteriore che la sezione di riserva sono analizzate separatamente. Il composto depositato su ciascuna sezione è desorbito aggiungendo un solvente. Le soluzioni così ottenute sono sottoposte ad analisi quantitativa per determinare la massa di sostanza desorbita da ciascuna sezione. La scelta del metodo di analisi (nonché dell'adsorbente, così come del solvente per il desorbimento) dipende dalle caratteristiche del materiale analizzato. L'efficienza del desorbimento è determinata iniettando una quantità nota di campione sull'adsorbente, procedendo quindi al suo desorbimento ed analizzando il quantitativo recuperato. È importante che la verifica dell'efficienza del desorbimento sia effettuata allo stesso livello di concentrazione del campione nelle condizioni di prova, o in prossimità di esso.

Per essere sicuri che il gas di trasporto sia saturo della sostanza di prova, sono utilizzate tre diverse portate del flusso. Il gas è ritenuto saturo quando la tensione di vapore calcolata non manifesta alcuna dipendenza dalla portata.

La tensione di vapore è calcolata mediante l'equazione:

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

dove:

p = tensione di vapore (Pa)

W = massa della sostanza di prova evaporata (g)

V = volume del gas saturo (m^3)

R = costante universale dei gas 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = massa molare della sostanza di prova (g mol^{-1}).

I volumi misurati devono essere corretti per tenere conto delle differenze di temperatura e pressione tra il flussimetro e il saturatore.

▼M1

1.5.8. **Rotore**

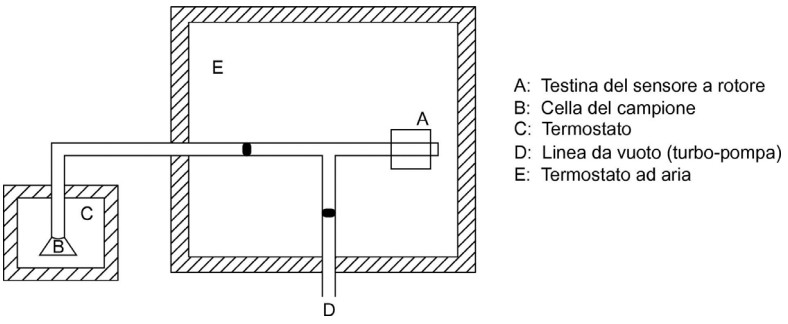
1.5.8.1. *Principio*

Questo metodo si avvale di un viscosimetro a rotore, il cui elemento di misura è costituito da una piccola sfera d'acciaio che, sospesa in un campo magnetico, viene fatta ruotare su se stessa da campi rotanti (26)(27)(28). La velocità di rotazione è misurata mediante bobine di trasduzione. Quando la sfera raggiunge una certa velocità di rotazione, solitamente 400 giri al secondo, la fornitura di energia viene interrotta ed ha luogo una decelerazione dovuta all'attrito col gas. La diminuzione della velocità di rotazione è misurata in funzione del tempo. La tensione di vapore è ricavata dal rallentamento del moto della sfera d'acciaio, che è appunto dipendente dalla pressione. L'intervallo di pressione raccomandato è compreso tra 10^{-4} e 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparecchiatura*

La strumentazione è illustrata schematicamente in figura 11. La testina di misurazione è collocata in un recipiente termostatato, con una tolleranza di regolazione di 0,1 °C. Il contenitore del campione è posto in un recipiente a parte, anch'esso termostatato con una tolleranza di regolazione di 0,1 °C. Tutte le altre parti dell'apparecchiatura sono tenute ad una temperatura più elevata per impedire la condensazione. L'intera apparecchiatura è collegata ad un sistema per alto vuoto.

Figura 11



2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

La tensione di vapore ottenuta mediante uno qualunque dei metodi precedenti deve essere determinata ad almeno due temperature. Per verificare la linearità della curva di tensione di vapore sono preferibili tre o più temperature nell'intervallo tra 0 e 50 °C. Nel caso in cui siano utilizzati i metodi di effusione (cella di Knudsen e termogravimetria isotermica) e di saturazione del gas, sono raccomandati valori di temperatura di misura compresi tra 120 e 150 °C, anziché nell'intervallo 0-50 °C.

2.2. RELAZIONE DELLA PROVA

La relazione della prova deve comprendere le seguenti informazioni:

— metodo usato,

▼**M1**

— descrizione precisa della sostanza (identità ed impurezze) ed eventuale stadio preliminare di purificazione,

— almeno due valori di tensione di vapore e temperatura — preferibilmente tre o più — richiesti nell'intervallo da 0 a 50 °C (o da 120 a 150 °C),

— almeno uno dei due valori di temperatura dovrebbe essere pari o inferiore a 25 °C, se tecnicamente possibile in base al metodo scelto,

— tutti i dati originali,

— una curva log p contro 1/T,

— una stima della tensione di vapore a 20 o 25 °C.

Qualora si osservi una transizione (cambiamento di stato, decomposizione), devono essere fornite le informazioni seguenti:

— la natura del cambiamento,

— la temperatura a cui il cambiamento si verifica a pressione atmosferica,

— la tensione di vapore a 10° C e a 20° C al di sotto della temperatura di transizione, nonché a 10° C e a 20° C al di sopra di tale temperatura (a meno che la transizione non consista nel passaggio dallo stato solido allo stato gassoso).

Devono essere riportate tutte le informazioni e osservazioni significative ai fini dell'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

3. **BIBLIOGRAFIA**

1. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 383 A del 1992, pagg. 26-47.

2. Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B. e Vodar, B. (a cura di) Butterworths, London.

3. Weissberger R., a cura di (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3ª ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2ª ed., Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20-048 AFNOR (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

6. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20-047 AFNOR (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼M1

8. Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

11. Tomlin, C.D.S. (a cura di), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 N. 1 (1987), 117-122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87-(12) (1998) 1512-20.

21. Lide, D.R. (a cura di), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

22. Meister, R.T. (a cura di), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

23. 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

24. Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

25. Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G. e Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K. eLindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28. Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼**M1**

Appendice

Metodo di stima

INTRODUZIONE

I valori stimati della tensione di vapore possono essere usati:

— per decidere quale tra i metodi sperimentali sia appropriato,

— per fornire una stima o un valore limite nei casi in cui il metodo sperimentale non possa essere applicato per ragioni tecniche.

METODO DI STIMA

La tensione di vapore di liquidi e solidi può essere stimata utilizzando la correlazione di Watson modificata (a). L'unico dato sperimentale richiesto è il punto di ebollizione normale. Il metodo può essere applicato nell'intervallo di pressione da 10^5 Pa a 10^{-5} Pa.

Per informazioni particolareggiate sul metodo si consulti il testo «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b). Si rinvia inoltre a «OECD Environmental Monograph No.67» (c).

PROCEDURA DI CALCOLO

La tensione di vapore è calcolata come segue:

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

dove:

T = temperatura d'interesse

T_b = punto di ebollizione normale

P_{VP} = tensione di vapore alla temperatura T

ΔH_{Vb} = calore di vaporizzazione

ΔZ_b = fattore di comprimibilità (stimato a 0,97)

m = fattore empirico dipendente dallo stato fisico alla temperatura d'interesse

inoltre,

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

dove K_F è un fattore empirico che tiene conto della polarità della sostanza. Per alcuni tipi di composti, i fattori K_F sono elencati nel riferimento b).

▼**M1**

Frequentemente sono disponibili dati per i quali è fornito il punto di ebollizione a pressione ridotta. In tal caso, la tensione di vapore è calcolata nel seguente modo:

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

dove T_1 è il punto di ebollizione a pressione ridotta P_1.

RELAZIONE

Qualora si usi il metodo di stima, la relazione deve includere la documentazione completa del calcolo.

BIBLIOGRAFIA

a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. TENSIONE SUPERFICIALE

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1) I principi fondamentali sono presentati nel riferimento (2).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi qui illustrati si applicano alla misura della tensione superficiale di soluzioni acquose.

Prima di effettuare le prove, è utile disporre di dati preliminari su alcune caratteristiche della sostanza in esame, quali la solubilità in acqua, la struttura, il comportamento all'idrolisi e la concentrazione critica per la formazione di micelle.

I metodi qui illustrati si applicano alla maggior parte delle sostanze chimiche senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La misura della tensione superficiale col metodo del tensiometro ad anello può essere effettuata soltanto su soluzioni acquose con viscosità dinamica inferiore a 200 mPa s circa.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Per tensione superficiale si intende l'entalpia libera superficiale per unità di area.

La tensione superficiale si misura in:

N/m (unità SI) oppure in

mN/m (sottomultipli della unità SI);

1 N/m = 10^3 dine/cm,

1 mN/m = 1 dine/cm nel vecchio sistema cgs.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente l'attendibilità del metodo e per permettere il confronto dei risultati ottenuti con altri metodi.

Nei riferimenti bibliografici (1) e (3) sono citate varie sostanze di riferimento in grado di coprire un ampio campo di valori della tensione superficiale.

1.4. PRINCIPIO DEI METODI

I metodi si basano sulla misura della massima forza che è necessario esercitare in senso verticale ad una staffa o ad un anello a contatto con la superficie del liquido in esame posto in un recipiente di misura affinché detto liquido si distacchi dalla superficie stessa, ovvero ad una lamina che abbia un bordo a contatto con la superficie suddetta per sollevare la pellicola che si è formata.

Le sostanze che sono solubili in acqua ad una concentrazione di almeno 1 mg/l sono esaminate in soluzione acquosa ad un'unica concentrazione.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

I metodi descritti permettono misure più precise di quanto possa essere necessario per valutazioni di ordine ambientale.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

Si prepara una soluzione della sostanza in acqua distillata. La concentrazione di questa soluzione dovrebbe essere il 90 % del valore corrispondente alla concentrazione di saturazione della sostanza in acqua; quando questa concentrazione supera 1 g/l, si usa per la prova una concentrazione di 1 g/l. Non è necessario eseguire il saggio su sostanze con una solubilità in acqua minore di 1 mg/1.

1.6.1. **Metodo della lamina**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.2. **Metodo della staffa**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.3. **Metodo dell'anello**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.4. **Metodo armonizzato dell'anello secondo l'OCSE**

1.6.4.1. *Apparecchiatura*

I tensiometri reperibili in commercio risultano adeguati a questo tipo di misura. Essi consistono delle parti seguenti:

— tavolo mobile per il campione,

— sistema di misurazione della forza,

— elemento di misura (anello),

— recipienti di misura.

1.6.4.1.1. Tavolo mobile per il campione

Il tavolo mobile per il campione viene usato come piano d'appoggio per il recipiente di misura termostatato contenente la soluzione in esame. Detto tavolo è montato su di un sostegno assieme al sistema di misurazione della forza.

1.6.4.1.2. Sistema di misurazione della forza

Il sistema di misurazione della forza (vedi la figura) è collocato al di sopra del tavolo che sostiene il campione. L'errore nella misura della forza non deve essere maggiore di $\pm 10^{-6}$N, corrispondente ad un limite d'errore di ± 0,1 mg in unità di massa. Nella maggioranza dei casi, la scala di misura dei tensiometri reperibili in commercio è tarata in mN/m, in modo che la tensione superficiale possa essere direttamente letta in mN/m con una incertezza di 0,1 mN/m.

▼B

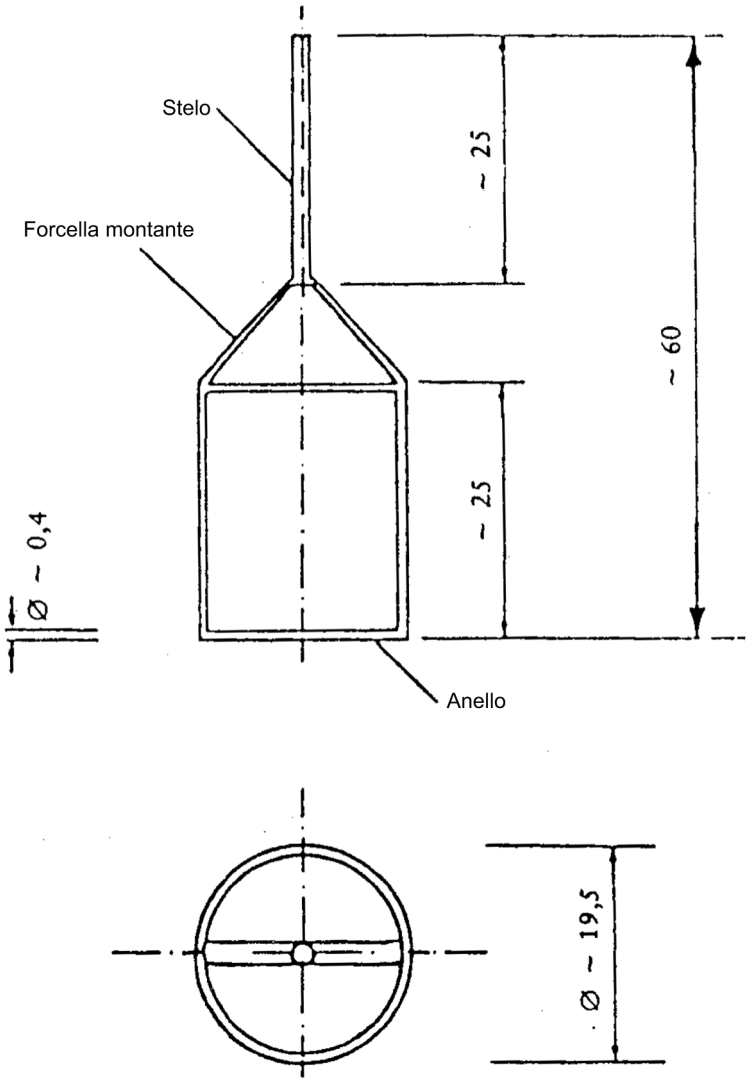
1.6.4.1.3. Elemento di misura (anello)

L'anello è generalmente costituito da un filo di platino-iridio di circa 0,4 mm di spessore ed avente una circonferenza media di 60 mm. L'anello è sospeso orizzontalmente ad uno stelo metallico e ad una forcella di supporto in filo metallico che costituiscono il collegamento con il sistema di misurazione della forza (vedi la figura).

Figura

Elemento di misura

(Tutte le quote sono in mm)



1.6.4.1.4. Recipiente di misura

Il recipiente di misura contenente la soluzione in esame deve essere in vetro e permettere la termostatazione. Esso deve essere progettato in modo che, durante la misura, la temperatura della soluzione liquida in esame e della fase gassosa sovrastante la sua superficie rimanga costante e che il campione non possa evaporare. Sono accettabili recipienti cilindrici in vetro di diametro interno non inferiore a 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Preparazione dell'apparecchiatura*

1.6.4.2.1. Pulizia

I recipienti di vetro devono essere accuratamente puliti. Se necessario, essi vanno lavati con miscela solfo-cromica bollente, poi con acido fosforico sciropposo (dall'83 al 98 % in peso di H_3PO_4), abbondantemente risciacquati con acqua di rubinetto, lavati con acqua bidistillata fino a reazione neutra ed infine asciugati o risciacquati con parte del campione liquido in esame.

L'anello deve essere innanzitutto abbondantemente risciacquato con acqua per eliminare ogni sostanza idrosolubile, poi immerso per breve tempo nella miscela solfo-cromica, lavato con acqua bidistillata fino a reazione neutra ed infine riscaldato brevemente su una fiamma a metanolo.

Nota:

Eventuali sostanze contaminanti che non possano essere disciolte o distrutte dalla miscela solfo-cromica o dall'acido fosforico, come ad esempio siliconi, vanno eliminate mediante un opportuno solvente organico.

1.6.4.2.2. Taratura dell'apparecchio

La convalida dell'apparecchiatura consiste nel controllo del punto di zero e nella regolazione dello strumento in modo che esso permetta determinazioni attendibili in mN/ra.

Montaggio:

La base dell'apparecchio deve essere posta perfettamente in piano, per esempio utilizzando una livella a bolla d'aria e regolando le apposite viti di livellamento.

Azzeramento dell'apparecchio:

Dopo aver montato l'anello sull'apparecchio e prima di immergerlo nel liquido, il tensiometro deve essere azzerato, controllando inoltre il parallelismo dell'anello con la superficie della soluzione. A tale scopo la superficie della soluzione può essere usata come uno specchio.

Taratura:

La taratura può essere effettuata tramite uno dei due procedimenti seguenti:

a) per mezzo di una massa: il procedimento si basa sull'impiego di cavalieri di massa nota compresa tra 0,1 e 1,0 g, da collocare sull'anello. Il fattore di calibrazione Φ_a, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (1):

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

dove:

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

m = massa del cavaliere (in g),

g = accelerazione di gravità (981 $cm.s^{-2}$ al livello del mare),

b = circonferenza dell'anello (in cm),

σ_a = lettura al tensiometro dopo collocamento del cavaliere sull'anello (in mN/m);

▼B

b) per mezzo dell'acqua: il procedimento si basa sull'impiego di acqua pura, la cui tensione superficiale è nota; per esempio, a 23 °C essa è di 72,3 mN/m. Questo metodo è più rapido della taratura con pesi, ma comporta sempre il rischio che la tensione superficiale dell'acqua risulti alterata a causa della contaminazione con tensioattivi in traccia.

Il fattore di taratura Φ_b, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (2):

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

dove:

σ_o = valore riportato in letteratura per la tensione superficiale dell'acqua (in mN/m),

σ_g = valore misurato della tensione superficiale dell'acqua (in mN/m) entrambi riferiti alla stessa temperatura.

1.6.4.3. *Preparazione dei campioni*

Vanno preparate soluzioni acquose delle sostanze da esaminare alle concentrazioni richieste ed in assenza di alcun corpo di fondo.

La soluzione deve essere mantenuta a temperatura costante (± 0,5 °C). Poiché la tensione superficiale di una soluzione nel recipiente di misura varia con il tempo, devono essere effettuate più misure a distanza l'una dall'altra, in modo da poter tracciare un grafico rappresentante le variazioni della tensione superficiale in funzione del tempo. Lo stato di equilibrio si considera raggiunto quando non si riscontrano più variazioni.

La polvere e la contaminazione gassosa ad opera di altre sostanze interferiscono con le misure. Queste devono pertanto essere effettuate sotto una copertura di protezione.

1.6.5. **Condizioni sperimentali**

Le misure vanno eseguite a 20 °C circa con variazioni non superiori a ± 0,5 °C.

1.6.6. **Esecuzione della prova**

Le soluzioni da sottoporre a misura devono essere trasferite nel recipiente di misura accuratamente pulito, avendo cura di evitare la formazione di schiuma, e successivamente il recipiente di misura va collocato sul tavolo dell'apparecchio di prova. Il piano dei tavolo va alzato insieme ai recipiente fino ad immergere l'anello sotto la superficie della soluzione in esame. Il piano del tavolo va poi abbassato gradualmente ed uniformemente (ad una velocità di circa 0,5 cm/min), in modo da staccare l'anello dalla superficie, fino a raggiungere il massimo della forza. Lo strato liquido attaccato all'anello non deve separarsi da esso. Al termine della misura, l'anello va nuovamente immerso sorto la superficie della soluzione ed il procedimento ripetuto finché si ottenga un valore costante della tensione superficiale. In ciascuna determinazione va registrato il tempo trascorso dal trasferimento della soluzione nel recipiente di misura. Le letture devono essere effettuate in corrispondenza dello sforzo massimo necessario per distaccare l'anello dalla superficie del liquido.

▼B

2. **DATI**

Per calcolare la tensione superficiale, il valore in mN/m letto sull'apparecchio va innanzitutto moltiplicato per il fattore di calibrazione Φ_a o Φ_b, (secondo il procedimento di taratura adottato). Si otterrà così un valore approssimativo, che deve essere a sua volta opportunamente corretto.

Harkins e Jordan (4) hanno determinato alcuni fattori di correzione empirici per i valori della tensione superficiale misurata col metodo dell'anello, i quali dipendono dalle dimensioni dell'anello, dalla densità del liquido e dalla sua tensione superficiale.

Poiché la determinazione del fattore di correzione con le tabelle di Harkins e Jordan per ciascuna singola misura di tensione superficiale risulta troppo laboriosa, per le soluzioni acquose può applicarsi un metodo semplificato, consistente nel desumere la tensione superficiale corretta direttamente dalla tabella qui di seguito riportata (per valori compresi tra quelli tabulati si può ricorrere all'interpolazione).

Tabella

Correzione dei valori sperimentali della tensione superficiale

Valida soltanto per soluzioni acquose con p = 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (raggio medio dell'anello).
r	= 0,185 mm (spessore medio del filo metallico).

Valore sperimentale (mN/m)	Valore corretto (mN/m)	
	Taratura con pesi (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera a)	Taratura con acqua (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valore sperimentale (mN/m)	Valore corretto (mN/m)	
	Taratura con pesi (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera a)	Taratura con acqua (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Questa tabella è stata compilata sulla base della correzione secondo Harkins e Jordan, in modo analogo alla norma DIN 53914 per l'acqua e le soluzioni acquose (densità p = 1 g/cm^3) e per anelli reperibili in commercio aventi dimensioni di R = 9,55 mm (raggio medio dell'anello) e r = 0,185 mm (spessore del filo metallico). La tabella fornisce i valori corretti per le misure di tensione superficiale effettuate dopo taratura con pesi o con acqua.

In alternativa, la tensione superficiale può essere calcolata senza taratura preliminare ricorrendo alla formula seguente:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

dove:

F = forza misurata al dinamometro al punto di rottura della pellicola,

R = raggio dell'anello,

f = fattore di correzione (1).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo usato;

— tipo d'acqua o soluzione impiegata;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze);

— risultati delle misure: tensione superficiale (lettura), indicando sia le singole letture e la loro media che la media corretta (tenendo conto del fattore specifico dell'apparecchio e della tabella di correzione);

▼B

— concentrazione della soluzione;

— temperatura di esecuzione delle prove;

— età della soluzione impiegata; in particolare il tempo trascorso tra la preparazione della soluzione e le misure;

— descrizione della variazione della tensione superficiale col tempo dopo il trasferimento della soluzione nel recipiente di misura;

— tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

3.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Considerando che l'acqua distillata ha una tensione superficiale di 72,75 mN/m a 20 °C, le sostanze che presentano una tensione superficiale minore di 60 mN/m nelle condizioni di misura previste da questo metodo devono essere considerate come materiali tensioattivi.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6. **IDROSOLUBILITÀ**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 105 (1995) Questo metodo di prova è una versione riveduta della linea guida originale n. 105 adottata nel 1981. Non vi sono differenze significative tra l'attuale versione e quella del 1981, in quanto è stato modificato soprattutto il formato. La revisione si basa sul metodo di prova dell'UE «Idrosolubilità» ([1]).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

2. L'idrosolubilità di una sostanza può essere considerevolmente alterata dalla presenza di impurità. Il presente metodo di prova riguarda la determinazione dell'idrosolubilità di sostanze fondamentalmente pure che sono stabili in acqua e non volatili. Prima di determinare l'idrosolubilità è utile disporre di alcune informazioni preliminari sulla sostanza in esame, come la formula strutturale, la tensione di vapore, la costante di dissociazione e l'idrolisi in funzione del pH.

3. In questo capitolo sono descritti due metodi: il metodo dell'eluizione su colonna e il metodo del matraccio che riguardano rispettivamente solubilità inferiori e superiori a 10^{-2} g/l. Viene anche descritta una semplice prova preliminare che consente di determinare approssimativamente la quantità adeguata di campione da utilizzare nella prova finale e il tempo necessario per raggiungere la saturazione.

DEFINIZIONI E UNITÀ

4. L'idrosolubilità di una sostanza è la concentrazione massica di saturazione della sostanza in acqua ad una determinata temperatura.

5. L'idrosolubilità è espressa in massa di soluto per volume di soluzione. L'unità SI è kg/m^3 (ma si può anche far uso di g/l).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

6. Per questo metodo non è necessario utilizzare sostanze chimiche di riferimento quando si esamina una sostanza.

DESCRIZIONE DEI METODI

Condizioni sperimentali

7. La prova deve essere preferibilmente effettuata a 20 ± 0,5 ° C, mantenendo costante la temperatura scelta in tutte le parti dell'apparecchiatura.

Prova preliminare

8. Nell'ambito di una procedura in più fasi successive (stepwise), in un cilindro graduato da 10 ml con tappo di vetro vengono versati volumi crescenti di acqua a temperatura ambiente su circa 0,1 g di campione (le sostanze in esame solide devono essere polverizzate). Dopo ciascuna aggiunta di acqua, la miscela viene agitata per 10 minuti e controllata visivamente per verificare la presenza di particelle non disciolte del campione. Se, dopo l'aggiunta di 10 ml d'acqua, il campione, o parte di esso, resta indisciolto, l'esperimento deve essere proseguito in un cilindro graduato da 100 ml. La solubilità approssimativa è indicata nella tabella 1 in corrispondenza

▼M4

del volume d'acqua necessario per ottenere la dissoluzione completa del campione. Quando la solubilità è bassa, può occorrere più tempo per sciogliere la sostanza in esame e si devono prevedere almeno 24 ore. Se dopo 24 ore la sostanza in esame non è ancora disciolta, occorre aspettare più a lungo (fino a 96 ore) o tentare un'ulteriore diluizione per stabilire se occorre utilizzare il metodo di eluizione su colonna o il metodo del matraccio.

Tabella 1

ml di acqua per 0,1 g di campione	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
solubilità approssimativa in g/l	> 1 000	Da 1 000 a 200	Da 200 a 100	Da 100 a 50	Da 50 a 10	Da 10 a 1	< 1

Metodo dell'eluizione su colonna

Principio

9. Questo metodo si basa sull'eluizione della sostanza in esame con acqua in una microcolonna caricata con un materiale di supporto inerte, precedentemente rivestito con un eccesso della sostanza stessa (2). L'idrosolubilità è data dalla concentrazione massica dell'eluato quando questo ha raggiunto un plateau in funzione del tempo.

Apparecchiatura

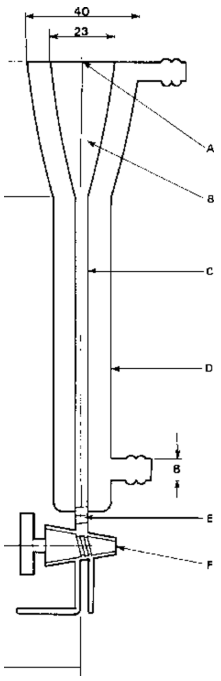
10. L'apparecchiatura è costituita da una microcolonna (figura 1) mantenuta a temperatura costante, collegata ad una pompa di ricircolo (figura 2) o a un recipiente di livellamento (figura 3). La microcolonna contiene un supporto inerte tenuto fermo da un piccolo tampone di lana di vetro che serve anche per filtrare le particelle. Il materiale di supporto può essere costituito da perline di vetro, farina fossile o altri materiali inerti.

11. La microcolonna di cui alla figura 1 è adatta alla configurazione con la pompa di ricircolo. È caratterizzata da uno spazio di testa pari ad almeno cinque volte il volume di letto (eliminato all'inizio dell'esperimento) e il volume di cinque campioni (eliminati dall'analisi nel corso dell'esperimento). In alternativa, le dimensioni possono essere ridotte se è possibile aggiungere acqua nel corso dell'esperimento per sostituire i primi cinque volumi di letto, scartati perché contenenti impurità. La colonna è collegata con giunti in materiale inerte alla pompa di ricircolo, che consente una velocità di flusso pari a circa 25 ml/h. La pompa di ricircolo può essere, ad esempio, una pompa peristaltica o a membrana. Occorre fare in modo che non ci sia contaminazione e/o adsorbimento con il materiale del tubo.

12. La rappresentazione schematica di una configurazione con recipiente di livellamento è riportata nella figura 3. In questa configurazione la microcolonna è munita di un rubinetto ad una via. Il collegamento con il recipiente di livellamento consiste in un giunto di vetro smerigliato e un tubo in materiale inerte. La velocità del flusso proveniente dal recipiente di livellamento deve essere pari a circa 25 ml/h.

▼**M4**

Figura 1



Dimensioni in mm

A. Connessione per giunto di vetro smerigliato

B. Spazio di testa

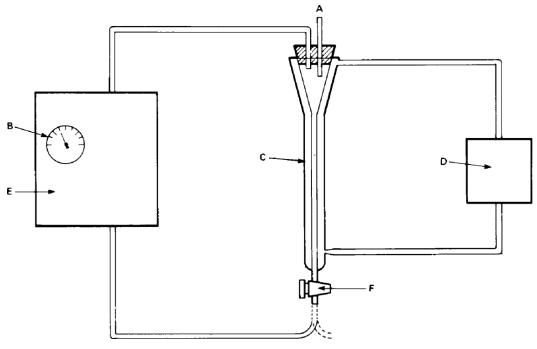
C. Diametro interno 5

D. Diametro esterno 19

E. Tampone di lana di vetro

F. Rubinetto

Figura 2



A. Equilibrio atmosferico

B. Flussimetro

C. Microcolonna

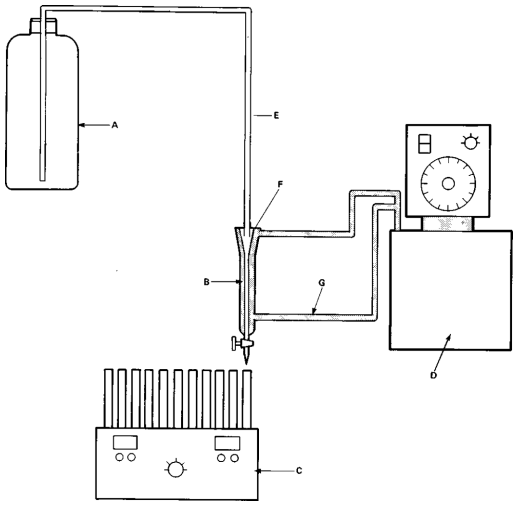
D. Pompa di circolazione termocontrollata

E. Pompa di ricircolo

F. Valvola a due vie per il campionamento

▼M4

Figura 3



A. Recipiente di livellamento (per esempio bottiglia da 2,5 litri)

B. Colonna

C. Collettore di frazione

D. Termostato

E. Tubo in teflon

F. Giunto in vetro smerigliato

G. Tubi per l'acqua (tra il termostato e la colonna, diametro interno 8 mm circa)

13. Circa 600 mg del materiale di supporto sono trasferiti in un matraccio da 50 ml. Una quantità adeguata della sostanza in esame è sciolta in un solvente volatile di purezza analitica e una quantità adeguata di questa soluzione viene aggiunta al materiale di supporto. Il solvente è completamente evaporato, utilizzando ad esempio un evaporatore rotante, perché altrimenti non si ottiene la saturazione dell'acqua del supporto nel corso della fase di eluizione per via della partizione in superficie. Il materiale di supporto così impregnato viene lasciato a bagno per due ore in 5 ml circa di acqua, e quindi la sospensione viene versata nella microcolonna. Altrimenti, si può versare il materiale di supporto impregnato a secco nella microcolonna riempita di acqua lasciando poi il tutto a riposo per due ore per raggiungere l'equilibrio.

14. Il caricamento del materiale di supporto può causare problemi, dando luogo a risultati erronei, se la sostanza di prova si deposita sotto forma di olio. Occorre valutare questi problemi e riportare i dettagli nella relazione.

Procedura con pompa di ricircolo

15. Si avvia il flusso attraverso la colonna. Si raccomanda di usare un flusso di approssimativamente 25 ml/h (che corrisponde a 10 volte il volume di letto della colonna descritta per ora). Per eliminare le impurità solubili in acqua, si devono scartare almeno i primi cinque volumi di letto. Successivamente si attiva la pompa fino al raggiungimento dell'equilibrio, che è dimostrato da cinque campioni successivi, le cui concentrazioni non differiscono tra loro più del ± 30 % in una distribuzione casuale. Questi campionamenti devono essere separati l'uno dall'altro da intervalli di tempo corrispondenti almeno al passaggio di un volume corrispondente a dieci volte il volume di letto della colonna. In funzione del metodo analitico utilizzato, può risultare preferibile stabilire una curva concentrazione/tempo per evidenziare che è stato raggiunto l'equilibrio.

▼M4

Procedura con recipiente di livellamento

16. Vanno prelevate ed analizzate con il metodo prescelto frazioni di eluato successive. Per determinare la solubilità si utilizzano le frazioni provenienti dalla fase centrale di eluizione, dove le concentrazioni sono costanti (con uno scarto masso di ± 30 %) in almeno cinque frazioni consecutive.

17. L'eluente più indicato è l'acqua bidistillata, ma si può utilizzare anche acqua deionizzata, caratterizzata da una resistività superiore a 10 megaohm/cm e un tenore totale di carbonio organico inferiore a 0,01 %.

18. Nell'ambito di entrambe le procedure, l'operazione viene ripetuta una seconda volta dimezzando la velocità di flusso. Se i risultati delle due operazioni concordano, la prova è riuscita. Se la solubilità misurata è superiore con il flusso inferiore, occorre proseguire con il dimezzamento del flusso fino a quando due serie successive non forniscano lo stesso valore di solubilità.

19. Nell'ambito di entrambe le procedure, occorre esaminare le frazioni per controllare la presenza di materiale colloidale mediante l'esame dell'effetto Tyndall. La presenza di particelle invalida la prova che deve essere ripetuta dopo aver migliorato l'azione filtrante della colonna.

20. Occorre misurare il pH di ogni campione, preferibilmente utilizzando cartine indicatrici speciali.

Metodo del matraccio

Principio

21. La sostanza in esame (polverizzata, se solida) è disciolta in acqua a una temperatura leggermente superiore alla temperatura di prova. Quando viene raggiunta la saturazione, la miscela viene raffreddata e mantenuta alla temperatura di prova. In alternativa, la misurazione può essere eseguita direttamente alla temperatura di prova se, mediante un appropriato campionamento, si è sicuri di avere raggiunto l'equilibrio di saturazione. Successivamente, si determina mediante un metodo analitico adeguato la concentrazione massica della sostanza in esame nella soluzione acquosa che non deve contenere particelle indisciolte (3).

Apparecchiatura

22. Occorre il materiale seguente:

— normale strumentazione e vetreria da laboratorio,

— un apparecchio per l'agitazione delle soluzioni a temperatura costante controllata,

— se necessario per le emulsioni, una centrifuga (preferibilmente termostatata), e

— apparecchiatura analitica.

Procedura

23. Sulla base della prova preliminare viene valutata la quantità di sostanza necessaria per saturare il volume di acqua stabilito. Una quantità di sostanza pari a cinque volte la suddetta quantità viene pesata direttamente in tre recipienti di vetro (per esempio, provette da centrifuga, matracci) provvisti di tappi di vetro. In ciascun recipiente viene aggiunto un volume d'acqua, scelto in funzione del metodo analitico e del «range» di solubilità. I recipienti sono chiusi ermeticamente e poi agitati a 30 ° C. Si deve utilizzare un apparecchio di agitazione o di mescolamento che funzioni a temperatura costante, per esempio un agitatore magnetico in un bagnomaria termostatato. Dopo un giorno, uno dei recipienti viene equilibrato per 24 ore alla temperatura di prova, con agitazione saltuaria. Il contenuto del recipiente viene

▼M4

successivamente centrifugato alla temperatura di prova, e viene misurata, con un opportuno metodo analitico, la concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa limpida. Gli altri due matracci vengono trattati in modo analogo dopo un'equilibrazione iniziale a 30 ° C per due e tre giorni, rispettivamente. Se le concentrazioni misurate almeno negli ultimi due recipienti non divergono di più del 15 %, la prova è riuscita. Se invece i risultati relativi ai recipienti 1, 2 e 3 evidenziano una tendenza verso valori crescenti, l'intera prova deve essere ripetuta utilizzando tempi di equilibrazione più lunghi.

24. La prova può essere effettuata anche senza la preincubazione a 30 ° C. Per calcolare la velocità con cui si raggiunge l'equilibrio di saturazione, si prelevano dei campioni fino a quando il tempo di agitazione non influisce più sulle concentrazioni.

25. Occorre misurare il pH di ogni campione, preferibilmente utilizzando cartine indicatrici speciali.

Determinazioni analitiche

26. Per queste determinazioni è preferibile ricorrere a un metodo analitico specifico per la sostanza in esame, poiché piccole quantità di impurità solubili possono causare grandi errori nella misura della solubilità. Esempi di metodi sono: gascromatografia, cromatografia liquida, titolazione, fotometria e voltammetria.

DATI E RELAZIONE

Dati

Metodo dell'eluizione su colonna

27. Per ciascuna serie si deve calcolare il valore medio di almeno cinque campioni consecutivi, prelevati in corrispondenza del plateau di saturazione, nonché la deviazione standard. I valori medi ottenuti in due prove con velocità di flusso diverse non devono divergere di oltre il 30 %.

Metodo del matraccio

28. Occorre calcolare la media dei risultati ottenuti da ognuno dei tre matracci, che tra loro non deve differire di più del 15 %.

Relazione sulla prova

Metodo dell'eluizione su colonna

29. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— risultati della prova preliminare,

— identità chimica e impurità (tappa di purificazione preliminare, se del caso),

— concentrazioni, flussi e pH individuali di ciascun campione,

— medie e deviazioni standard di almeno cinque campioni dal plateau di saturazione per ciascuna serie,

— media di almeno due serie successive,

— temperatura dell'acqua durante il processo di saturazione,

— metodo di analisi utilizzato,

— natura del materiale di supporto,

— impregnazione del materiale di supporto,

— solvente utilizzato,

— indicazione di un'eventuale instabilità chimica della sostanza durante la prova,

— tutte le informazioni attinenti all'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurità e lo stato fisico della sostanza in esame.

▼**M4**

Metodo del matraccio

30. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— risultati della prova preliminare,

— identità chimica e impurità (tappa di purificazione preliminare, se del caso),

— singole determinazioni analitiche e rispettivo valore medio nel caso sia stato determinato più di un valore per ciascun matraccio,

— pH di ciascun campione,

— media dei valori per vari matracci i cui risultati siano concordanti,

— temperatura di prova,

— metodo analitico,

— indicazione di un'eventuale instabilità chimica della sostanza durante la prova,

— tutte le informazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurità e lo stato fisico della sostanza in esame.

BIBLIOGRAFIA

(1) Direttiva 92/69/CEE della Commissione, del 31 luglio 1992, recante diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose (GU L 383 del 29.12.1992, pag. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flaskmethod.

▼B

A.8. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

1. METODO

Il metodo del «dibattimento in pallone» descritto è basato sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. INTRODUZIONE

Per eseguire questa prova è utile disporre di informazioni preliminari sulla formula di struttura, la costante di dissociazione, la solubilità in acqua, l'idrolisi, la solubilità in n-ottanolo e la tensione superficiale della sostanza.

La misura sulle sostanze ionizzabili deve essere eseguita solo nella loro forma non ionizzata (acido libero o base libera), prodotta mediante l'uso di un tampone appropriato con un pH di almeno una unità inferiore (acido libero) o superiore (base libera) al pK.

Questo metodo di prova include due procedure separate — il metodo dell'agitazione in pallone e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Il primo può essere applicato quando il valore di log P_{oa} (per le definizioni si veda più avanti) ricade nel campo da — 2 a 4 e il secondo nel campo da 0 a 6. Prima di eseguire una delle due procedure sperimentali, si deve ricavare una stima preliminare del coefficiente di ripartizione.

Il metodo del dibattimento in pallone vale solo per sostanze essenzialmente pure, solubili in acqua e in n-ottanolo. Non è applicabile a materiali tensioattivi (per i quali si deve fornire un valore calcolato o una stima basata sulle solubilità individuali in n-ottanolo e in acqua).

Il metodo HPLC non è applicabile ad acidi e basi forti, complessi metallici, materiali tensioattivi o sostanze che reagiscono con l'eluente. Per questi materiali, si deve fornire un valore calcolato o una stima basata sulle solubilità individuali in n-ottanolo e acqua.

Il metodo HPLC è meno sensibile alla presenza di impurezze nei composto in esame che non il metodo dell'agitazione in pallone. Tuttavia, in alcuni casi, le impurezze possono rendere difficile l'interpretazione dei risultati perché l'assegnazione dei picchi diventa incerta. Per le miscele che forniscono una banda non risolta, si devono indicare i limiti inferiore e superiore di log P,

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Il coefficiente di ripartizione (P) si definisce come il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio (C_i) di una sostanza disciolta in un sistema costituito da due solventi pressoché immiscibili. Nel caso del n-ottanolo e dell'acqua:

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

Il coefficiente di ripartizione (P) è pertanto il quoziente di due concentrazioni e viene generalmente espresso sotto forma del suo logaritmo decimale (log P).

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Metodo del dibattimento in pallone

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmento per controllare periodicamente l'attendibilità del metodo e per permettere il confronto con risultati ottenuti mediante altri metodi.

Metodo HPLC

Allo scopo di correlare i dati di un composto misurati per HPLC con il suo P, si deve tracciare un grafico di taratura di log P contro i dati cromatografici utilizzando almeno 6 punti di riferimento. Sta all'utilizzatore selezionare le sostanze di riferimento appropriate. Se possibile, almeno un composto di riferimento deve avere un P_{oa} al di sopra di quello della sostanza in esame e un altro un P_{oa} al di sotto di quello della sostanza in esame. Per valori di log P minori di 4, la taratura può essere basata su dati ottenuti mediante il metodo del dibattimento in pallone. Per valori di log P maggiori di 4, la taratura può essere basata su valori di letteratura convalidati, purché siano in accordo con i valori calcolati. Per una migliore accuratezza, è preferibile scegliere composti di riferimento strutturalmente simili alla sostanza in esame.

Sono disponibili elenchi estesi di valori di log P_{oa} per molti gruppi di composti chimici (2) (3). Se non sono disponibili dati di coefficienti di ripartizione di composti strutturalmente simili, si può allora usare una taratura più generale basata su altri composti di riferimento.

In appendice 2 è fornito un elenco di sostanze di riferimento raccomandate e dei loro valori di P_{oa}.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

1.4.1. **Metodo del dibattimento in pallone**

Per determinare il coefficiente di ripartizione è necessario raggiungere l'equilibrio tra tutti i componenti che interagiscono nel sistema, e si devono determinare le concentrazioni delle sostanze disciolte nelle due fasi. Un esame della letteratura sull'argomento indica che si possono utilizzare varie tecniche per risolvere questo problema, cioè l'accurata miscelazione delle due fasi seguita dalla loro separazione per poter determinare la concentrazione all'equilibrio della sostanza in esame.

1.4.2. **Metodo HPLC**

La misura viene eseguita su colonne analitiche impaccate con una fase solida disponibile in commercio contenente idrocarburi a catena lunga (ad esempio C_8, C_{18}) chimicamente legati su silice. I prodotti chimici iniettati su una colonna si muovono lungo di essa a velocità differenti a causa del differente grado di ripartizione tra la fase mobile e la fase stazionaria idrocarbonica. Miscele di composti chimici vengono eluite nell'ordine della loro idrofobicità, dove i composti chimici solubili in acqua sono eluiti per primi e i composti chimici liposolubili per ultimi, in proporzione al loro coefficiente di ripartizione idrocarburo-acqua. Questo permette di stabilire la relazione esistente tra il tempo di ritenzione su tale colonna (a fase inversa) e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua. Il coefficiente di ripartizione viene dedotto dal *fattore di capacità* k, fornito dall'espressione:

▼B

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

in cui t_r = tempo di ritenzione della sostanza in esame e t_o = tempo medio richiesto perché una molecola di solvente passi attraverso la colonna (tempo morto).

Non sono richiesti metodi analitici quantitativi, ed è necessaria solo la determinazione dei tempi di eluizione.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

1.5.1. **Ripetibilità**

Metodo del dibattimento in pallone

Per assicurare l'accuratezza del coefficiente di ripartizione, vanno eseguite determinazioni in doppio in tre diverse condizioni sperimentali, così da poter variare la quantità della sostanza considerata nonché il rapporto tra i volumi dei solventi. I valori determinati per il coefficiente di ripartizione, espressi come logaritmi decimali, devono essere compresi in un intervallo di ± 0,3 unità logaritmiche.

Metodo HPLC

Al fine di aumentare la validità della misura, si devono eseguire determinazioni in doppio. I valori di log P derivati dalle singole misure devono essere compresi in un intervallo di ± 0,1 unità logaritmiche.

1.5.2. **Sensibilità**

Metodo del dibattimento in pallone

L'intervallo di misura del metodo è definito dal limite di rivelabilità del procedimento analitico. Questo deve essere sufficiente per permettere la valutazione dei valori di log P_{oa} nel campo da — 2 a 4 (occasionalmente, quando si verificano le opportune condizioni, questo intervallo può essere esteso ad un log P_{oa} fino a 5) quando la concentrazione del soluto in una delle due fasi non è superiore a 0,01 mol/l.

Metodo HPLC

Il metodo HPLC permette di stimare i coefficienti di ripartizione nel campo di log P_{oa} da 0 a 6.

Normalmente, il coefficiente di ripartizione di un composto può essere stimato entro ± 1 unità logaritmica del valore ottenibile con il metodo del dibattimento in pallone. In letteratura è possibile trovare correlazioni tipiche (4) (5) (6) (7) (8). Un'accuratezza più elevata si può in genere ottenere con grafici di correlazione basati su composti di riferimento di struttura simile (9).

▼B

1.5.3. **Specificità**

Metodo del dibattimento in pallone

La legge di ripartizione di Nernst si applica esclusivamente a soluzioni diluite a temperatura, pressione e pH costanti. Essa è rigorosamente valida solo per una sostanza pura dispersa tra due solventi puri. Qualora in una delle due fasi, od in ambedue, siano presenti più soluti diversi, ciò può alterare i risultati.

La dissociazione o l'associazione delle molecole disciolte portano a deviazioni dalla legge di ripartizione di Nernst. Tali deviazioni sono evidenziate dal fatto che il coefficiente di ripartizione varia in funzione della concentrazione della soluzione.

Dati gli equilibri multipli che hanno luogo, questo metodo non può essere applicato a composti ionizzabili senza ricorrere ad opportuni fattori di correzione. Per tali composti si deve prendere in considerazione l'uso di soluzioni tampone invece di acqua; il pH del tampone deve differire di almeno un'unità di pH dal pKa della sostanza, tenendo presente la significatività di questo pH per l'ambiente.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Stima preliminare del coefficiente di ripartizione**

II coefficiente di ripartizione viene stimato preferibilmente utilizzando un metodo di calcolo (si veda l'appendice 1), o, dove appropriato, dal rapporto delle solubilità della sostanza in esame nei solventi puri (10).

1.6.2. **Metodo del dibattimento in pallone**

1.6.2.1. *Preparazione*

n-ottanolo: la determinazione del coefficiente di ripartizione deve essere eseguita con reattivi per analisi di elevata purezza.

Acqua: va impiegata acqua distillata o bidistillata in apparecchi di vetro o quarzo. Per i composti ionizzabili, si devono usare soluzioni tampone al posto dell'acqua, se giustificato.

Nota:

Non si deve usare acqua prelevata direttamente da uno scambiatore di ioni.

1.6.2.1.1. Presaturazione dei solventi

Prima di determinare il coefficiente di ripartizione, le fasi del sistema di solventi devono essere mutuamente saturate mediante agitazione alla temperatura della determinazione. Per far ciò è vantaggioso agitare per 24 ore con un agitatore meccanico due grandi bottiglie di riserva contenenti rispettivamente n-ottanolo ed acqua, entrambi di grande purezza, addizionati ciascuno di una adeguata quantità dell'altro solvente, e poi lasciate riposare abbastanza a lungo da consentire la separazione delle fasi ed il raggiungimento dello stato di saturazione.

▼B

1.6.2.1.2. Preparazione per la determinazione

L'intero volume del sistema bifasico deve riempire quasi completamente il recipiente di misura. Ciò permetterà di evitare le perdite di materiale per volatilizzazione. I rapporti in volume e le quantità delle sostanze da impiegare devono essere stabilite tenendo conto:

— della valutazione preliminare del coefficiente di ripartizione (si veda sopra),

— della quantità minima di sostanza da esaminare per il procedimento analitico,

— della limitazione della concentrazione ad un massimo di 0,01 mol/l per ognuna delle due fasi.

Si eseguono tre determinazioni. Nella prima, si usa il rapporto in volume calcolato di n-ottanolo ad acqua; nella seconda, questo rapporto viene diviso per due; e nella terza questo rapporto viene moltiplicato per due (ad esempio 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Sostanza da esaminare

Si prepara una soluzione di riserva in n-ottanolo presaturato con acqua. La concentrazione di questa soluzione di riserva deve essere determinata con precisione prima di impiegarla nella determinazione del coefficiente di ripartizione. Questa soluzione deve essere conservata in condizioni che assicurino la sua stabilità.

1.6.2.2. *Condizioni sperimentali*

La temperatura della determinazione deve essere mantenuta costante (± 1 °C) ed essere compresa nell'intervallo 20-25 °C.

1.6.2.3. *Procedimento di misura*

1.6.2.3.1. Raggiungimento dell'equilibrio di ripartizione

Per ciascuna condizione sperimentale si devono preparare in doppio i recipienti contenenti la quantità richiesta dei due solventi, esattamente misurata, insieme all'opportuna quantità della soluzione di riserva.

Le fasi in n-ottanolo devono essere misurate in volume. I recipienti per la determinazione devono essere collocati in un opportuno agitatore o essere agitati manualmente. Un metodo raccomandato è quello di fare ruotare rapidamente di 180° la provetta da centrifuga intorno al suo asse trasversale in modo che l'eventuale aria intrappolata risalga attraverso le due fasi. L'esperienza ha mostrato che 50 rotazioni così effettuate sono in generale sufficienti per raggiungere l'equilibrio di ripartizione. Per sicurezza sono raccomandate 100 rotazioni in 5 minuti.

1.6.2.3.2. Separazioni delle fasi

Quando è necessario, allo scopo di separare le fasi si deve effettuare una centrifugazione della miscela. Ciò dovrebbe essere fatto mediante una centrifuga da laboratorio mantenuta a temperatura ambiente o, se si usa una centrifuga non termostatata, le provette da centrifuga devono essere riequilibrate alla temperatura di determinazione per almeno 1 ora prima dell'analisi.

▼B

1.6.2.4. *Analisi*

Per la determinazione del coefficiente di ripartizione è necessario misurare la concentrazione della sostanza in esame in ambedue le fasi. Ciò può essere fatto prelevando un'aliquota di entrambe le fasi da ciascuna provetta per ciascuna condizione sperimentale ed analizzando ciascuna aliquota mediante il procedimento prescelto. La quantità totale delle sostanze presenti in ambedue le fasi deve essere calcolata e confrontata con la quantità della sostanza inizialmente introdotta.

Il prelievo di un campione della fase acquosa va eseguito con un procedimento che renda minimo il rischio di inclusione di tracce di n-ottanolo; a tal fine si può impiegare una siringa in vetro con ago asportabile. All'inizio, la siringa deve essere parzialmente riempita d'aria. L'aria deve essere espulsa cautamente mentre si inserisce l'ago attraverso lo strato di ottanolo. Si aspira nella siringa un adeguato volume di fase acquosa. Si toglie rapidamente la siringa dalla soluzione e si rimuove l'ago. Il contenuto della siringa può quindi essere impiegato come campione della fase acquosa. La concentrazione nelle due fasi separate va determinata preferibilmente attraverso un metodo specifico per la sostanza. Esempi di determinazioni chimico-fisiche che possono essere adatte sono i seguenti:

— metodi fotometrici,

— gascromatografia,

— cromatografia liquida ad alte prestazioni.

1.6.3. **Metodo HPLC**

1.6.3.1. *Preparazione*

Apparecchiatura

È necessario un cromatografo liquido equipaggiato con pompa esente da pulsazioni e con un adatto dispositivo di rivelazione. Si raccomanda di usare una valvola di iniezione con serbatoi di iniezione. La presenza di gruppi polari nella fase stazionaria può peggiorare gravemente le prestazioni della colonna HPLC. Pertanto, le fasi stazionarie devono contenere una percentuale minima di gruppi polari (11). Si possono usare riempimenti commerciali a fase inversa a microparticelle o colonne preimpaccate. Si può posizionare una colonna di protezione tra il sistema di iniezione e la colonna analitica.

Fase mobile

Per preparare il solvente di eluizione si usano metanolo per HPLC e acqua per HPLC e il solvente viene degassato prima dell'uso. Si deve ricorrere all'eluizione isocratica. Si devono usare rapporti metanolo/-acqua con un contenuto minimo d'acqua del 25 %. Normalmente, una miscela metanolo/acqua 3:1 (v/v) è soddisfacente per eluire composti con log P 6 in un'ora ad una portata di 1 ml/min. Per composti con log P elevato, può essere necessario abbreviare il tempo di eluizione (e quello dei composti di riferimento) diminuendo la polarità della fase mobile oppure la lunghezza della colonna.

Sostanze con solubilità molto bassa in n-ottanolo tendono a fornire dei valori anormalmente bassi di log P_{oa} con il metodo HPLC; i picchi di tali composti accompagnano talvolta il fronte del solvente. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che il processo di ripartizione è troppo lento perché raggiunga l'equilibrio nel tempo normalmente richiesto da una separazione mediante HPLC. Una diminuzione del flusso e/o una diminuzione del rapporto metanolo/acqua può essere efficace per arrivare ad un valore affidabile.

▼B

Il composto in esame e i composti di riferimento devono essere solubili nella fase mobile in concentrazioni sufficienti per permetterne la rivelazione. Solo in casi eccezionali si possono usare degli additivi con la miscela metanolo-acqua perché questi modificano le proprietà della colonna. Per i cromatografi con additivi, è obbligatorio usare una colonna separata dello stesso tipo. Se la miscela metanolo/acqua non è appropriata, si possono usare altre miscele solvente organico/acqua, ad esempio etanolo/acqua o acetonitrile/-acqua.

Il pH dell'eluente è critico per i composti ionizzabili. Esso deve rientrare nel campo operativo di pH della colonna, che di solito è compreso tra 2 e 8. Si raccomanda di tamponare la soluzione. Occorre aver cura di evitare la precipitazione di sali e il deterioramento della colonna che si verificano con alcune miscele di fase organica/-tampone. Le misure mediante HPLC con fasi stazionarie a base di silice al di sopra di pH 8 non sono consigliabili perché l'uso di una fase mobile alcalina può provocare un rapido scadimento delle prestazioni della colonna.

Soluti

I composti di riferimento devono essere i più puri disponibili. I composti da usare a scopo di prova o di taratura devono, se possibile, essere disciolti nella fase mobile.

Condizioni sperimentali

La temperatura durante le misure non deve variare di oltre ± 2 K.

1.6.3.2. **Misure**

Calcolo del tempo morto t_o

Il tempo morto t_o può venire determinato usando o una serie omologa di sostanze (ad esempio n-alchilmetilchetoni) o composti organici non trattenuti (ad esempio tiourea o formammide). Per il calcolo del tempo morto t_o mediante l'uso di una serie omologa, si inietta una successione di almeno 7 elementi di una serie omologa e si determinano i rispettivi tempi di ritenzione. I tempi di ritenzione grezzi $t_{r(nc+1)}$ sono riportati in grafico in funzione di $t_{r(nc)}$, determinano la intercetta a e il coefficiente angolare b della equazione di regressione:

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

(n_c = numero di atomi di carbonio). Il tempo morto $_o$ è rappresentato allora da:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

Grafico di taratura

La fase successiva consiste nella costruzione di un tracciato di correlazione di log k contro log P per appropriati composti di riferimento. Nella pratica, si effettua la determinazione su un gruppo di 5-10 composti standard di riferimento, il cui log P cade nei dintorni dell'intervallo previsto, iniettandoli simultaneamente ed effettuando preferibilmente la determinazione con un registratore integratore collegato al sistema di rivelazione. I logaritmi dei fattori di capacità corrispondenti, log k, vengono calcolati e riportati sul tracciato in funzione del log P determinato mediante il metodo del dibattimento in pallone. La taratura viene eseguita a intervalli regolari ed almeno una volta al giorno, in modo da tenere conto di possibili variazioni delle prestazioni della colonna.

Determinazioni del fattore di capacità della sostanza in esame

La sostanza in esame viene iniettata nella più piccola quantità possibile di fase mobile. Viene determinato il tempo di ritenzione (in doppio) e questo permette il calcolo del fattore di capacità k. Dal grafico di correlazione dei composti di riferimento, si può interpolare il coefficiente di ripartizione della sostanza in esame. Per coefficienti di ripartizione sia molto bassi che molto elevati è necessario ricorrere alla estrapolazione. In tali casi bisogna porre particolare attenzione ai limiti di validità della retta di regressione.

2. **DATI**

Metodo del dibattimento in pallone

L'affidabilità dei valori di P determinati può essere controllata confrontando le medie delle determinazioni in doppio con la media globale.

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— indicazione precisa della sostanza (identità e impurezze),

— quando i metodi non siano applicabili (ad esempio materiale tensioattivo), deve essere fornito un valore calcolato o una stima basata sulle singole solubilità in n-ottanolo e acqua,

— ogni informazione e osservazione significativa per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

Per il metodo del dibattito in pallone:

— il risultato dell'eventuale stima preliminare,

— la temperatura di determinazione,

— i dati sui procedimenti analitici impiegati per determinare le concentrazioni,

— il tempo e la velocità di centrifugazione, se quest'ultima è stata applicata,

▼B

— le concentrazioni misurate in ambedue le fasi per ciascuna determinazione (ciò significa che dovrà essere riportato un totale di 12 concentrazioni),

— il peso della sostanza in esame, il volume di ciascuna fase impiegata in ciascun recipiente di prova e la quantità totale calcolata della sostanza in esame presente in ciascuna fase dopo equilibrazione,

— i valori calcolati per il coefficiente di ripartizione (P), e le medie per ciascuna serie di condizioni sperimentali, nonché la media per tutte le determinazioni. Se esiste il sospetto di una dipendenza dalla concentrazione del coefficiente di ripartizione, ciò va menzionato nella relazione,

— la deviazione standard dei singoli valori di P rispetto alla loro media,

— il valore medio di P risultante da tutte le determinazioni deve pure essere espresso come logaritmo (base 10),

— il valore teorico calcolato per P_{oa} quando esso è stato determinato o quando il valore misurato è $> 10^4$,

— il pH dell'acqua impiegata e della fase acquosa durante l'esperimento,

— se vengono usati dei tamponi, giustificazione del loro uso al posto dell'acqua, composizione, concentrazione, e pH dei tamponi, pH della fase acquosa prima e dopo l'esperimento.

Per il metodo HPLC:

— il risultato dell'eventuale stima preliminare,

— sostanze in esame e di riferimento e loro purezza,

— intervallo di temperatura delle determinazioni,

— pH al quale vengono effettuate le determinazioni,

— dettagli relativi alla colonna analitica e di protezione, alla fase mobile e al dispositivo di rivelazione,

— dati di ritenzione e valori di log P desunti dalla letteratura per i composti di riferimento usati nella taratura,

— dettagli della curva di regressione risultante (log k contro log P),

— dati di ritenzione media e valore interpolato di log P per il composto in esame,

— descrizione dell'apparecchiatura e delle condizioni operative,

— profili di eluizione,

— quantità delle sostanze in esame e di riferimento introdotte nella colonna,

— tempo morto e metodo secondo il quale questo è stato misurato.

▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substiruent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1981, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr, 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liquid, Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houbenm Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/l, 223—339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ, Sci, Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Appendice 1

Metodi di calcolo/stima

INTRODUZIONE

Un'introduzione generale ai metodi di calcolo, dati ed esempi si trova nello Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

I valori calcolati di P_{oa} possono essere usati:

— per decidere quale dei metodi sperimentati sia appropriato (intervallo del metodo di dibattimento in pallone: log P_{oa} da — 2 a 4, intervallo del metodo in HPLC: log P_{oa} da 0 a 6),

— per scegliere le condizioni sperimentali appropriate (ad esempio, sostanze di riferimento per i procedimenti HPLC, rapporto in volume n-ottanolo/acqua per il metodo del dibattimento in pallone),

— come verifica interna di laboratorio per possibili errori sperimentali,

— per ottenere una stima di P_{oa} nei casi in cui i metodi sperimentali non possano essere applicati per ragioni tecniche.

METODO DI STIMA

Stima preliminare del coefficiente di ripartizione

Il valore del coefficiente di ripartizione può essere stimato mediante l'uso delle solubilità della sostanza in esame nei solventi puri: a tale scopo:

$$P_{estimate} = \frac{\text{saturation } c_{n-octanol}}{\text{saturation } c_{water}}$$

METODI DI CALCOLO

Principio dei metodi di calcolo

Tutti i metodi di calcolo sono basati sulla frammentazione formale della molecola in sottostrutture adatte per le quali sono noti incrementi di log P_{oa} affidabili. Il log P_{oa} della molecola intera viene poi calcolato come somma dei valori corrispondenti dei suoi frammenti più la somma di termini di correzione per le interazioni intramolecolari.

Sono disponibili elenchi delle costanti di frammentazione e dei termini di correzione (b) (c) (d) (e). Alcuni di questi vengono regolarmente aggiornati (b).

Criteri di qualità

In generale, l'affidabilità del metodo di calcolo diminuisce al crescere della complessità del composto in esame. Nel caso di molecole semplici di basso peso molecolare e con uno o due gruppi funzionali, ci si può attendere una deviazione da 0,1 a 0,3 unità di log P_{oa} tra i risultati dei metodi di frammentazione e il valore misurato. Nel caso di molecole più complesse, il margine d'errore può essere più grande. Questo dipenderà dall'affidabilità e disponibilità delle costanti dei frammenti, nonché dalla capacità di riconoscere le interazioni intramolecolari (ad esempio i legami idrogeno) e dall'uso corretto dei termini di correzione (problema di non difficile soluzione utilizzando un elaboratore di calcolo e il programma CLOGP-3) (b). Nel caso di composti che si ionizzano, è importante considerare correttamente la carica e il grado di ionizzazione.

▼B

Procedure di calcolo

Metodo del π di Hansch

La costante del sostituente idrofobo originale, π, introdotta da Fujita et al. (f) è definita come:

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

dove P_{oa} (PhX) è il coefficiente di ripartizione di un derivato aromatico e P_{oa} (PhH) quello del composto capostipite

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

Secondo la sua definizione, il metodo del π può essere applicato principalmente per la sostituzione aromatica. Valori di π per un gran numero di sostituenti sono stati tabulati in (b) (c) (d). Essi vengono usati per il calcolo di log P_{oa} di molecole o sottostrutture aromatiche.

Metodo di Rekker

Secondo Rekker (g), il valore di log P_{oa} viene calcolato come segue:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termini di interazione})$$

dove f, rappresenta la costante dei differenti frammenti molecolari e a, la frequenza con cui essi si presentano nella molecola in esame. I termini di correzione possono essere espressi come multiplo intero di una costante singola C_m (la cosiddetta «costante magica»). Le costanti di frammento f_i e C_m sono state ricavate da un elenco di 1 054 valori sperimentali di P_{oa} (825 composti) utilizzando l'analisi di regressione multipla (c) (h). La determinazione dei termini di interazione viene eseguita secondo regole fisse descritte in letteratura (e) (h) (i).

Metodo di Hansch-Leo

Secondo Hansch e Leo (c), il valore di log P_{oa} si calcola dalla relazione:

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

in cui f_i, rappresenta la costante per differenti frammenti molecolari, F_j il termine di correzione e a_i, b_j le corrispondenti frequenze con cui essi si presentano. Una serie di valori di frammenti costituiti da atomi e gruppi e una serie di termini di correzione F_j (i cosiddetti «fattori») sono stati determinati per approssimazioni successive derivandoli da valori sperimentali di P_{oa}. I termini di correzione sono stati ordinati in varie classi (a) (c). E relativamente complicato e lungo tener conto di tutte le regole e dei termini di correzione. Sono stati sviluppati a tale scopo dei pacchetti di programma (b).

Metodo combinato

Il calcolo del log P_{oa} di molecole complesse può venire migliorato considerevolmente se la molecola viene divisa in strutture più semplici per le quali sono disponibili valori affidabili di log P_{oa} ottenuti o da tabelle (b) (c) o da proprie misure. Tali frammenti (ad esempio sostanze eterocidiche, antrachinoni, azobenzene) possono poi venire combinati con i valori di π di Hansch o con le costanti di frammento di Rekker o Leo.

Osservazioni

i) I metodi di calcolo possono essere applicati a composti parzialmente o completamente ionizzati solo quando è possibile tener conto dei necessari fattori di correzione.

▼B

ii) Se si può assumere che vi siano dei legami idrogeno intramolecolari, i corrispondenti termini di correzione (approssimativamente da + 0,6 a + 1,0 unità di log P_{oa}) devono venire aggiunti (a). Indicazioni della presenza di tali legami si possono ottenere da modelli tridimensionali o da dati spettroscopici della molecola.

iii) Se sono possibili varie forme tautomere, sì deve assumere come base di calcolo la forma più probabile.

iv) È opportuno seguire con attenzione le revisioni degli elenchi delle costanti di frammento.

Relazione

Quando si utilizzano metodi di calcolo/stima, la relazione deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— descrizione della sostanza (miscela, impurezze, e così via),

— indicazione di ogni possibile legame idrogeno intramolecolare, dissociazione, carica e altri effetti insoliti (ad esempio tautomeria),

— descrizione del metodo di calcolo,

— identificazione o fornitura della base di dati,

— peculiarità della scelta dei frammenti,

— documentazione completa del calcolo.

BIBLIOGRAFIA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chill. Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1, Elsevier, New York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Appendice 2

Sostanze di riferimento raccomandate per il metodo HPLC

N.	Sostanza di riferimento	log P_{oa}	pKa
1	2-butanone	0,3	
2	4-acetilpiridina	0,5	
3	anilina	0,9	
4	acetanilide	1,0	
5	alcool benzilico	1,1	
6	p-metossifenolo	1,3	pKa = 10,26
7	acido fenossiacetico	1,4	pKa = 3,12
8	fenolo	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenolo	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitrile	1,6	
11	fenilacetonitrile	1,6	
12	alcool 4-metilbenzilico	1,6	
13	acetofenone	1,7	
14	2-nitrofenolo	1,8	pKa = 7,17
15	acido 3-nitrobenzoico	1,8	pKa = 3,47
16	4-cloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzene	1,9	
18	alcool cinnamico	1,9	
19	acido benzoico	1,9	pKa = 4,19
20	p-cresolo	1,9	pKa = 10,17
21	acido cinnamico	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisolo	2,1	
23	metilbenzoato	2,1	
24	benzene	2,1	
25	acido 3-metilbenzoico	2,4	pKa = 4,27
26	4-clorofenolo	2,4	pKa = 9,1
27	tricloroetilene	2,4	
28	atrazina	2,6	
29	etilbenzoato	2,6	
30	2,6-diclorobenzonitrile	2,6	
31	acido 3-clorobenzoico	2,7	pKa = 3,82
32	toluene	2,7	
33	1-naftolo	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-didoroanilina	2,8	
35	clorobenzene	2,8	
36	allilfenil etere	2,9	
37	bromobenzene	3,0	

▼B

N.	Sostanza di riferimento	log P_{oa}	pKa
38	etilbenzene	3,2	
39	benzofenone	3,2	
40	4-fenilfenolo	3,2	pKa = 9,54
41	timolo	3,3	
42	1,4-diclorobenzene	3,4	
43	difenilammina	3,4	pKa = 0,79
44	naftalene	3,6	
45	fenilbenzoato	3,6	
46	isopropilbenzene	3,7	
47	2,4,6-triclorofenolo	3,7	pKa = 6
48	bifenile	4,0	
49	benzilbenzoato	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec.butilfenolo	4,1	
51	1,2,4-triclorobenzene	4,2	
52	acido dodecanoico	4,2	
53	difeniletere	4,2	
54	n-burilbenzene	4,5	
55	fenantrene	4,5	
56	fluorantene	4,7	
57	dibenzile	4,8	
58	2,6-difenilpiridina	4,9	
59	trifenilammina	5,7	
60	DDT	6,2	
	Altre sostanze di riferimento di basso P_{oa}		
1	acido nicotinico	- 0,07	

▼B

A.9. PUNTO D'INFIAMMABILITÀ

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Prima di procedere all'esecuzione della prova sarà utile disporre di informazioni preliminari sulla infiammabilità della sostanza. Il metodo è applicabile a sostanze liquide i cui vapori possono infiammarsi mediante sorgenti di accensione. I metodi sperimentali elencati in questo testo sono affidabili solo per gli intervalli del punto di infiammabilità specificati nei singoli metodi.

Quando si sceglie il metodo da usare, bisogna considerare la possibilità di reazioni chimiche tra la sostanza e il porta campioni.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Il punto di infiammabilità è la temperatura più bassa, corretta alla pressione di 101,325 kPa, alla quale un liquido sviluppa vapori, nelle condizioni definite nel metodo sperimentale, in quantità tali da produrre una miscela vapore/aria infiammabile nel recipiente di prova.

unità: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t in ^{o}C e T in K)

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente la precisione del metodo e per permettere il confronto con risultati ottenuti mediante altri metodi.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza viene posta in un recipiente di prova e riscaldata o raffreddata alla temperatura sperimentale secondo la procedura descritta nei singoli metodi sperimentali. Vengono eseguite delle prove di accensione allo scopo di accertare se il campione si infiamma o non si infiamma alla temperatura di prova.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

1.5.1. **Ripetibilità**

La ripetibilità varia secondo l'intervallo del punto di infiammabilità e secondo il metodo sperimentale usato; massimo 2 ^{o}C.

1.5.2. **Sensibilità**

La sensibilità dipende dal metodo sperimentale applicato.

1.5.3. **Specificità**

La specificità di alcuni metodi sperimentali è limitata a particolari intervalli di punto di infiammabilità e dipende dalle caratteristiche delle sostanze (come ad esempio una elevata viscosità).

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Preparazioni**

Un campione della sostanza in esame viene posto in un apparecchio di prova in conformità a quanto indicato nei punti 1.6.3.1 e/o 1.6.3.2.

Per ragioni di sicurezza, si raccomanda di usare un metodo che utilizzi un campione di piccole dimensioni, circa 2 cm^3, per le sostanze di elevato contenuto energetico o tossiche.

1.6.2. **Condizioni di prova**

L'apparecchio, nei limiti in cui ciò sia in linea con le esigenze di sicurezza, deve essere collocato lontano da correnti d'aria.

1.6.3. **Esecuzione della prova**

1.6.3.1. *Metodo dell'equilibrio*

Vedi norme ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. *Metodo basato sul non equilibrio*

Apparecchio di Abel:

Vedi norme BS 2000, parte 170, NF M07-011 e NF T66-009.

Apparecchio di Abel-Pensky:

Vedi norme EN 57, DIN 51755 — parte 1 — (per temperature comprese tra 5 °C e 65 °C) e DIN 51755 — parte 2 — (per temperature al di sotto di 5 °C), NF M07-036

Apparecchio di Tag:

Vedi norma ASTM D 56.

Apparecchio di Pensky-Martens:

Vedi norme ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 e NF M 07-019.

Osservazioni:

Quando il punto di infiammabilità, determinato mediante un metodo non di equilibrio scelto tra quelli elencati al punto 1.6.3.2, risulta essere pari a 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, o 55 ± 2 °C, occorre confermarlo con un metodo all'equilibrio, utilizzando la stessa apparecchiatura.

Ai fini della notifica possono applicarsi solo i metodi che forniscono la temperatura del punto di infiammabilità.

Per determinare il punto di infiammabilità di liquidi viscosi (vernici, gomme e prodotti analoghi) contenenti solventi, possono impiegarsi soltanto apparecchiature e metodi di prova adatti alla determinazione del punto di infiammabilità di liquidi viscosi.

Vedi norme ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 e DIN 53213, parte 1.

▼B

2. **DATI**

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— la descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze presenti),

— l'indicazione del metodo impiegato e di eventuali deviazioni da esso,

— i risultati e tutte le osservazioni aggiuntive utili ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Nessuna.

▼B

A.10. **INFIAMMABILITÀ (SOLIDI)**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Prima di effettuare la prova sarà utile disporre di informazioni preliminari sulle eventuali proprietà esplosive della sostanza.

La presente prova dovrebbe essere applicata esclusivamente a sostanze in polvere, granulari e pastose.

Evitando di considerare tutte le sostanze capaci di infiammarsi e limitandosi soltanto a quelle che bruciano rapidamente o il cui comportamento alla combustione presenta particolari pericoli di qualsiasi genere, si considerano come facilmente infiammabili soltanto le sostanze la cui velocità di combustione supera un certo valore limite.

Può essere particolarmente pericoloso se l'incandescenza si propaga lungo una polvere metallica a motivo della difficoltà di estinguere l'incendio. Le polveri metalliche sono da considerarsi facilmente infiammabili se sostengono la diffusione dell'incandescenza attraverso la massa entro un tempo specificato.

1.2. DEFINIZIONE E UNITÀ

La velocità di combustione è espressa in secondi.

1.3. COMPOSTI DI RIFERIMENTO

Non specificati.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza viene sagomata in una striscia continua o in una miccia di polvere della lunghezza di circa 250 mm e si esegue una prova preliminare orientativa per determinare se, all'accensione mediante una fiamma gassosa, si verifica la propagazione per combustione con fiamma o senza fiamma. Se entro un tempo specificato si verifica la propagazione su 200 mm della massa di campione, allora si esegue un programma completo di prova per determinare la velocità di combustione.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Non definiti.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Prova preliminare orientativa**

La sostanza viene sagomata in una striscia continua o in una miccia di polvere per una lunghezza di circa 250 mm per 20 mm di larghezza per 10 mm di altezza su una lastra di base non combustibile, non porosa e di bassa conducibilità termica. Ad una estremità della miccia in polvere si applica una fiamma di alta temperatura generata da un bruciatore a gas (diametro minimo 5 mm) fino a che la polvere si accende oppure per un massimo di 2 minuti (5 minuti per polveri di metalli o leghe metalliche). Ciò che deve essere osservato è se la combustione si propaghi per 200 mm della miccia entro un tempo di prova di 4 minuti (o 40 minuti per polveri metalliche). Se la sostanza non si accende e non propaga la combustione bruciando con fiamma o senza fiamma su 200 mm della miccia di polvere entro 4 minuti (o 40 minuti) nel periodo di prova, allora la sostanza non è da considerarsi come facilmente infiammabile e non sono richieste ulteriori prove. Se la sostanza propaga la combustione per un tratto di 200 mm della miccia di polvere in meno di 4 minuti o in meno di 40 minuti per le polveri metalliche, si deve eseguire il procedimento descritto di seguito (punto 1.6.2. e successivi).

1.6.2. **Prova della velocità di combustione**

1.6.2.1. *Preparazione*

Le sostanze in polvere o granulari vengono introdotte in modo sfuso in uno stampo della lunghezza di 250 mm con sezione trasversale triangolare ed altezza interna di 10 mm e larghezza di 20 mm. Su ambedue i lati dello stampo, in senso longitudinale, sono montate due lastrine di metallo, con la funzione di limiti laterali; esse devono sporgere di 2 mm oltre il bordo superiore della sezione triangolare (vedi figura). Lo stampo viene poi lasciato cadere per tre volte su una superficie solida, dall'altezza di 2 cm. Se necessario, lo stampo viene nuovamente riempito. I limiti laterali vengono poi rimossi e la sostanza in eccesso viene asportata. Sopra allo stampo si pone una piastra non combustibile, non porosa e con una bassa conducibilità termica che funge da piastra di base, si rovescia l'apparecchio e si rimuove lo stampo.

Le sostanze pastose sono sparse su una piastra di base non combustibile, non porosa e di bassa conducibilità termica in forma di un cordone della lunghezza di 250 mm con una sezione trasversale di circa 1 cm^2.

1.6.2.2. *Condizioni sperimentali*

Nel caso di una sostanza sensibile all'umidità, la prova deve essere effettuata con la massima rapidità possibile subito dopo aver tolto la sostanza stessa dal recipiente.

1.6.2.3. *Esecuzione della prova*

Disporre il campione nella corrente di una cappa per l'aspirazione dei fumi.

La velocità dell'aria deve essere sufficiente per impedire ai fumi di sfuggire verso il laboratorio e non deve venire modificata durante la prova. L'apparecchio deve essere schermato dalla corrente d'aria.

Per accendere l'ammasso ad una estremità, si utilizza una fiamma calda di un bruciatore a gas (diametro minimo 5 mm). Quando l'ammasso è bruciato per un tratto di 80 mm, si misura la velocità di combustione sui successivi 100 mm.

▼B

L'esperimento viene eseguito sei volte usando ogni volta una piastra pulita e fredda, salvo che si osservi prima un risultato positivo.

2. **DATI**

Il tempo di combustione risultante dalla prova preliminare orientativa (1.6.1) e il minimo tempo di combustione su un massimo di sei prove (1.6.2.3) sono i dati utili ai fini della valutazione.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— l'indicazione esatta della sostanza (identificazione e impurezze),

— una descrizione della sostanza esaminata e dei suo stato fisico, incluso il contenuto di umidità,

— i risultati della prova preliminare orientativa e della prova della velocità di combustione, se eseguita,

— tutte le osservazioni aggiuntive significative ai fini dell'interpretazione dei risultati.

3.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le sostanze in polvere, granulari o pastose sono da considerarsi facilmente infiammabili se il tempo di combustione in una qualunque delle prove eseguite secondo la procedura sperimentale descritta al punto 1.6.2. è minore di 45 secondi. Le polveri di metalli o leghe metalliche sono considerate facilmente infiammabili quando sono suscettibili di accensione e la fiamma o la zona di reazione si propaga sull'intero campione in 10 minuti o meno.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

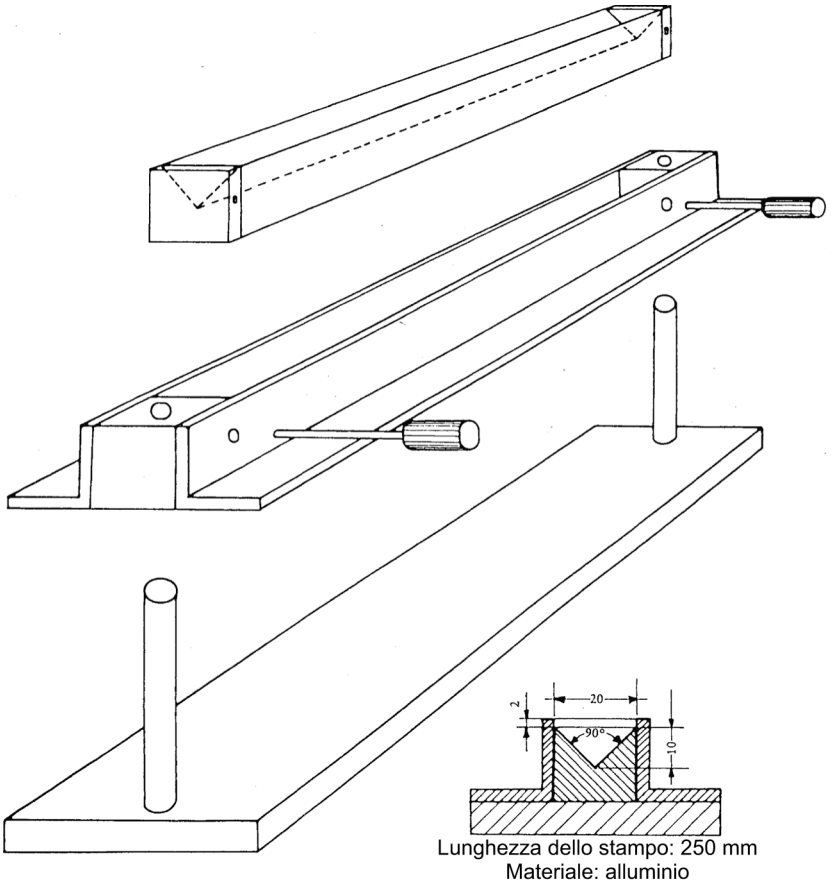
▼B

Appendice

Figura

Stampo e accessori per la preparazione del campione

(Tutte le dimensioni sono espresse in mm)



Lunghezza dello stampo: 250 mm
Materiale: alluminio

▼B

A.11. INFIAMMABILITÀ (GAS)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo permette di determinare se gas miscelati con aria a temperatura ambiente (circa 20 ºC) e pressione atmosferica sono infiammabili e, in tale caso, in quale intervallo di concentrazioni. Miscele a concentrazioni crescenti del gas in esame con l'aria vengono esposte a una scintilla elettrica e si osserva se ha luogo l'accensione.

1.2. DEFINIZIONE E UNITÀ

L'intervallo d'infiammabilità è l'intervallo di concentrazione compreso fra il limite minimo e il limite massimo di esplosione. I limiti minimo e massimo di esplosione sono quei limiti di concentrazione del gas infiammabile in miscela con l'aria ai quali non si verifica la propagazione della fiamma.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non specificate

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La concentrazione del gas nell'aria viene aumentata gradualmente e ad ogni livello di concentrazione la miscela viene esposta ad una scintilla elettrica.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Non stabiliti

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Apparecchiatura**

Il recipiente di prova è costituito da un cilindro verticale di vetro con un diametro interno di almeno 50 mm ed un'altezza di 300 mm. Gli elettrodi di accensione, separati da una distanza di 3-5 mm, sono collocati 60 mm al di sopra del fondo del cilindro. Il cilindro è provvisto di un'apertura per lo sfogo della pressione. L'apparecchio deve essere schermato in modo da limitare gli eventuali danni dovuti ad esplosione.

Come fonte di accensione si impiega una scintilla ad induzione permanente della durata di 0,5 s, generata da un trasformatore ad alto voltaggio con una tensione di uscita compresa fra 10 e 15 kV (potenza massima di entrata: 300 W). Un esempio di un apparecchio adatto è descritto nel riferimento bibliografico (2).

1.6.2. **Condizioni sperimentali**

La prova deve essere eseguita a temperatura ambiente (circa 20 ºC).

▼B

1.6.3. **Esecuzione della prova**

Usando pompe dosatrici, si introduce nel cilindro di vetro una miscela gas/aria di concentrazione nota. Si fa passare una scintilla attraverso la miscela e si osserva se si stacca o no dalla fonte di accensione una fiamma che si propaga indipendentemente. La concentrazione del gas viene variata per incrementi dell'1 % in volume fino a quando si verifica l'accensione sopra descritta.

Se la struttura chimica del gas indica che esso non dovrebbe essere infiammabile e si può calcolare la composizione della miscela stechiometrica con aria, si effettua allora la prova solo su miscele nell'intervallo dal 10 % al di sotto della composizione stechiometrica al 10 % al di sopra di questa composizione in incrementi dell'1 %.

2. **DATI**

La propagazione della fiamma è l'unico fenomeno significativo per la determinazione di questa proprietà.

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— la descrizione esatta della sostanza (identità e impurezze presenti),

— la descrizione dell'apparecchiatura utilizzata con l'indicazione delle dimensioni,

— la temperatura alla quale la prova è stata eseguita,

— le diverse concentrazioni impiegate e i risultati ottenuti,

— il risultato della prova: gas non infiammabile o gas facilmente infiammabile,

— se si conclude che il gas non è infiammabile, si deve allora dichiarare l'intervallo di concentrazioni nel quale esso è stato provato in incrementi dell'1 %;

— tutte le informazioni e osservazioni significative per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) NF T 20-041 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthoid, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126-127.

▼B

A.12. INFIAMMABILITÀ (CONTATTO CON L'ACQUA)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo sperimentale può essere usato per determinare se la reazione di una sostanza con acqua o aria umida porta allo sviluppo di quantità pericolose di gas che possono essere facilmente infiammabili.

Il metodo è applicabile alle sostanze solide e liquide. Questo metodo non è applicabile a sostanze che si infiammano spontaneamente a contatto con l'aria.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Facilmente infiammabili: sostanze che, a contatto con l'acqua o con l'aria umida, sviluppano gas facilmente infiammabili in quantità pericolose ad una velocità minima di 1 l/kg per ora.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza viene saggiata secondo il procedimento per gradi descritto nel seguito; se ad uno qualsiasi dei livelli si verifica l'accensione, non è necessario proseguire nella prova. Se è noto che la sostanza non reagisce violentemente con l'acqua, procedere allora al livello 4 (1.3.4).

1.3.1. **Livello 1**

La sostanza in esame viene versata in un recipiente contenente acqua distillata a 20 °C e si osserva se il gas sviluppato si infiamma o meno.

1.3.2. **Livello 2**

La sostanza in esame viene posta su un foglio di carta da filtro galleggiante sulla superficie di un recipiente contenente acqua distillata a 20 °C e si osserva se il gas sviluppato si infiamma o meno. La carta da filtro ha semplicemente la funzione di evitare la dispersione della sostanza in acqua, aumentando così le possibilità di accensione.

1.3.3. **Livello 3**

La sostanza in esame viene disposta in forma approssimativamente cilindrica di circa 2 cm di altezza e 3 cm di diametro. Si aggiungono alcune gocce di acqua e si osserva se il gas sviluppato si infiamma.

1.3.4. **Livello 4**

La sostanza in esame viene mescolata con acqua distillata a 20 °C e si misura la velocità di sviluppo del gas per un periodo di 7 ore ad intervalli di un'ora. Se la velocità di formazione del gas non è costante, o è ancora in aumento dopo 7 ore, si deve prolungare il tempo di misurazione fino ad un massimo di 5 giorni. La prova può essere sospesa in qualsiasi momento se la velocità di sviluppo del gas supera 1 l/kg per ora.

▼B

1.4. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Non specificata.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Non stabiliti.

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

1.6.1. **Livello 1**

1.6.1.1. *Condizioni di prova*

La prova va eseguita a temperatura ambiente (circa 20 °C).

1.6.1.2. *Esecuzione della prova*

Una piccola quantità (2 mm circa di diametro; della sostanza da esaminare viene posta in un recipiente contenente acqua distillata. Si deve osservare: i) se si ha sviluppo di gas; ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

1.6.2. **Livello 2**

1.6.2.1. *Apparecchiatura*

Un foglio di carta da filtro viene fatto galleggiare sulla superficie di acqua distillata contenuta in un qualsiasi recipiente idoneo, ad esempio una capsula da evaporazione del diametro di 100 mm.

1.6.2.2. *Condizioni di prova*

La prova va eseguita a temperatura ambiente (circa 20 °C).

1.6.2.3. *Esecuzione della prova*

Una piccola quantità della sostanza in esame (2 mm circa di diametro) viene posta al centro del foglio di carta da filtro. Si deve osservare: i) se si ha sviluppo di gas; ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

1.6.3. **Livello 3**

1.6.3.1. *Condizioni di prova*

La prova deve essere eseguita a temperatura ambiente.

1.6.3.2. *Esecuzione della prova*

La sostanza da esaminare viene disposta in forma approssimativamente cilindrica di circa 2 cm d'altezza e 3 cm di diametro, con una leggera concavità sulla cima. Si aggiungono alcune gocce di acqua e si osserva: i) se si ha sviluppo di gas; ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

▼B

1.6.4. **Livello 4**

1.6.4.1. *Apparecchiatura*

L'apparecchiatura viene montata come mostrato in figura.

1.6.4.2. *Condizioni di prova*

Controllare il contenitore della sostanza da esaminare per accertare l'eventuale presenza di polveri al di sotto di 500 μm (dimensioni delle particelle). Se il contenuto in polvere supera l'1 % (p/p) del totale, o se il campione è friabile, tutta la sostanza deve essere ridotta in polvere prima della prova, per tener conto della riduzione di formato delle particelle durante l'immagazzinamento e la manipolazione; in caso contrario, la sostanza deve essere saggiata così come ricevuta. La prova deve essere eseguita a temperatura ambiente (circa 20 ºC) e a pressione atmosferica.

1.6.4.3. *Esecuzione della prova*

Si introducono da 10 a 20 ml d'acqua nel contagocce dell'apparecchiatura e 10 g di sostanza nella beuta. Il volume del gas sviluppato può essere misurato mediante qualsiasi mezzo opportuno. L'imbuto del contagocce viene aperto per immettere l'acqua nella beuta e si avvia un cronometro. Lo sviluppo del gas viene misurato ogni ora per un periodo di 7 ore. Se durante questo periodo lo sviluppo del gas è irregolare o se, al termine di questo periodo, la velocità di sviluppo del gas è in aumento, le misure devono essere continuate fino a 5 giorni. Se in qualunque momento durante la misura la velocità di sviluppo del gas è superiore a 1 l/kg per ora, la prova può essere interrotta. La prova va eseguita in triplo.

Se l'identità chimica del gas è sconosciuta, il gas deve essere analizzato. Quando il gas contiene componenti facilmente infiammabili e non si sa se l'intera miscela sia facilmente infiammabile, si deve preparare e saggiare secondo il metodo A.11 una miscela avente la stessa composizione.

2. **DATI**

La sostanza viene considerata pericolosa se:

— a qualsiasi livello della procedura sperimentale si verifica l'accensione spontanea,

o

— avviene uno sviluppo di gas infiammabile ad una velocità maggiore dì 1 l/kg della sostanza per ora.

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— l'indicazione precisa della sostanza (identificazione e impurezze),

— dettagli dell'eventuale preparazione iniziale della sostanza in esame,

▼B

— i risultati delle prove (livelli 1, 2, 3 e 4),

— l'identità chimica del gas sviluppato,

— la velocità di sviluppo del gas se viene eseguito il livello 4 (1.6.4),

— ogni ulteriore osservazione significativa ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

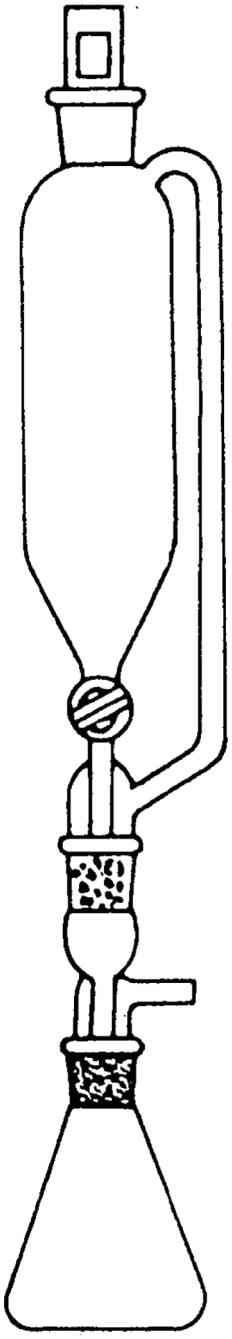
(2) NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Appendice

Figura

Apparecchiatura



▼B

A.13. PROPRIETÀ PIROFORICHE DI SOLIDI E LIQUIDI

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

La procedura sperimentale può essere applicata a sostanze solide o liquide che, in piccole quantità, si accendano spontaneamente poco tempo dopo essere venute in contatto con l'aria a temperatura ambiente (circa 20 ºC).

Questo metodo di prova non considera le sostanze che devono essere esposte all'aria per ore o giorni a temperatura ambiente o a temperature elevate prima che si verifichi l'accensione.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Si considera che una sostanza presenti proprietà piroforiche se si accende o carbonizza nelle condizioni descritte in 1.6.

Può anche essere necessario controllare l'autoinfiammabilità dei liquidi usando il metodo A.15 (Temperatura di autoaccensione liquidi e gas).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non specificate.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza solida o liquida viene aggiunta ad un veicolo inerte e portata in contatto con aria a temperatura ambiente per un periodo di 5 minuti. Se le sostanze liquide non si accendono, esse vengono assorbite su carta da filtro ed esposte all'aria a temperatura ambiente (circa 20 ºC) per 5 minuti. Se un solido o un liquido si infiammano, o se un liquido provoca l'accensione o la carbonizzazione della carta da filtro, la sostanza è considerata piroforica.

1.5. CRITERIO DI QUALITÀ

Ripetibilità: per motivi di sicurezza, un singolo risultato positivo è sufficiente perché la sostanza sia considerata piroforica.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1. **Apparecchiatura**

Una capsula di porcellana del diametro di circa 10 cm viene riempita con farina di diatomee per un'altezza di circa 5 mm a temperatura ambiente (circa 20 ºC).

Nota:

La farina di diatomee, o qualsiasi altra sostanza inerte paragonabile facilmente reperibile, sarà considerata rappresentativa di un suolo su cui può riversarsi, in caso di incidente, la sostanza in esame.

Per l'analisi di liquidi che non si accendono a contatto con l'aria quando siano in contatto con un veicolo inerte, è necessaria carta da filtro asciutta.

▼B

1.6.2. **Esecuzione della prova**

a) *Solidi in polvere*

Da 1 a 2 cm^3 della sostanza in polvere da esaminare vengono versati da un'altezza di circa 1 m su una superficie non combustibile e si osserva se la sostanza si infiamma durante la caduta o entro 5 minuti dopo la caduta.

La prova viene eseguita fino a quando si verifica l'accensione, per un massimo di 6 volte.

b) *Liquidi*

Circa 5 cm^3 del liquido in esame vengono versati nella capsula di porcellana preparata e si osserva se la sostanza si infiamma entro 5 minuti.

Se nelle 6 prove non si verifica accensione, eseguire la prova seguente:

un campione da 0,5 ml viene applicato mediante siringa su una carta da filtro dentellata e si osserva se avviene l'accensione o la carbonizzazione della carta da filtro entro 5 minuti dall'aggiunta del liquido. La prova viene eseguita fino a quando si verifica l'accensione o la carbonizzazione, per un massimo di tre volte.

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

La prova può essere interrotta non appena si verifichi un risultato positivo in una qualunque delle prove.

2.2. VALUTAZIONE

Se la sostanza si accende entro 5 minuti da quando viene aggiunta ad un veicolo inerte ed esposta all'aria, oppure se una sostanza liquida carbonizza o provoca l'accensione di una carta da filtro entro 5 minuti da quando è stata aggiunta ed esposta all'aria, tale sostanza viene considerata piroforica.

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— l'indicazione precisa della sostanza (identificazione e impurezze),

— i risultati delle prove,

— ogni ulteriore osservazione significativa ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. PROPRIETÀ ESPLOSIVE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il metodo fornisce uno schema di prove per determinare se una sostanza solida o pastosa presenti un pericolo di esplosione quando viene sottoposta all'effetto di una fiamma (sensibilità termica) o ad urti o sfregamenti (sensibilità agli stimoli meccanici) e se una sostanza liquida presenti un pericolo di esplosione quando viene sottoposta all'effetto di una fiamma o di un urto.

Il metodo comprende tre parti:

a) una prova di sensibilità termica (1);

b) una prova di sensibilità meccanica relativa agli urti (1);

c) una prova di sensibilità meccanica relativa allo sfregamento (1).

Il metodo fornisce dei dati per valutare la probabilità che certe sollecitazioni comuni possano dar luogo ad una esplosione. Il metodo non è previsto per stabilire se una sostanza sia in grado di esplodere in qualsiasi condizione.

Il metodo è appropriato per determinare se una sostanza presenti un pericolo di esplosione (sensibilità termica e meccanica) nelle particolari condizioni specificate nella direttiva. Questo metodo è basato su un certo numero di tipi di apparecchi ampiamente usati a livello internazionale (1) e che danno normalmente dei risultati significativi. Si riconosce che il metodo non è definitivo. Apparecchi alternativi a quelli specificati possono essere usati purché siano internazionalmente riconosciuti e i risultati possano adeguatamente venire correlati con quelli ricavabili dall'apparecchio specificato.

Non è necessario eseguire le prove quando le informazioni termodinamiche disponibili (ad esempio il calore di formazione, calore di decomposizione) e/o l'assenza di certi gruppi reattivi (2) nella formula di struttura permettano di stabilire al di là di ogni ragionevole dubbio che la sostanza non è soggetta a rapida decomposizione con sviluppo di gas o liberazione di calore (cioè che il materiale non presenta alcun rischio di esplosione). Per i liquidi non è richiesto un saggio di sensibilità allo sfregamento.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Esplosivi:

Sostanze che possono esplodere sotto l'effetto di una fiamma o che sono sensibili agli urti o all'attrito nell'apparecchiatura specificata (o che presentano una sensibilità meccanica maggiore dell'1,3-dinitrobenzene in un apparecchio alternativo).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

1,3-dinitrobenzene tecnico cristallino passante un setaccio da 0,5 mm per il metodo dello sfregamento e dell'urto.

Peridro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX, esogeno, ciclonite — CAS 121-82-4), ricristallizzata da cicloesanone acquoso, setacciata a umido attraverso un setaccio da 250 μm e trattenuta su un setaccio da 150 μm, essiccata a 103 ± 2 ºC (per 4 ore) per la seconda serie di prove di sfregamento e urto.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Per stabilire le condizioni di sicurezza per l'esecuzione delle tre prove di sensibilità sono necessarie delle prove preliminari.

1.4.1. **Prove di sicurezza di manipolazione (3)**

Per ragioni di sicurezza, prima di eseguire le prove principali campioni molto piccoli (circa 10 mg) della sostanza vengono sottoposti a riscaldamento senza restrizioni fisiche in una fiamma gassosa, ad urti in qualunque tipo di apparecchio adatto e allo sfregamento con l'impiego di un mazzuolo contro un incudine o qualsiasi altro tipo di macchina che produca attrito. Obiettivo della prova è di stabilire se la sostanza sia sensibile ed esplosiva in misura tale che le prove di sensibilità prescritte, in particolare quella della sensibilità termica, debbano essere eseguite con precauzioni particolari per evitare danni all'operatore.

1.4.2. **Sensibilità termica**

Il metodo prevede di riscaldare la sostanza in un tubo d'acciaio chiuso con piastre forate di differente diametro del foro per determinare se la sostanza tenda ad esplodere nelle condizioni di intensa sollecitazione termica e delimitazione spaziale definita.

1.4.3. **Sensibilità meccanica (urti)**

Il metodo prevede di sottoporre la sostanza all'urto di una massa specificata lasciata cadere da un'altezza specificata.

1.4.4. **Sensibilità meccanica (sfregamento)**

Il metodo prevede di sottoporre le sostanze solide o pastose ad attrito tra superfici standard in condizioni specificate di carico e movimento relativo.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Non stabiliti.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Sensibilità termica (effetto di una fiamma)**

1.6.1.1. *Apparecchiatura*

L'apparecchiatura è costituita da un tubo d'acciaio non riutilizzabile con il suo dispositivo di chiusura riutilizzabile (figura 1), installato in un dispositivo di riscaldamento e protezione. Ciascun tubo è ottenuto per imbutitura da una lamiera d'acciaio (vedi appendice) e presenta un diametro interno di 24 mm, una lunghezza di 75 mm e uno spessore delle pareti di 0,5 mm. I tubi sono flangiati all'estremità aperta per permetterne la chiusura mediante la piastra forata. Questa è costituita da una piastra forata resistente alle alte pressioni, dotata di un foro centrale, saldamente fissata ad un tubo con un giunto a vite a due parti (dado e collare filettato). Il dado e il collare filettato sono in acciaio al cromo-manganese (vedi appendice) che non genera scintille fino a 800 ºC. Le piastre forate hanno uno spessore di 6 mm, sono in acciaio resistente al calore (vedi appendice) e sono disponibili con aperture di vario diametro.

▼B

1.6.1.2. *Condizioni di prova*

Normalmente la sostanza viene controllata cosi come fornita, benché in certi casi, ad esempio se è pressata, colata o altrimenti condensata, possa essere necessario triturarla prima di esaminarla.

Per i solidi, la massa di materiale da usarsi in ciascuna prova viene determinata secondo un procedimento a secco in due stadi. Un tubo tarato viene riempito con 9 cm^3 di sostanza e la sostanza viene compattata con una forza di 80 N applicata alla sezione trasversale totale del tubo. Per ragioni di sicurezza o nei casi in cui la forma fisica del campione possa essere modificata per compressione, si possono usare differenti procedure di riempimento; ad esempio, se la sostanza è molto sensibile all'attrito la pigiatura non è appropriata. Se il materiale è comprimibile, se ne aggiunge dell'altro e lo si pigia fino a che il tubo è riempito fino a 55 mm dal bordo. Si determina la massa totale usata per riempire il tubo fino al livello di 55 mm e se ne aggiungono due ulteriori aliquote, pigiata ciascuna con una forza di 80 N. Poi, secondo le necessità, si aggiunge ulteriore materiale pigiandolo oppure lo si toglie per lasciare il rubo riempito fino a 15 mm dal bordo. Si esegue una seconda prova a secco partendo con una quantità pigiata pari a un terzo della massa totale trovata nella prima prova a secco. Si aggiungono altre due di queste aliquote pigiandole a 80 N e il livello della sostanza nel tubo viene regolato a 15 mm dal bordo mediante l'aggiunta o la sottrazione di materiale secondo le necessità. La quantità di solido usata in ciascuna prova è quella determinata nella seconda prova a secco; il riempimento viene eseguito in tre quantità uguali, compresse ciascuna a 9 cm^3 con la forza necessaria, qualunque essa sia. (Ciò può essere facilitato mediante l'uso di anelli distanziatori.)

I liquidi e i gel sono caricati nel tubo fino ad un'altezza di 60 mm ponendo particolare attenzione con i gel per impedire la formazione di vuoti. Il collare filettato viene fatto scivolare sul tubo dal basso, si inserisce l'appropriato piatto forato e si serra il dado dopo aver applicato un po' di lubrificante a base di disolfuro di molibdeno. È essenziale controllare che non vi sia sostanza intrappolata tra la flangia e la piastra né nella filettatura.

Per il riscaldamento si utilizza propano prelevato da una bombola industriale dotata di regolatore di pressione (60-70 mbar), passandolo attraverso un manometro e distribuendolo in modo uniforme (come indicato dall'osservazione visiva delle fiamme uscenti dai bruciatori) a 4 bruciatori mediante un collettore. I bruciatori sono disposti intorno alla camera di prova come mostrato in figura 1. I quattro bruciatori hanno un consumo totale di circa 3,2 litri di propano al minuto. È possibile usare gas combustibili e bruciatori alternativi, ma la velocità di riscaldamento deve essere quella specificata in figura 3. Per tutte le apparecchiature, si deve controllare periodicamente la velocità di riscaldamento con l'uso di tubi riempiti di dibutilftalato, come indicato in figura 3.

1.6.1.3. *Esecuzione delle prove*

Ciascuna prova viene eseguita fino a quando il tubo si frammenta o è stato riscaldato per 5 minuti. Una prova che dia come risultato la frammentazione del tubo in tre o più pezzi, che in alcuni casi possono essere collegati uno all'altro da sottili strisce di metallo come è illustrato in figura 2, viene valutata come esplosione. Se una prova dà come risultato un minor numero di frammenti o nessuna frammentazione, si considera che non abbia dato luogo ad esplosione.

▼B

Si esegue inizialmente una serie di tre prove con una piastra con orificio da 6,0 mm di diametro e, se non si ottengono esplosioni, si esegue una seconda serie di tre prove con una piastra avente un orificio del diametro di 2,0 mm. Se avviene un'esplosione durante una delle serie di prova non sono necessarie prove ulteriori.

1.6.1.4. *Valutazione*

II risultato della prova è considerato positivo se si verifica un'esplosione in una delle serie di prove sopra descritte.

1.6.2. **Sensibilità meccanica (urti)**

1.6.2.1. *Apparecchiatura (figura 4)*

Le parti essenziali di una tipica apparecchiatura a martello cadente sono un blocco d'acciaio fuso con base, incudine, colonna, guide, pesi cadenti, dispositivo di rilascio e porta campione. L'incudine d'acciaio da 100 mm di diametro per 70 mm di altezza è avvitata su un blocco d'acciaio da 230 mm di lunghezza per 250 mm di larghezza per 200 mm d'altezza con una base fusa da 450 mm di lunghezza per 450 mm di larghezza per 60 mm d'altezza. Sul retro del blocco d'acciaio è avvitato un sostegno nel quale è fissata una colonna in tubo d'acciaio trafilato senza saldatura. Quattro viti ancorano l'apparecchio ad un blocco massiccio di cemento da 60 × 60 × 60 cm in modo che le guide siano assolutamente verticali e il peso cadente possa cadere liberamente. Per l'uso sono disponibili pesi di acciaio massiccio da 5 e 10 kg. La testa di impatto dei pesi è di acciaio temprato da 60 a 63 HRC e presenta un diametro minimo di 25 mm.

Il campione da esaminare viene posto in un dispositivo per prove d'urto costituito da due cilindri massicci d'acciaio coassiali e sovrapposti in un cilindro cavo d'acciaio che funge da guida. I cilindri d'acciaio massiccio devono avere un diametro di 10 (- 0,003, - 0,005) mm e un'altezza di 10 mm e superfici levigate, spigoli arrotondati (raggio di curvatura 0,5 mm) e una durezza HRC da 58 a 65. Il cilindro cavo deve avere un diametro esterno di 16 mm, un foro levigato di 10 (+ 0,005, + 0,010) mm e un'altezza di 13 mm. Il dispositivo per le prove d'urto è montato su un'incudine intermedia d'acciaio (diametro 26 mm, altezza 26 mm) e centrato mediante un anello con fori di sfogo dei fumi.

1.6.2.2. *Condizioni sperimentali*

Il volume del campione dovrebbe essere di 40 mm^3, o un volume adatto per eventuali apparecchi alternativi. Le sostanze solide dovrebbero essere provate allo stato secco e preparate come segue:

a) le sostanze in polvere sono setacciate (maglie da 0,5 mm); per le prove si usa tutto il materiale passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate vengono rotte in pezzettini e setacciate. Per le prove si usa la frazione di setacciatura compresa tra 0,5 e 1 mm di diametro, e questa deve essere rappresentativa della sostanza originale.

Le sostanze che si presentano normalmente sotto forma di pasta dovrebbero essere saggiate per quanto possibile alla stato secco o comunque dopo aver rimosso la maggior quantità possibile di diluente.

▼B

1.6.2.3. *Esecuzione delle prove*

Si esegue una serie di 6 prove lasciando cadere la massa di 10 kg da 0,40 m (40 J). Se durante le sei prove a 40 J si ottiene un'esplosione, si deve eseguire una serie ulteriore di 6 prove lasciando cadere una massa di 5 kg da 0,15 m (7,5 J). In altri apparecchi, il campione viene confrontato con la sostanza di riferimento scelta usando una procedura di provata validità (ad esempio tecnica «su e giù», ecc.).

1.6.2.4. *Valutazione*

Il risultato della prova viene considerato positivo se si verifica un'esplosione (l'accensione violenta e/o un colpo sono equivalenti a un'esplosione) almeno una volta in qualsiasi delle prove con l'apparecchio per prove d'urto specificato oppure se il campione è più sensibile dello 1,3-dinitrobenzene o della RDX in una prova d'urto alternativa.

1.6.3. **Sensibilità meccanica (attrito)**

1.6.3.1. *Apparecchiatura (figura 5)*

L'apparecchiatura per le prove d'attrito è costituita da una piastra di base d'acciaio fuso sulla quale è montato il dispositivo di sfregamento, costituito da una barra fissa di porcellana con una piastra mobile di porcellana. La piastra di porcellana è tenuta in una slitta che corre su due guide. La slitta è collegata ad un motore elettrico mediante un'asta di collegamento, un eccentrico e una trasmissione adatta perché la piastra di porcellana venga spostata, una sola volta, avanti e indietro sotto la barra di porcellana per un tratto di 10 mm. La barra di porcellana può essere sottoposta ad un carico per esempio di 120 o 360 newton.

Le piastre di porcellana piatte sono fatte di porcellana tecnica bianca (ruvidità da 9 a 32 μm) e hanno le seguenti dimensioni: 25 mm di lunghezza × 25 mm di larghezza × 5 mm di altezza. La barra cilindrica di porcellana è fatta anch'essa di porcellana bianca tecnica ed ha una lunghezza di 15 mm, un diametro di 10 mm e superfici terminali sferiche irruvidite con un raggio di curvatura di 10 mm.

1.6.3.2. *Condizioni sperimentali*

Il volume del campione dovrebbe essere di 10 mm^3 o un volume adatto ad eventuale apparecchio alternativo.

Le sostanze solide sono controllate allo stato secco e preparate come segue:

a) le sostanze in polvere sono setacciate (maglie da 0,5 mm); per la prova si utilizza tutto il materiale passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate vengono rotte in pezzettini e setacciate. La frazione di setacciatura < 0,5 mm viene usata per le prove.

Le sostanze che si presentano normalmente sotto forma di pasta devono essere provate per quanto possibile allo stato secco. Se la sostanza non può essere preparata allo stato secco, la pasta (dopo rimozione della maggior quantità possibile di diluente) viene provata in forma di una pellicola da 0,5 mm di spessore, 2 mm di larghezza e 10 mm di lunghezza preparata con un attrezzo opportuno.

▼B

1.6.3.3. *Esecuzione delle prove*

La base di porcellana viene portata sul campione in esame e si applica il peso. Durante l'esecuzione della prova, la struttura spugnosa superficiale della piastra di porcellana deve giacere trasversalmente rispetto alla direzione di movimento. Bisogna fare attenzione che la barra sia appoggiata sul campione, che vi sia una quantità sufficiente di materiale in esame sotto alla barra e inoltre che la piastra si muova correttamente sotto la barra. Per le sostanze pastose si usa un calibro dello spessore di 0,5 mm con una fessura da 2 × 10 mm per applicare la sostanza alla piastra. La piastra di porcellana deve muoversi 10 mm avanti e indietro sotto alla barra di porcellana in un tempo di 0,44 secondi. Ciascuna parte della superficie della piastra e della barra deve essere usata una sola volta; le due estremità di ciascuna barra serviranno per due prove e le due superfici di una piastra serviranno ciascuna per tre prove.

Si esegue una serie di sei prove con un carico di 360 N. Se in queste sei prove si ottiene un evento positivo, si deve eseguire un'ulteriore serie di sei prove con un carico di 120 N. In altri apparecchi, il campione viene confrontato con la sostanza di riferimento scelta usando una procedura di provata validità (ad esempio tecnica «su e giù», ecc.).

1.6.3.4. *Valutazione*

Il risultato della prova viene considerato positivo se si verifica un'esplosione (crepitio e/o una accensione violenta o una fiammata sono equivalenti ad un'esplosione) almeno una volta in una qualunque delle prove con l'apparecchio di attrito specificato o se soddisfa i criteri equivalenti in una prova di attrito alternativa.

2. **DATI**

In linea di principio, si considera che una sostanza presenti un pericolo di esplosione ai sensi della direttiva se si ottiene un risultato positivo nella prova di sensibilità termica, agli urti o all'attrito.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— identità, composizione, purezza, umidità e così via della sostanza esaminata,

— la forma fisica del campione e se esso sia o no stato macinato, triturato e/o setacciato,

— osservazioni effettuate durante le prove di sensibilità termica (ad esempio massa del campione, numero di frammenti),

— osservazioni eseguite durante le prove di sensibilità meccanica (ad esempio la formazione di quantità considerevoli di fumo o la decomposizione completa senza accensione violenta, fiamme, scintille, crepitii, ecc.),

— risultati di ciascun tipo di prova,

— se è stato usato un apparecchio alternativo, bisogna fornire una giustificazione scientifica e una prova della correlazione tra i risultati ottenuti con l'apparecchio specificato e quelli ottenuti con l'apparecchio equivalente,

▼B

— qualsiasi commento utile, come riferimenti a prove con prodotti simili, che possono essere significativi per una corretta interpretazione dei risultati,

— tutte le osservazioni addizionali significative per l'interpretazione dei risultati.

3.2. INTERPRETAZIONE E VALUTAZIONE DEI RISULTATI

La relazione di prova deve citare gli eventuali risultati considerati falsi, anormali o non rappresentativi. Se qualcuno dei risultati deve essere scartato, deve essere fornita una spiegazione e i risultati di prove alternative o complementari. I risultati anormali, salvo che essi possano venire spiegati, devono essere accettati con i valori sperimentali e usati per classificare conformemente la sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Appendice

Esempi di specifiche dei materiali per la prova di sensibilità termica (vedi DIN 1623)

(1) Tubo: specifica materiali numero 1.0336.505 g

(2) Piastra forata: specifica materiali numero 1.4873

(3) Collare filettato e dado: specifica materiali numero 1.3817

Figura 1

Apparecchio per la prova della sensibilità termica

(quote espresse in millimetri)

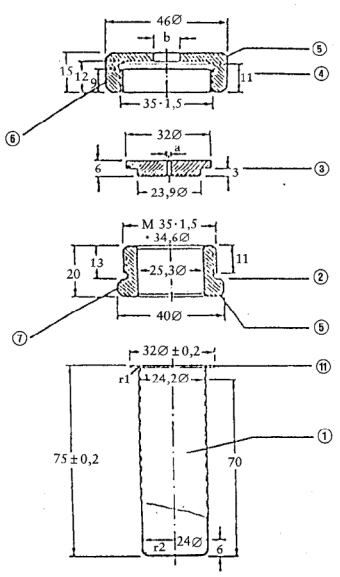


Figura 1a Tubo d'acciaio e accessori

(1) tubo
(1a) flangia esterna
(2) collare filettato: filetto a basso attrito
(3) piastra forata, diametro a = 2,0 o 6,0 mm
(4) dado diametro b = 10 mm
(5) superficie smussata
(6) 2 facce per chiave n. 41

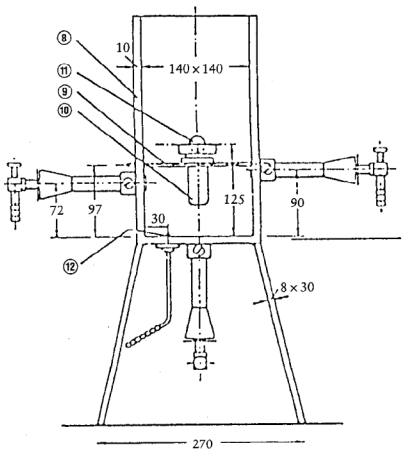


Figura 1b Dispositivo di riscaldamento e protezione

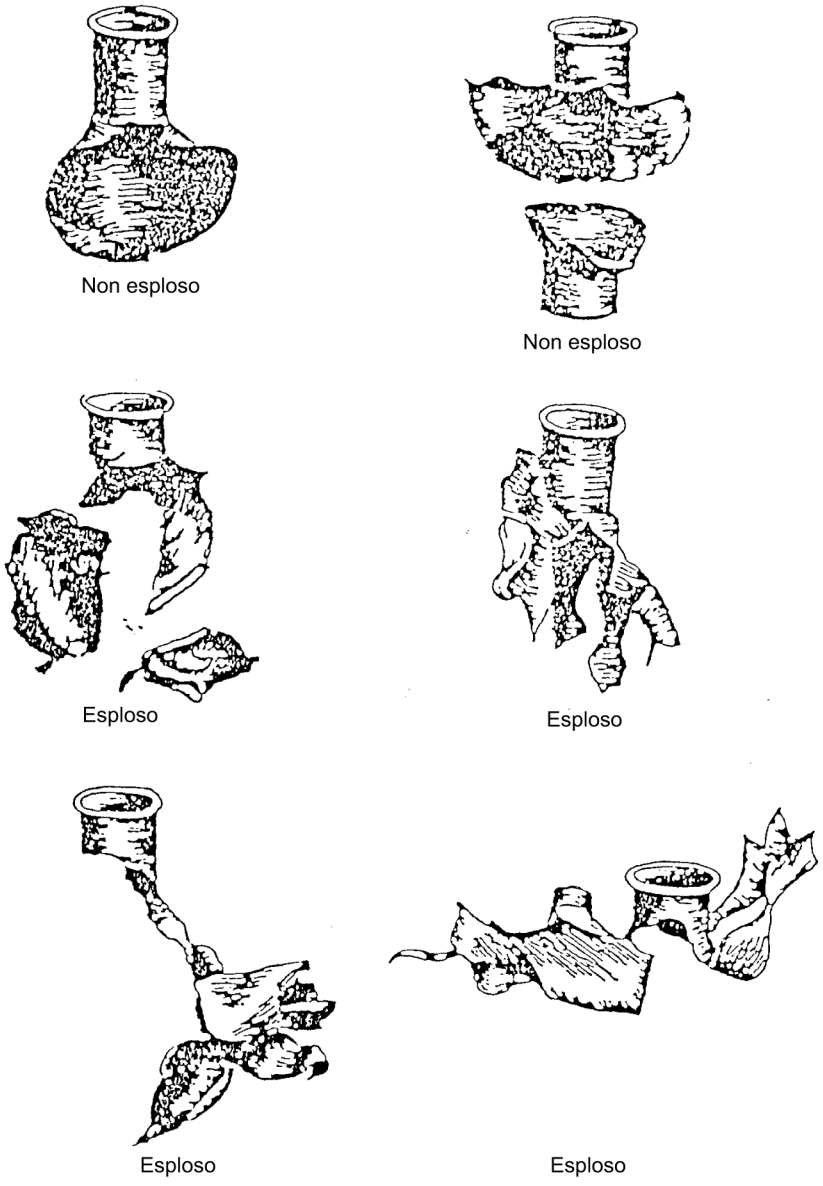
(7) due facce per chiave numero 36
(8) scatola resistente alle schegge
(9) due aste di supporto per il tubo
(10) tubo assemblato
(11) posizione del bruciatore posteriore; gli altri bruciatori sono visibili

▼B

Figura 2

Prova di sensibilità termica

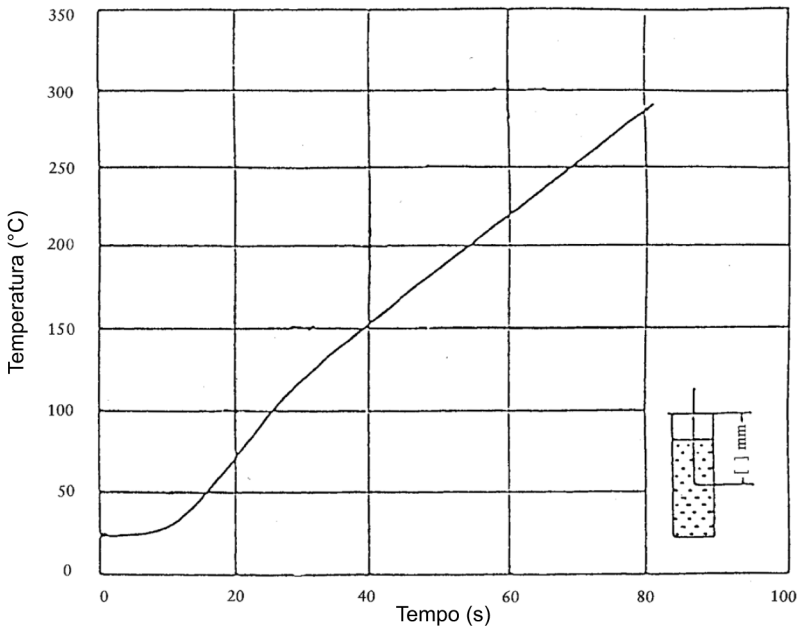
(esempi di frammentazione)



▼B

Figura 3

Taratura della velocità di riscaldamento per la prova di sensibilità termica



Curva temperatura/tempo ottenuta riscaldando dibutilftalato (27 cm^3 in un tubo chiuso (piastra forata da 1,5 mm) con propano ad una portata di 3,2 litri al minuto. La temperatura viene misurata con una termocoppia cromel/alumel con guaina d'acciaio inossidabile del diametro di 1 mm disposta centralmente 43 mm al di sotto del bordo del tubo. La velocità di riscaldamento tra 135 ºC e 285 ºC deve essere compresa tra 185 e 215 K/min.

▼B

Figura 4

Apparecchio per le prove d'urto

(quote espresse in millimetri)

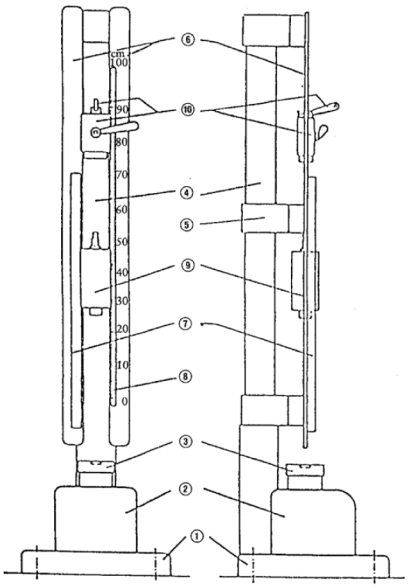


Figura 4a Martello cadente, vista generale frontale e laterale

(1) base, 450 x 450 x 60
(2) blocco d'acciaio, 230 x 250 x 200
(3) incudine, diametro 100 x 70
(4) colonna
(5) traversa mediana
(6) due guide
(7) cremagliera

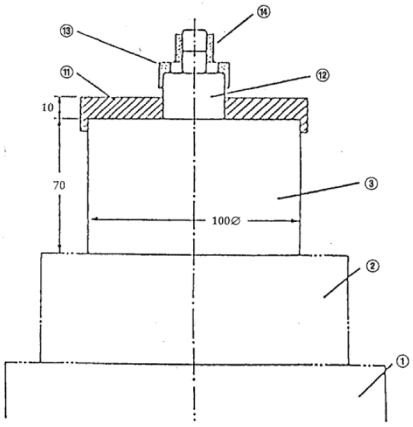


Figura 4b Martello cadente, parte inferiore

(8) scala graduata
(9) martello cadente (massa cadente)
(10) dispositivo di ritenzione e liberazione
(11) piastra di posizionamento
(12) incudine intermedia (sostituibile) diametro 26 x 26
(13) anello di posizionamento con orifici
(14) dispositivo d'urto

▼B

Figura 4

(segue)

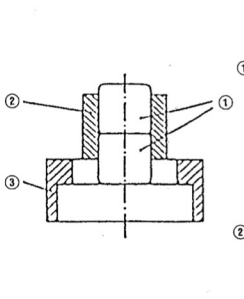


Figura 4c Dispositivo d'urto per sostanze in polvere o in pasta

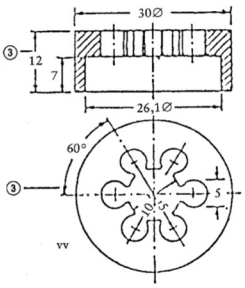
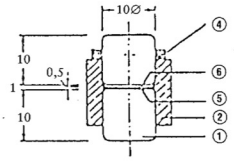


Figura 4d Dispositivo d'urto per sostanze liquide

(1) cilindri d'acciaio
(2) anello di guida per i cilindri d'acciaio
(3) anello di posizionamento con orifici
(a) sezione verticale
(b) pianta
(4) anello di gomma
(5) sostanza liquida (40 mm^3)
(6) spazio libero sopra al liquido



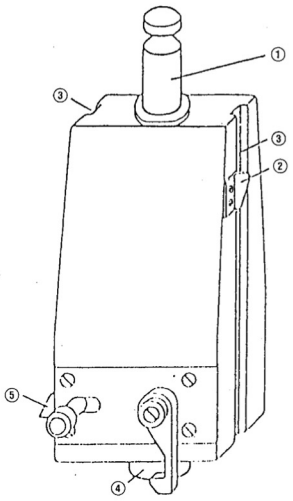


Figura 4e Martello (massa di caduta di 5 kg)

(1) giunto di sospensione
(2) indicatore d'altezza
(3) solco di posizionamento
(4) testa d'urto cilindrica
(5) dente d'arresto

▼B

Figura 5

Apparecchio per la sensibilità all'attrito

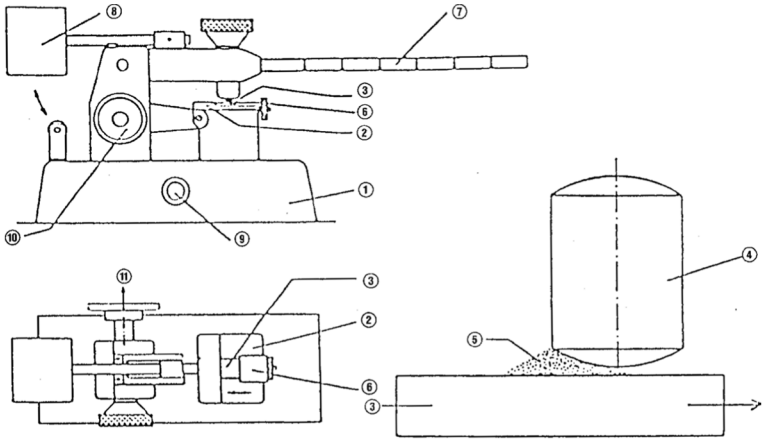


Figura 5a Apparecchio di sfregamento: vista in elevazione e in pianta

(1) base d'acciaio
(2) carrello mobile
(3) piastra di porcellana, 25 x 25 x 5 mm, portata sul carrello
(4) barra di porcellana fissa, diametro 10 x 15 mm
(5) campione in esame, approssimativamente 10 mm [3]

Figura 5b Posizione di partenza della barra sul campione

(6) supporto della barra
(7) braccio di armatura
(8) contrappeso
(9) interruttore
(10) ruota per regolare il carrello nella posizione di partenza
(11) direzione verso il motore elettrico

▼B

A.15. **TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE (LIQUIDI E GAS)**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

A questa prova non devono essere sottoposte le sostanze esplosive e le sostanze che si accendono spontaneamente a contatto con l'aria a temperatura ambiente. La procedura d'esame è applicabile a gas, liquidi e vapori che in presenza dell'aria possono essere infiammati da una superficie calda.

La temperatura di autoaccensione può essere ridotta considerevolmente dalla presenza di impurezze catalitiche, dal materiale della superficie o da un maggiore volume del recipiente di prova.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Il grado di autoinfiammabilità è espresso in termini di temperature di autoaccensione. La temperatura di autoaccensione è la temperatura minima alla quale la sostanza in esame si infiamma quando sia miscelata con aria nelle condizioni definite nel metodo di prova.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Le sostanze di riferimento sono citate nelle norme (vedi 1.6.3). Queste sostanze servono principalmente per verificare periodicamente la precisione del metodo e per permettere il confronto coi risultati ottenuti mediante altri metodi.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo determina la temperatura minima della superficie interna di un recipiente chiuso che da luogo all'accensione di un gas, vapore o liquido iniettato nel recipiente chiuso.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La ripetibilità varia secondo l'intervallo delle temperature di autoaccensione e il metodo di prova usato.

La sensibilità e la specificità dipendono dal metodo di prova utilizzato.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Apparecchiatura**

L'apparecchiatura è descritta nel metodo di cui al punto 1.6.3.

1.6.2. **Condizioni di prova**

Un campione della sostanza in esame viene saggiato in conformità al metodo di cui al punto 1.6.3.

1.6.3. **Esecuzione della prova**

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

▼B

2. **DATI**

Registrare la temperatura di prova, la pressione atmosferica, la quantità di campione usato e l'intervallo di tempo dopo il quale si verifica l'accensione.

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— l'indicazione precisa della sostanza (identificazione e impurezze),

— la quantità di campione usato, la pressione atmosferica,

— l'apparecchiatura usata,

— i risultati delle misure (temperature di prova, risultati relativi all'accensione, e corrispondenti ritardi temporali),

— tutte le osservazioni aggiuntive significative per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Nessuna.

▼B

A.16. **TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE RELATIVA DEI SOLIDI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Non devono essere sottoposte a questa prova le sostanze esplosive e le sostanze che si infiammano spontaneamente a contatto con l'aria a temperatura ambiente.

Lo scopo della prova è di fornire informazioni preliminari sull'autoinfiammabilità di sostanze solide a temperature elevate.

Se il calore sviluppato dalla reazione della sostanza con l'ossigeno o dalla sua decomposizione esotermica non viene ceduto con sufficiente rapidità all'ambiente circostante, si ha un autoriscaldamento che porta all'autoaccensione. L'autoaccensione si verifica quindi quando la velocità di produzione di calore supera quella della sua dispersione.

Il procedimento è utile come saggio preliminare per le sostanze solide. Data la complessità dei processi di accensione e di combustione dei solidi, la temperatura di autoaccensione determinata con questo metodo deve essere utilizzata soltanto a scopo di confronto.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

La temperatura di autoaccensione ottenuta secondo il presente metodo è la minima temperatura, espressa in ºC, alla quale un dato volume di una sostanza si infiamma in determinate condizioni.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

In un forno a temperatura ambiente viene posto un certo volume della sostanza da esaminare; si registra la curva temperatura/tempo relativa alle condizioni esistenti al centro del campione mentre la temperatura del forno viene aumentata fino a 400 ºC o fino al punto di fusione, se inferiore, ad una velocità di 0,5 ºC/min. Ai fini di questa prova, la temperatura del forno alla quale la temperatura del campione raggiunge i 400 ºC per autoriscaldamento è detta temperatura di autoaccensione.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Apparecchiatura**

1.6.1.1. *Forno*

Forno da laboratorio a temperatura programmata (volume circa 2 litri) con circolazione d'aria naturale e sfogo per esplosioni. Per evitare un rischio potenziale di esplosione, si deve impedire che eventuali gas di decomposizione vengano in contatto con gli elementi riscaldanti elettrici.

▼B

1.6.1.2. *Cubo di rete metallica*

Ritagliare un pezzo di rete d'acciaio inossidabile con luce di 0,045 mm secondo il modello della figura 1. Piegare la rete e fissarla con filo metallico in forma di cubi con la faccia superiore aperta.

1.6.1.3. *Termocoppie*

Termocoppie adatte.

1.6.1.4. *Registratore*

Qualsiasi registratore a due canali tarato da 0 a 600 ºC o tensione corrispondente.

1.6.2. **Condizioni di prova**

Le sostanze vengono sottoposte a prova nella forma in cui vengono ricevute.

1.6.3. **Esecuzione della prova**

Il cubo viene riempito con la sostanza da esaminare e battuto leggermente, aggiungendo ulteriore sostanza fino a quando è completamente pieno. Il cubo viene poi sospeso al centro del forno a temperatura ambiente. Una termocoppia viene posta al centro del cubo e l'altra tra il cubo e la parete del forno per registrare la temperatura del forno.

Le temperature del forno e del campione vengono registrate in continuo mentre la temperatura del forno viene aumentata fino a 400 ºC o fino al punto di fusione, se inferiore, ad una velocità di 0,5 ºC/min.

Quando la sostanza si infiamma, la temperatura del campione presenterà un aumento brusco della temperatura al di sopra di quella del forno.

2. **DATI**

Rilevante ai fini della valutazione è la temperatura del forno alla quale la temperatura del campione raggiunge i 400 ºC per autoriscaldamento (vedi figura 2).

3. **RELAZIONE**

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— descrizione della sostanza in esame,

— risultati delle misure, inclusa la curva temperatura/tempo,

— tutte le osservazioni aggiuntive significative per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

▼B

Figura 1

Sviluppo di un cubo di prova da 20 mm

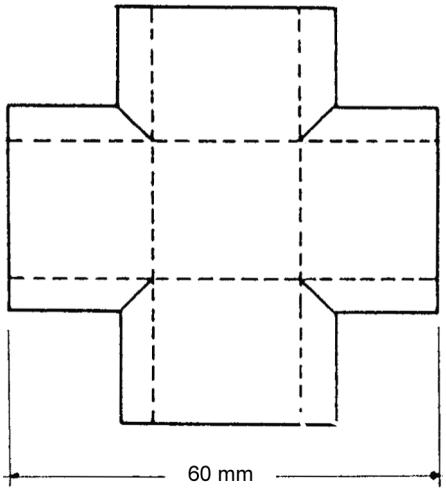
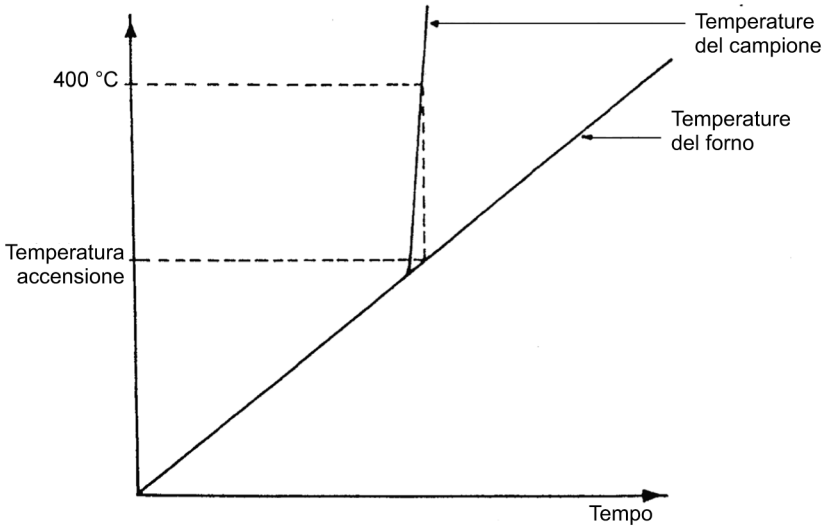


Figura 2

Curva tipica temperatura/tempo



▼B

A.17. PROPRIETÀ OSSIDANTI (SOLIDI)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

È utile avere informazioni preliminari sulle potenziali proprietà esplosive della sostanza prima di effettuare la prova.

Questa prova non si applica ai liquidi e ai gas, alle sostanze esplosive o altamente infiammabili, e ai perossidi organici.

Non occorre eseguire questa prova quando l'esame delle formule di struttura stabilisce, al di là di ogni ragionevole dubbio, che la sostanza non è suscettibile di reagire esotermicamente con materiale combustibile.

Per appurare se la prova debba essere condotta con precauzioni particolari, è opportuno effettuare un test preliminare.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Tempo di combustione: tempo di reazione, in secondi, riferito allo spostamento della zona di reazione lungo il cumulo, seguendo la procedura descritta nel punto 1.6.

Velocità di combustione: espressa in mm/s.

Velocità di combustione massima: il valore più elevato della velocità di combustione ottenuto con miscele contenenti dal 10 % al 90 %, in peso, di ossidante.

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Per la prova e per la prova preliminare si usa il nitrato di bario (grado analitico) come sostanza di riferimento.

La miscela di riferimento è costituita da una miscela di nitrato di bario e di polvere di cellulosa, preparata secondo il punto 1.6, che presenta la massima velocità di combustione (di solito una miscela con il 60 % in peso di nitrato di bario).

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Per sicurezza si esegue una prova preliminare. Quando la prova preliminare indica chiaramente che la sostanza in esame presenta proprietà ossidanti, non sono necessarie prove ulteriori. Quando ciò non si verifica, la sostanza deve essere sottoposta alla prova completa.

Nella prova completa, la sostanza da esaminare e una sostanza combustibile definita vengono miscelate in vari rapporti. Si formano altrettanti cumuli con le varie miscele e si procede all'accensione di un'estremità di ognuno di essi. La velocità massima determinata viene poi confrontata con la velocità massima di combustione di una miscela di riferimento.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Qualsiasi metodo di macinazione e mescolamento è valido a condizione che la differenza fra le velocità massime di combustione in ciascuna delle 6 prove non differisca dal valore della media aritmetica di oltre il 10 %.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Preparazione**

1.6.1.1. *Sostanza in esame*

Ridurre il campione da esaminare ad una granulometria < 0,125 mm usando la seguente procedura: setacciare la sostanza di prova, macinare la frazione rimanente, ripetere la procedura fino a quando tutta la porzione di prova è passata dal setaccio.

Per la macinatura e la setacciatura si può usare qualsiasi apparecchio che soddisfi i criteri di qualità.

Prima di preparare la miscela, la sostanza viene essiccata a 105 ºC fino a peso costante. Se la temperatura di decomposizione della sostanza da esaminare è inferiore a 105 ºC, la sostanza deve essere essiccata ad una temperatura opportunamente inferiore.

1.6.1.2. *Sostanza combustibile.*

Come sostanza combustibile si usa la cellulosa in polvere del tipo impiegato per la cromatografia a strato sortile o in colonna. È risultato idoneo un tipo di cellulosa con fibre di lunghezza compresa per l'85 % tra 0,020 mm e 0,075 mm. La polvere di cellulosa viene fatta passare attraverso un setaccio a maglia da 0,125 mm. Per tutta la prova deve essere usata la stessa partita di cellulosa.

Prima di preparare la miscela, la cellulosa in polvere deve essere essiccata a 105 ºC fino a peso costante.

Se nella prova preliminare si usa farina di legno, preparare farina di legno dolce raccogliendo la porzione che passa attraverso un setaccio da 1,6 mm, miscelare accuratamente e poi essiccare a 105 ºC per 4 ore in uno strato di spessore non superiore a 25 mm. Raffreddare e conservare in un contenitore a tenuta d'aria riempito il più possibile fino a quando serva, preferibilmente entro 24 ore dall'essiccazione.

1.6.1.3. *Fonte di ignizione*

Come fonte di ignizione si dovrebbe usare una fiamma calda di un bruciatore a gas (diametro minimo 5 mm). Se si usa un'altra fonte di ignizione (ad esempio quando si effettua la prova in atmosfera inerte), devono essere riportate la descrizione e la giustificazione.

1.6.2. **Esecuzione della prova**

Nota:

Le miscele di ossidanti con cellulosa o farina di legno devono essere trattate come potenzialmente esplosive e maneggiate con la dovuta attenzione.

1.6.2.1. *Prova preliminare*

La sostanza essiccata viene accuratamente miscelata con cellulosa o farina di legno essiccata nel rapporto 2 parti di sostanza in esame/1 parte di cellulosa o farina di legno (in peso) e la miscela viene ammucchiata in forma di un piccolo cono con un diametro di base di 3,5 cm × 2,5 d'altezza, riempiendo, senza compattazione, un recipiente di forma conica, (ad esempio un imbuto da laboratorio con il gambo tappato).

▼B

Il mucchietto viene posto su una piastra di base fredda, non combustibile, non porosa e di bassa conducibilità termica. La prova deve essere eseguita sotto cappa di aspirazione dei fumi come indicato al punto 1.6.2.2.

La sorgente di ignizione viene posta in contatto con il cono, e si osservano e registrano il vigore e la durata della reazione risultante.

La sostanza deve essere considerata ossidante se la reazione è vigorosa.

Nei casi in cui il risultato sia dubbio, è necessario completare l'intera sequenza di prova descritta di seguito.

1.6.2.2. *Prova sequenziale*

Preparare miscele ossidante/cellulosa contenenti dal 10 al 90 % in peso di ossidante in incrementi del 10 %. Per i casi limite, usare miscele ossidante/cellulosa intermedie per ottenere con maggior precisione la massima velocità di combustione.

Il mucchietto viene formato mediante uno stampo di metallo, che presenta una lunghezza di 250 mm e una sezione trasversale triangolare con altezza interna di 10 mm e larghezza interna di 20 mm. Su ambedue i lati dello stampo, nella direzione longitudinale, sono montate due lastre metalliche come limitazioni laterali che sporgono di 2 mm sopra al bordo superiore della sezione triangolare (figura). Questo dispositivo viene riempito con un leggero eccesso di miscela. Dopo aver lasciato cadere una volta lo stampo da un'altezza di 2 cm su una superficie solida, la sostanza in eccesso rimanente viene rimossa con un foglio disposto obliquamente. Le delimitazioni laterali vengono rimosse e la polvere rimanente viene lisciata con l'uso di un rullo. Sopra allo stampo si pone poi una piastra di base non combustibile, non porosa, e di bassa conducibilità termica, l'apparecchio viene invertito e lo stampo rimosso.

Disporre il mucchietto nella corrente d'aria in una cappa.

La velocità dell'aria deve essere sufficiente per impedire ai fumi di propagarsi nel laboratorio e non deve venire variata durante la prova. Intorno all'apparecchio deve essere montato uno schermo per la corrente.

Data l'igroscopicità della cellulosa e di alcune sostanze da esaminare, la prova deve essere eseguita più velocemente possibile.

Accendere un'estremità del cumulo toccandolo con la fiamma.

Misurare il tempo di reazione su una distanza di 200 mm dopo che la zona di reazione si è propagata per una distanza iniziale di 30 mm.

La prova viene eseguita con la sostanza di riferimento e almeno una volta con ciascuna miscela di sostanze di prova e cellulosa della serie.

Se si trova che la velocità massima di combustione è significativamente maggiore di quella della miscela di riferimento, la prova può essere interrotta. Altrimenti la prova deve essere ripetuta 5 volte per ciascuna delle 3 miscele che danno la velocità di combustione più elevata.

▼B

Se si sospetta che il risultato sia un falso positivo, ripetere la prova usando una sostanza inerte con granulometria simile, come farina fossile, al posto della cellulosa. In alternativa, la miscela sostanza in esame/cellulosa che presenta la velocità di combustione più elevata deve essere ricontrollata in atmosfera inerte (contenuto d'ossigeno < 2 % v/v).

2. **DATI**

Per ragioni di sicurezza, deve essere considerato come caratteristica della proprietà ossidante della sostanza in prova il valore massimo della velocità di combustione e non il valore medio.

Ai fini della valutazione si prende in considerazione il più alto valore della velocità di combustione rilevato su una serie di 6 prove su una determinata miscela.

Riportare in grafico il valore più elevato di velocità di combustione per ciascuna miscela contro la concentrazione dell'ossidante. Ricavare dal grafico la velocità massima di combustione.

I sei valori di velocità di combustione misurati in una prova effettuata sulla miscela che presenta la più elevata velocità di combustione non devono differire dalla loro media aritmetica per oltre il 10 %; altrimenti deve essere migliorato il metodo di macinatura e miscelazione.

Confrontare la velocità di combustione massima ottenuta con la massima velocità di combustione della miscela di riferimento (vedi 1.3.).

Se le prove vengono condotte in atmosfera inerte, la velocità di reazione massima viene confrontata con quella della miscela di riferimento in atmosfera inerte.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— l'identità, composizione, purezza, umidità ecc. della sostanza esaminata,

— eventuali trattamenti del campione in esame (per esempio macinatura, essiccazione, ecc.),

— la fonte di ignizione usata nelle prove,

— i risultati delle misure,

— la modalità di reazione (per esempio fiammata superficiale, combustione attraverso l'intera massa, eventuali informazioni relative ai prodotti di combustione, ecc),

— ogni osservazione aggiuntiva significativa per l'interpretazione dei risultati, inclusa una descrizione del vigore (la miscela arde, produce scintille, esala fumi, brucia senza fiamma, ecc.) e la durata approssimata prodotta nella prova preliminare di sicurezza/vagliatura per la sostanza in esame e la sostanza di riferimento,

— i risultati delle prove eventuali con sostanze inerti,

— i risultati delle prove eventuali in atmosfera inerte.

▼B

3.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una sostanza è considerata come ossidante quando:

a) nella prova preliminare c'è una reazione vigorosa;

b) nella prova, la velocità massima di combustione delle miscele analizzate è maggiore o uguale alla velocità di combustione della miscela di cellulosa e di nitrato di bario.

Al fine di evitare un falso positivo, i risultati ottenuti nella prova della sostanza miscelata con un materiale inerte e/o sotto atmosfera inerte devono essere tenuti in considerazione nell'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

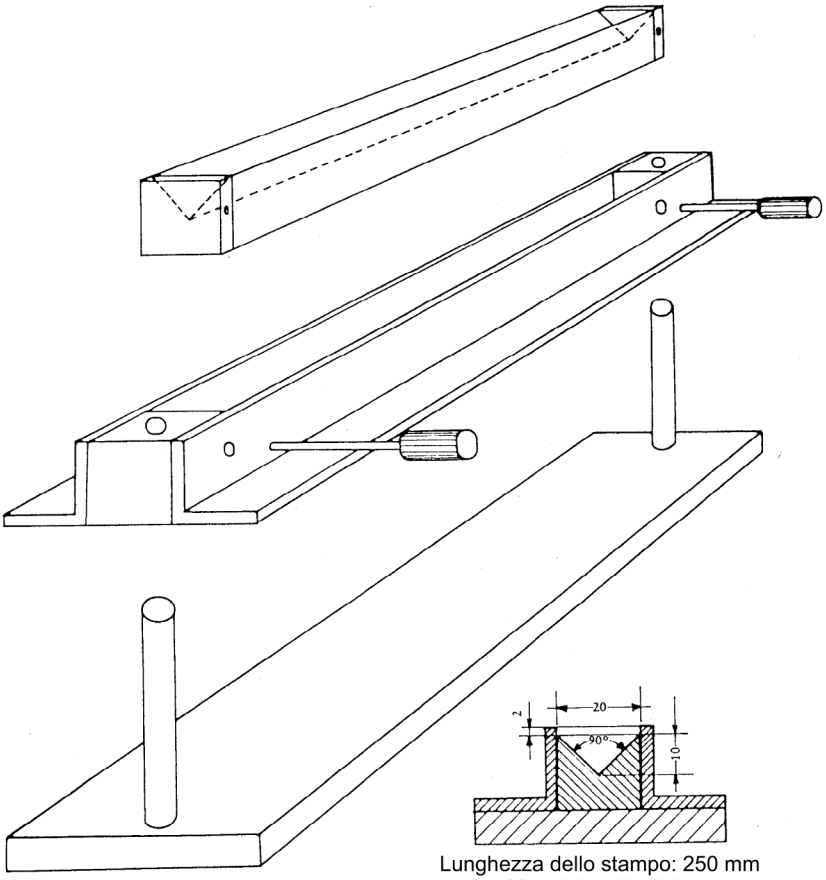
▼B

Appendice

Figura

Stampo e accessori per la preparazione del campione

(Tutte le dimensioni sono espresse in mm)



Lunghezza dello stampo: 250 mm
Materiale: alluminio

▼B

A.18. **PESO MOLECOLARE MEDIO NUMERICO E DISTRIBUZIONE DEL PESO MOLECOLARE DI POLIMERI**

1. **METODO**

Il presente metodo cromatografico a permeazione di gel corrisponde al metodo OCSE TG 118 (1996). I principi fondamentali e ulteriori informazioni tecniche sono riportati nel riferimento bibliografico (1).

1.1. INTRODUZIONE

Data la varietà delle proprietà dei polimeri, è impossibile descrivere un singolo metodo che definisca con precisione condizioni di separazione e di valutazione tali da coprire tutte le particolarità e specificità che si incontrano nella separazione di polimeri. In particolare, sistemi di polimeri complessi spesso non sono adatti alla cromatografia a permeazione di gel (GPC). Quando non si può ricorrere alla GPC, il peso molecolare può venire determinato mediante altri metodi (vedi allegato). In tali casi, fornire ampi dettagli e la motivazione del metodo usato.

Il metodo descritto è basato sulla norma DIN 55672 (1), nella quale si trovano informazioni dettagliate su come eseguire gli esperimenti e valutare i dati. Nel caso siano necessarie modifiche delle condizioni sperimentali, queste modifiche devono essere motivate. Si possono usare altre norme purché fornite con riferimenti completi. Il metodo descritto ricorre a campioni di polistirene di polidispersità nota per la taratura e può richiedere modifiche per adeguarlo a certi polimeri, per esempio polimeri solubili in acqua e ramificati a catena lunga.

1.2. DEFINIZIONE E UNITÀ

Il peso molecolare medio numerico M_n e il peso molecolare medio ponderale M_w vengono determinati con le seguenti equazioni.

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

in cui

H_i è il livello del segnale del rivelatore relativo alla linea di base per il volume di ritenzione V_i,

M_i è il peso molecolare della frazione di polimero in corrispondenza del volume di ritenzione V_i, e

n è il numero di punti.

L'ampiezza della distribuzione del peso molecolare, che è una misura della dispersità del sistema, è data dal rapporto M_w/M_n.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Poiché la GPC è un metodo relativo, è necessaria una taratura. A questo scopo vengono di norma utilizzati standard di polistirene a struttura lineare con pesi molecolari medi M_n e M_w noti e distribuzione nota del peso molecolare. La curva di taratura può venire usata nella determinazione del peso molecolare del campione sconosciuto solo se le condizioni scelte per la separazione del campione e degli standard sono identiche.

Una determinata relazione tra il peso molecolare e il volume di eluizione è valida solo nelle specìfiche condizioni del particolare esperimento. Queste condizioni includono soprattutto la temperatura, il solvente (o miscele di solventi), le condizioni cromatografiche e la colonna e il sistema di colonne di separazione.

I pesi molecolari del campione determinati in questo modo sono valori relativi e sono descritti come «pesi molecolari equivalenti in polistirene». Questo significa che, secondo le differenze strutturali e chimiche tra il campione e gli standard, i pesi molecolari possono deviare dai valori assoluti in misura più o meno grande. Se si usano altri standard, per esempio polietilenglicole, polietilenossido, polimetil-metacrilato, acido poliacrilico, indicarne la ragione.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI ANALISI

Utilizzando la GPC, si possono determinare sia la distribuzione del peso molecolare del campione che i pesi molecolari medi (M_n, M_w). La GPC è un particolare tipo di cromatografia liquida in cui il campione viene separato in base ai volumi idrodinamici dei singoli costituenti (2).

La separazione viene effettuata mentre il campione passa attraverso una colonna riempita di un materiale poroso, tipicamente un gel organico. Le molecole piccole possono penetrare nei pori, mentre le molecole grandi ne sono escluse. Il percorso delle molecole grandi è pertanto più breve e queste vengono eluite per prime. Le molecole di medie dimensioni penetrano in alcuni dei pori e vengono eluite più tardi. Le molecole più piccole, con un raggio idrodinamico più piccolo dei pori del gel, possono penetrare in tutti i pori. Queste vengono eluite per ultime.

In una situazione ideale, la separazione è determinata unicamente dalla dimensione delle specie molecolari, ma in pratica è difficile evitare l'interferenza di almeno qualche effetto di assorbimento. Un riempimento disuniforme della colonna e volumi morti possono peggiorare la situazione (2).

La rivelazione viene effettuata per esempio mediante l'indice di diffrazione o l'assorbimento nell'UV e fornisce una curva di distribuzione semplice. Tuttavia, per attribuire valori effettivi di peso molecolare alla curva, è necessario tarare la colonna facendo passare attraverso di essa polimeri di peso molecolare noto, possibilmente anche di struttura approssimativamente simile, per esempio vari standard di polistirene. Tipicamente si ottiene una curva gaussiana, talvolta distorta con una piccola coda verso il lato dei pesi molecolari bassi, in cui l'asse verticale indica la quantità in peso delle specie di vario peso molecolare eluite e l'asse orizzontale indica il logaritmo del peso molecolare.

▼B

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La ripetibilità (deviazione standard relativa — Relative Standard Deviation: RSD) de! volume di eluizione dovrebbe essere migliore dello 0,3 %. Se un cromatogramma viene valutato in funzione del tempo e non corrisponde al criterio succitato, la ripetibilità di analisi richiesta deve essere garantita mediante correzione attraverso uno standard interno (1). Le polidispersità dipendono dal peso molecolare degli standard. Nel caso degli standard di polistirene valori tipici sono:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p è il peso molecolare dello standard in corrispondenza del massimo del picco)

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI ANALISI

1.6.1. **Preparazione delle soluzioni di polistirene standard**

Gli standard di polistirene vengono sciolti mediante accurata miscelazione nell'eluente scelto. Nella preparazione delle soluzioni tener conto delle raccomandazioni del produttore.

La scelta delle concentrazioni degli standard dipende da vari fattori, per esempio il volume di iniezione, la viscosità della soluzione e la sensibilità del rivelatore analitico. Il volume massimo di iniezione deve essere adeguato alla lunghezza della colonna allo scopo di evitare un sovraccarico. Volumi di iniezione tipici per separazioni analitiche con la GPC su una colonna da 30 cm × 7,8 mm sono normalmente compresi tra 40 e 100 µl. Sono possibili volumi più elevati, ma non devono superare i 250 µl. Il rapporto ottimale tra il volume di iniezione e la concentrazione va determinato prima dell'effettiva taratura della colonna.

1.6.2. **Preparazione della soluzione campione**

In linea di principio, per la preparazione delle soluzioni campione valgono gli stessi requisiti. Il campione viene sciolto in un solvente adatto, per esempio, tetraidrofurano (THF), mediante un accurato sbattimento. In nessun caso deve essere sciolto utilizzando un bagno ad ultrasuoni. Se necessario, la soluzione campione viene purificata su un filtro a membrana con dimensione dei pori compresa tra 0,2 e 2 µm.

Nella relazione finale deve essere registrata l'eventuale presenza di particelle indisciolte perché queste possono essere dovute a specie di peso molecolare elevato. Usare un metodo appropriato per determinare la percentuale in peso delle particelle indisciolte. Utilizzare le soluzioni entro 24 ore.

1.6.3. **Apparecchiature**

— serbatoio del solvente,

— degasatore (se del caso),

— pompa,

▼B

— ammortizzatore di pulsazioni (se del caso),

— sistema di iniezione,

— colonne per cromatografia,

— rivelatore,

— flussimetro (se del caso),

— registratore-elaboratore dati,

— recipiente di scarico.

Assicurarsi che il sistema GPC sia inerte rispetto ai solventi utilizzati (p. es. mediante l'uso di capillari d'acciaio se come solvente si usa il THF).

1.6.4. **Sistema di iniezione e di erogazione del solvente**

Caricare nella colonna un volume definito della soluzione campione utilizzando un autocampionatore oppure manualmente in una zona nettamente definita. Nel caso di una operazione manuale, se lo stantuffo della siringa viene tirato o spinto troppo rapidamente la distribuzione dei pesi molecolari osservata può variare. Nei limiti del possibile il sistema di erogazione del solvente deve essere esente da pulsazioni e l'ideale sarebbe che vi fosse incorporato un attenuatore delle pulsazioni. La portata è dell'ordine di 1 ml/min.

1.6.5. **Colonna**

Secondo il campione, il polimero viene caratterizzato utilizzando una colonna semplice o più colonne collegate in serie. In commercio sono disponibili vari materiali porosi per colonne con proprietà (p. es. dimensione dei pori, limiti di esclusione) definite. La scelta del gel di separazione o della lunghezza della colonna dipende sia dalle proprietà del campione (volumi idrodinamici, distribuzione dei pesi molecolari) che dalle specifiche condizioni di separazione come il solvente, la temperatura e la portata (1) (2) (3).

1.6.6. **Piatti teorici**

La colonna o la combinazione di colonne utilizzata per la separazione deve essere caratterizzata mediante il numero di piatti teorici. Questo, nel caso venga utilizzato il THF come solvente di eluizione, implica di caricare una soluzione di etilbenzene o altro adatto soluto apolare su una colonna di lunghezza nota. Il numero di piatti teorici è dato dall'equazione seguente:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

in cui

N è = il numero di piatti teorici

V_c è = il volume di eluizione al massimo del picco

▼B

W è = la larghezza del picco alla linea di base

$W_{1/2}$ è = la larghezza del picco a mezza altezza.

1.6.7. **Efficienza di separazione**

Oltre al numero di piatti teorici, che è una quantità che determina l'ampiezza della banda, è importante anche l'efficienza di separazione, che è determinata dalla rapidità della curva di taratura. L'efficienza di separazione di una colonna si ottiene dalla seguente relazione:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

in cui

$V_{e.Mx}$ è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare M_x

$V_{e(10Mx)}$ = è il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare dieci volte maggiore.

La risoluzione del sistema è definita in generale come segue:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

in cui,

V_{e1}, V_{e2} = sono i volumi di eluizione dei due standard di polistirene al massimo del picco

W_1, W_2 = sono le larghezze del picco alla linea di base

M_1, M_2, = sono i pesi molecolari al massimo del picco (dovrebbero differire di un fattore 10)

Il valore di R del sistema di colonne deve essere maggiore di 1,7 (4).

1.6.8. **Solventi**

Tutti i solventi devono essere di purezza elevata (per il THF si utilizza una purezza del 99,5 %). Il serbatoio del solvente (se necessario sotto atmosfera di gas inerte) deve essere sufficientemente grande per la taratura della colonna e per l'analisi di parecchi campioni. Degasare il solvente prima di trasportarlo alla colonna mediante la pompa.

1.6.9. **Controllo della temperatura**

La temperatura dei componenti interni critici (ansa di iniezione, colonne, rivelatore e tubature) deve essere costante e coerente con il solvente scelto.

▼B

1.6.10. **Rivelatore**

La funzione del rivelatore è di registrare quantitativamente la concentrazione del campione eluito dalla colonna. Per evitare un inutile allargamento dei picchi, il volume della cuvetta della celia del rivelatore deve essere il più piccolo possibile. Salvo per rivelatori a diffrazione della luce e rivelatori di viscosità, questo volume non deve superare i 10 µl. Il metodo di solito utilizzato per la rivelazione è la rifrattometria differenziale. Tuttavia, se richiesto dalle proprietà specifiche del campione o del solvente di eluizione, si possono utilizzare altri tipi di rivelatori, per esempio UV/VIS, IR, rivelatori viscosimetrici, ecc.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

Fare riferimento alla norma DIN (1) per i criteri di valutazione dettagliati e per i requisiti di raccolta ed elaborazione dei dati.

Per ciascun campione eseguire due esperimenti indipendenti, che dovranno venire analizzati singolarmente.

Per ogni misura si devono ottenere i valori di M_n, M_w, M_w/M_n e M_p. È necessario indicare esplicitamente che i valori misurati sono valori relativi equivalenti al peso molecolare dello standard usato.

Dopo la determinazione dei volumi di ritenzione o dei tempi di ritenzione (possibilmente corretti usando uno standard interno), i valori di log M_p (M_p sono i massimi dei picchi dello standard di taratura) vengono riportati contro una delle suddette quantità. Per ogni decade di peso molecolare sono necessari almeno due punti di taratura e per la curva totale sono richiesti almeno cinque punti di misura, che devono coprire il peso molecolare stimato del campione. L'estremità della curva di taratura corrispondente al basso peso molecolare è definita da n-esilbenzene o altro soluto apolare adatto. I pesi molecolari medi numerico e ponderale vengono in generale determinati mediante sistemi elettronici di elaborazione dati sulla base delle formule riportate nella sezione 1.2. Se si utilizza una digitalizzazione manuale, si può consultare il metodo ASTM D 3536-91 (3).

La curva di distribuzione deve essere fornita come tabella o come figura (frequenza differenziale o sommatoria delle percentuali contro log M). Nella rappresentazione grafica, una decade di peso molecolare deve avere normalmente una larghezza di circa 4 cm e il massimo del picco deve avere un'altezza di circa 8 cm. Nel caso di curve di distribuzione integrali la differenza in ordinata tra lo 0 e il 100 % deve essere di circa 10 cm.

2.2. RELAZIONE D'ANALISI

La relazione d'analisi deve includere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza in esame:**

— informazioni disponibili sulla sostanza in esame (identità, additivi, impurezze),

▼B

— descrizione del trattamento del campione, osservazioni, problemi.

2.2.2. **Strumentazione:**

— serbatoio dell'eluente, gas inerte, degasaggio dell'eluente, composizione dell'eluente, impurezze,

— pompa, attenuatore di pulsazioni, sistema di iniezione,

— colonne di separazione (fabbricante, tutte le informazioni sulle caratteristiche delle colonne, come dimensione dei pori, tipo di materiale di separazione ecc, numero, lunghezza e ordine delle colonne usate),

— numero di piatti teorici della colonna (o combinazione di colonne), efficienza di separazione (risoluzione del sistema),

— informazioni sulla simmetria dei picchi,

— temperatura della colonna, tipo di controllo della temperatura,

— rivelatore (principio di misurazione, tipo, volume della cuvetta),

— flussimetro se usato (produttore, principio di misurazione),

— sistema di registrazione ed elaborazione dati (hardware e software).

2.2.3. **Taratura del sistema:**

— descrizione dettagliata del metodo usato per costruire la curva di taratura,

— informazioni sui criteri di qualità per questo metodo (p. es. coefficiente di correlazione, varianza ecc),

— informazioni su tutte le estrapolazioni, ipotesi e approssimazioni fatte durante la procedura sperimentale e durante la valutazione e l'elaborazione dei dati,

— tutte le misure usate per costruire la curva di taratura devono essere documentate in una tabella includente le seguenti informazioni per ciascun punto di taratura:

  — nome del campione,

  — produttore del campione,

  — valori caratteristici degli standard M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , forniti dal produttore o ricavati da misure successive, insieme con dettagli relativi al metodo di determinazione,

  — volume di iniezione e concentrazione di iniezione,

▼B

— valore di M_p usato per la taratura,

— volume di eluizione o tempo di ritenzione corretto misurato in corrispondenza del massimo dei picchi,

— M_p calcolato al massimo del picco,

— errore percentuale dell' M_p calcolato e del valore di taratura.

2.2.4. **Valutazione:**

— valutazione su base temporale: metodi usati per garantire la riproducibilità richiesta (metodo di correzione, standard interno ecc),

— indicazione se la valutazione sia stata effettuata sulla base del volume di eluizione o del tempo di ritenzione,

— informazioni riguardo ai limiti della valutazione se un picco non viene analizzato completamente,

— descrizione dei metodi di lisciatura, se usati,

— procedure di preparazione e pretrattamento del campione,

— presenza di eventuali particelle indisciolte,

— volume dì iniezione (µl) e concentrazione di iniezione (mg/ml),

— osservazioni indicanti effetti che portano a deviazioni dal profilo GPC ideale,

— descrizione dettagliata di tutte le modifiche applicate alle procedure di analisi,

— dettagli sugli intervalli di errore,

— qualsiasi altra informazione e osservazione utile all'interpretazione dei risultati.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elution-smittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly. D.,D,. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Allegato

Esempi di altri metodi per la determinazione del peso molecolare medio numerico (MN) di polimeri

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è il metodo preferito per la determinazione di M_n, in particolare quando sia disponibile una serie di standard la cui struttura è confrontabile con quella del polimero. Tuttavia, nel caso vi siano difficoltà pratiche per usare la GPC o si preveda già che la sostanza non rispetti un criterio normativo di M_n (che richiede conferma), sono disponibili metodi alternativi come:

1. **Uso di proprietà colligative**

1.1. Ebullioscopia/crioscopia:

prevede la misura dell'innalzamento del punto di ebollizione (ebullioscopia) o dell'abbassamento del punto di congelamento (crioscopia) dì un solvente quando si aggiunge un polimero. Il metodo è basato sul fatto che l'effetto del polimero disciolto sul punto di ebollizione/congelamento del liquido dipende dal peso molecolare del polimero (1) (2).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$.

1.2. Abbassamento della tensione di vapore:

prevede la misura della tensione di vapore di un dato liquido di riferimento prima e dopo l'aggiunta di quantità note di polimero (1) (2).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$ (in teoria; in pratica però di valore limitato).

1.3. Qsometria su membrana:

è basata sul principio dell'osmosi, cioè della tendenza naturale delle molecole di solvente a passare attraverso una membrana semipermeabile da una soluzione diluita verso una soluzione concentrata fino a raggiungere l'equilibrio. Nel saggio, la soluzione diluita è a concentrazione zero, mentre la soluzione concentrata contiene il polimero. L'effetto di aspirazione del solvente attraverso la membrana dà luogo ad un differenziale di pressione che dipende dalla concentrazione e dal peso molecolare del polimero (1) (3) (4).

Applicabilità: M_n compreso tra 20 000 — 200 000.

1.4. Osmometria in fase vapore:

prevede il confronto della velocità di evaporazione di un aerosol del solvente puro con almeno tre aerosol contenenti il polimero a varie concentrazioni (1) (2) (4).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analisi dei gruppi terminali**

Per usare questo metodo è necessario conoscere sia la struttura complessiva del polimero che la natura dei gruppi terminali delle catene (che devono poter essere distinti dallo scheletro principale per esempio mediante NMR o titolazione/derivatizzazione). La determinazione della concentrazione molecolare dei gruppi terminali presenti sul polimero può portare ad un valore del peso molecolare (7) (8) (9).

Applicabilità: M_n fino a 50 000 (con affidabilità decrescente).

3. **Bibliografia**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn, John Wiley, New York.

(2) Glover, CA, (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pag. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Muller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Cari Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S, et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **CONTENUTO DI FRAZIONI A BASSO PESO MOLECOLARE IN POLIMERI**

1. **METODO**

Questo metodo cromatografico a permeazione di gel corrisponde al metodo OCSE TG 119 (1996). I principi fondamentali e ulteriori informazioni tecniche sono presentati nei riferimenti bibliografici.

1.1. INTRODUZIONE

Data la varietà delle proprietà dei polimeri, è impossibile descrivere un singolo metodo che definisca con precisione condizioni di separazione e di valutazione tali da coprire tutte le particolarità e specificità che si incontrano nella separazione di polimeri. In particolare, sistemi di polimeri complessi spesso non sono adatti alla cromatografia a permeazione di gel (GPC). Quando non si può ricorrere alla GPC, il peso molecolare può venire determinato mediante altri metodi (vedi allegato). In tali casi, fornire ampi dettagli e la motivazione del metodo usato.

Il metodo descritto è basato sulla norma DIN 55672 (1), che contiene informazioni dettagliate su come eseguire gli esperimenti e valutare i dati. Nel caso siano necessarie modifiche delle condizioni sperimentali, queste modifiche devono essere motivate. Si possono usare altre norme purché fornite con riferimenti completi. Il metodo descritto ricorre a campioni di polistirene di polidispersità nota per la taratura e può richiedere modifiche per adeguarlo a certi polimeri, per esempio polimeri solubili in acqua e ramificati a catena lunga.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Un basso peso molecolare è definito arbitrariamente come un peso molecolare inferiore a 1 000 dalton.

Il peso molecolare medio numerico M_n e il peso molecolare medio ponderale M_w vengono determinati con le seguenti equazioni:

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

in cui

H_i = è il livello del segnale del rivelatore relativo alla linea di base per il volume di ritenzione V_i

M_i = è il peso molecolare della frazione di polimero in corrispondenza del volume di ritenzione V_i e n è il numero di punti.

L' ampiezza della distribuzione del peso molecolare, che è una misura della dispersità del sistema, è data dal rapporto M_w/M_n.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Poiché la GPC è un metodo relativo, è necessaria una taratura. A questo scopo vengono di norma utilizzati standard di polistirene a struttura lineare con pesi molecolari medi M_n e M_w noti e distribuzione nota del peso molecolare. La curva di taratura può venire usata nella determinazione del peso molecolare del campione sconosciuto solo se le condizioni scelte per la separazione del campione e degli standard sono identiche.

Una determinata relazione tra il peso molecolare e il volume di eluizione è valida solo nelle specifiche condizioni del particolare esperimento. Queste condizioni includono soprattutto la temperatura, il solvente (o miscele di solventi), le condizioni cromatografiche e la colonna e il sistema di colonne di separazione.

I pesi molecolari del campione determinati in questo modo sono valori relativi e sono descritti come «pesi molecolari equivalenti in polistirene». Questo significa che, secondo le differenze strutturali e chimiche tra il campione e gli standard, i pesi molecolari possono deviare dai valori assoluti in misura più o meno grande. Se si usano altri standard, per esempio polietilenglicole, polietilenossido, polimetil-metacrilato, acido poliacrilico, indicarne la ragione.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI ANALISI

Utilizzando la GPC, si possono determinare sia la distribuzione del peso molecolare del campione che i pesi molecolari medi (M_n, M_w). La GPC è un particolare tipo di cromatografia liquida in cui il campione viene separato in base ai volumi idrodinamici dei singoli costituenti (2).

La separazione viene effettuata mentre il campione passa attraverso una colonna riempita di un materiale poroso, tipicamente un gel organico. Le molecole piccole possono penetrare nei pori, mentre le molecole grandi ne sono escluse. Il percorso delle molecole grandi è pertanto più breve e queste vengono eluite per prime. Le molecole di medie dimensioni penetrano in alcuni dei pori e vengono eluite più tardi. Le molecole più piccole, con un raggio idrodinamico più piccolo dei pori del gel, possono penetrare in tutti i pori. Queste vengono eluite per ultime.

In una situazione ideale, la separazione è determinata unicamente dalla dimensione delle specie molecolari, ma in pratica è difficile evitare l'interferenza di almeno qualche effetto di assorbimento. Un riempimento disuniforme della colonna e volumi morti possono peggiorare la situazione (2).

La rivelazione viene effettuata per esempio mediante l'indice di diffrazione o l'assorbimento nell'UV e fornisce una curva di distribuzione semplice. Tuttavia, per attribuire valori effettivi di peso molecolare alla curva, è necessario tarare la colonna facendo passare attraverso di essa polimeri di peso molecolare noto, possibilmente anche di struttura approssimativamente simile, per esempio vari standard di polistirene. Tipicamente si ottiene una curva gaussiana, talvolta distorta con una piccola coda verso il lato dei pesi molecolari bassi, in cui l'asse verticale indica la quantità in peso delle specie di vario peso molecolare eluite, e l'asse orizzontale indica il logaritmo del peso molecolare.

▼B

Il contenuto di sostanze a basso peso molecolare si ricava da questa curva. Il calcolo può essere accurato solo se le specie di basso peso molecolare hanno una risposta, riferita alla massa, equivalente al polimero nel suo complesso.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La ripetibilità (deviazione standard relativa — Relative Standard Deviation: RSD) del volume di eluizione dovrebbe essere migliore dello 0,3 %. Se un cromatogramma viene valutato in funzione del tempo e non corrisponde al criterio succitato, la ripetibilità di analisi richiesta deve essere garantita mediante correzione attraverso uno standard interno (1). Le polidispersità dipendono dal peso molecolare degli standard. Nel caso degli standard di polistirene valori tipici sono:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p is the molecular weight of the standard at the peak maximum)

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI ANALISI

1.6.1. **Preparazione delle soluzioni di polistirene standard**

Gli standard di polistirene vengono sciolti mediante accurata miscelazione nell'eluente scelto. Nella preparazione delle soluzioni tener conto delle raccomandazioni del produttore.

La scelta delle concentrazioni degli standard dipende da vari fattori, per esempio il volume di iniezione, la viscosità della soluzione e la sensibilità del rivelatore analitico. Il volume massimo di iniezione deve essere adeguato alla lunghezza della colonna allo scopo di evitare un sovraccarico. Volumi di iniezione tipici per separazioni analitiche con la GPC su una colonna da 30 cm × 7,8 mm sono normalmente compresi tra 40 e 100 µl. Sono possibili volumi più elevati, ma non devono superare i 250 µl. Il rapporto ottimale tra il volume di iniezione e la concentrazione deve essere determinato prima dell'effettiva taratura della colonna.

1.6.2. **Preparazione della soluzione campione**

In linea di principio, per la preparazione delle soluzioni campione valgono gli stessi requisiti. Il campione viene sciolto accuratamente in un solvente adatto, per esempio tetraidrofurano (THF), per sbattimento. In nessun caso deve essere sciolto utilizzando un bagno ad ultrasuoni. Se necessario, la soluzione campione viene purificata su un filtro a membrana con dimensione dei pori compresa tra 0,2 e 2 µm.

Nella relazione finale deve essere registrata l'eventuale presenza di particelle indisciolte perché queste possono essere dovute a specie di peso molecolare elevato. Usare un metodo appropriato per determinare la percentuale in peso delle particelle indisciolte. Utilizzare le soluzioni entro 24 ore.

▼B

1.6.3. **Correzione dell'errore dovuto a impurezze e additivi**

É di solito necessaria una correzione del contenuto di specie M < 1 000 che tenga conto del contributo di componenti specifici non polimerici presenti (p. es. impurezze e/o additivi), salvo che il contenuto misurato sia già < 1 %. Questo si ottiene mediante l'analisi diretta della soluzione di polimero o dell'eluato della GPC.

Se, dopo il passaggio attraverso la colonna, l'eluato è troppo diluito per un'ulteriore analisi, occorre concentrarlo. Può essere necessario evaporare l'eluato a secchezza e scioglierlo di nuovo. La concentrazione dell'eluato deve essere condotta in condizioni tali da garantire che non si abbiano cambiamenti nell'eluato. Il trattamento dell'eluato dopo lo stadio di GPC dipende dal metodo analitico usato per la determinazione quantitativa.

1.6.4. **Apparecchiature**

L'apparecchiatura GPC comprende i seguenti componenti:

— serbatoio del solvente,

— degasatore (se del caso),

— pompa,

— ammortizzatore di pulsazioni (se del caso),

— sistema di iniezione,

— colonne per cromatografia,

— rivelatore,

— flussimetro (se del caso),

— registratore-elaboratore dati,

— recipiente di scarico.

Assicurarsi che il sistema GPC sia inerte rispetto ai solventi utilizzati (p. es. mediante l'uso di capillari d'acciaio se come solvente si usa il THF).

1.6.5. **Sistema di iniezione e di erogazione del solvente**

Caricare nella colonna un volume definito della soluzione campione utilizzando un autocampionatore oppure manualmente in una zona nettamente definita. Nel caso di una operazione manuale; se lo stantuffo della siringa viene tirato o spinto troppo rapidamente, la distribuzione dei pesi molecolari osservata può variare. Nei limiti del possibile il sistema di erogazione del solvente deve essere esente da pulsazioni e l'ideale sarebbe che vi fosse incorporato un attenuatore delle pulsazioni. La portata è dell ordine di 1 ml/min.

1.6.6. **Colonna**

Secondo il campione, il polimero viene caratterizzato utilizzando una colonna semplice o più colonne collegate in serie. In commercio sono disponibili vari materiali porosi per colonne con proprietà (p. es. dimensione dei pori, limiti di esclusione) definite. La scelta del gel di separazione o della lunghezza della colonna dipende sia dalle proprietà del campione (volumi idrodinamici, distribuzione dei pesi molecolari) che dalle specifiche condizioni di separazione come il solvente, la temperatura e la portata (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Piatti teorici**

La colonna o la combinazione di colonne utilizzata per la separazione deve essere caratterizzata dal numero di piatti teorici. Questo, nel caso venga utilizzato il THF come solvente di eluizione, implica di caricare una soluzione di etilbenzene o altro adatto soluto apolare su una colonna di lunghezza nota. Il numero di piatti teorici è dato dall'equazione seguente:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

in cui,

N è = il numero di piatti teorici

V_e è = il volume di eluizione al massimo del picco

W è = la larghezza del picco alla linea di base

$W_{1/2}$ è = la larghezza del picco a mezza altezza

1.6.8. **Efficienza di separazione**

Oltre al numero di piatti teorici, che è una quantità che determina l'ampiezza della banda, è importante anche l'efficienza di separazione, che è determinata dalla ripidità della curva di taratura. L'efficienza di separazione di una colonna si ottiene dalla seguente relazione:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

in cui

V_{eMx} è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare M_x

$V_{e,(10Mu)}$ è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare dieci volte maggiore.

La risoluzione del sistema è definita in generale come segue:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

in cui,

V_{e1}, V_{e2} = sono i volumi di eluizione dei due standard di polistirene al massimo del picco

W_1, W_2 = sono le larghezze del picco alla linea di base

M_1, M_2 = sono i pesci molecolari al massimo del picco (dovrebbero differire di un fattore 10).

Il valore di R per il sistema di colonne deve essere maggiore di 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventi**

Tutti i solventi devono essere di purezza elevata (per il THF si usa una purezza del 99,5 %). Il serbatoio del solvente (se necessario sotto atmosfera di gas inerte) deve essere sufficientemente grande per la taratura della colonna e per l'analisi di parecchi campioni. Degasare il solvente prima di trasportarlo alla colonna mediante la pompa.

1.6.10. **Controllo della temperatura**

La temperatura dei componenti interni critici (ansa di iniezione, colonne, rivelatore e tubature) deve essere costante e coerente con il solvente scelto.

1.6.11. **Rivelatore**

La funzione del rivelatore è di registrare quantitativamente la concentrazione del campione eluito dalla colonna. Per evitare un inutile allargamento dei picchi, il volume della cuvetta della cella del rivelatore deve essere il più piccolo possibile. Salvo per rivelatori a diffrazione della luce e rivelatori a viscosità, questo volume non deve superare i 10 µl. Il metodo di solito utilizzato per la rivelazione è la rifrattometria differenziale. Tuttavia, se richiesto dalle proprietà specifiche del campione o del solvente di eluizione, si possono utilizzare altri tipi di rivelatori, per esempio UV/VIS, IR, rivelatori viscosimetrici ecc.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

Fare riferimento alla norma DIN (1) per i criteri di valutazione dettagliati e per i requisiti di raccolta ed elaborazione dei dati.

Per ciascun campione eseguire due esperimenti indipendenti, che dovranno venire analizzati singolarmente. In ogni caso è essenziale determinare i dati anche sui bianchi trattati nelle stesse condizioni del campione.

È necessario indicare esplicitamente che i valori misurati sono valori relativi equivalenti al peso molecolare dello standard usato.

Dopo la determinazione dei volumi di ritenzione o dei tempi di ritenzione (possibilmente corretti usando uno standard interno), i valori di log M_p (M_p sono i massimi dei picchi dello standard di taratura) vengono riportati contro una delle suddette quantità. Per ogni decade di peso molecolare sono necessari almeno due punti di taratura e per la curva totale sono richiesti almeno cinque punti di misura, che devono coprire il peso molecolare stimato del campione. L'estremità della curva di taratura corrispondente al basso peso molecolare è definita da n-esilbenzene o altro soluto apolare adatto. Si determina la porzione della curva corrispondente a pesi molecolari inferiori a 1 000 e, se necessario, la si corregge per compensare impurezze e additivi. In genere le curve di eluzione vengono valutate con sistemi elettronici di elaborazione. Se si utilizza una digitalizzazione manuale, si può consultare il metodo ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Se eventuali polimeri insolubili vengono trattenuti sulla colonna, è probabile che il loro peso molecolare sia più elevato di quello della frazione solubile, e non considerandolo si sovrastimerebbe il contenuto di sostanze di basso peso molecolare. Nell'allegato sono fornite indicazioni per la correzione del contenuto di sostanze a basso peso molecolare per tener conto del polimero insolubile.

La curva di distribuzione deve essere fornita come tabella o come figura (frequenza differenziale o sommatoria delle percentuali contro log M). Nella rappresentazione grafica, una decade di peso molecolare deve avere normalmente una larghezza di circa 4 cm e il massimo del picco deve avere un'altezza di circa 8 cm. Nel caso di curve di distribuzione integrali la differenza in ordinata tra lo 0 e il 100 % deve essere di circa 10 cm.

2.2. RELAZIONE D'ANALISI

La relazione d'analisi deve includere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza in esame**

— informazioni disponibili sulla sostanza in esame (identità, additivi, impurezze),

— descrizione del trattamento del campione, osservazioni, problemi.

2.2.2. **Strumentazione**

— serbatoio dell'eluente, gas inerte, degasaggio dell'eluente, composizione dell'eluente, impurezze,

— pompa, attenuatore di pulsazioni, sistema di iniezione,

— colonne di separazione (fabbricante, tutte le informazioni sulle caratteristiche delle colonne, come dimensione dei pori, tipo di materiale di separazione ecc, numero, lunghezza e ordine delle colonne usate),

— numero di piatti teorici della colonna (o combinazione di colonne), efficienza di separazione (risoluzione del sistema),

— informazioni sulla simmetria dei picchi,

— temperatura della colonna, tipo di controllo della temperatura,

— rivelatore (principio di misurazione, tipo, volume della cuvetta),

— flussimetro se usato (produttore, principio di misurazione),

— sistema di registrazione ed elaborazione dati (hardware e software).

2.2.3. **Taratura del sistema**

— descrizione dettagliata del metodo usato per costruire la curva di taratura,

▼B

— informazioni sui criteri di qualità per questo metodo (coefficiente di correlazione, varianza ecc),

— informazioni su tutte le estrapolazioni, ipotesi e approssimazioni fatte durante la procedura sperimentale e durante la valutazione e l'elaborazione dei dati,

— tutte le misure usate per costruire la curva di taratura devono essere documentate in una tabella includente le seguenti informazioni per ciascun punto di taratura:

  — nome del campione,

  — produttore del campione,

  — valori caratteristici degli standard M_p , M_n , M_w , M_w/M_n, forniti dal produttore o ricavati da misure successive, insieme con dettagli relativi al metodo di determinazione,

  — volume di iniezione e concentrazione di iniezione,

  — valore di M_p usato per la taratura,

  — volume di eluizione o tempo di ritenzione corretto misurato in corrispondenza del massimo dei picchi,

  — M_p calcolato al massimo del picco,

  — errore percentuale dell'M_p calcolato e del valore di taratura.

2.2.4. **Informazioni sul contenuto di polimero a basso peso molecolare**

— descrizione dei metodi usati nell'analisi e del modo in cui sono stati condotti gli esperimenti,

— informazioni sul contenuto percentuale (p/p) di specie di basso peso molecolare riferito al campione totale;

— informazioni sulle impurezze, gli additivi e altre specie non polimeriche in percentuale in peso riferita al campione totale.

2.2.5. **Valutazione**

— valutazione su base temporale: metodi usati per garantire la riproducibilità richiesta (metodo di correzione, standard interno ecc),

— indicazione se la valutazione sia stata effettuata sulla base del volume di eluizione o del tempo di ritenzione,

— informazioni riguardo ai limiti della valutazione se un picco non viene analizzato completamente,

— descrizione dei metodi di lisciatura, se usati,

— procedure di preparazione e pretrattamento del campione,

— presenza di eventuali particelle indisciolte,

▼B

— volume di iniezione (μl) e concentrazione di iniezione (mg/ml),

— osservazioni indicanti effetti che portano a deviazioni dal profilo GPC ideale,

— descrizione dettagliata di tutte le modifiche applicate alle procedure di analisi,

— dettagli sugli intervalli di errore,

— qualsiasi altra informazione e osservazione utile all'interpretazione dei risultati.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 55672 (1995). Geldpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Allegato

Indicazioni per la correzione del contenuto di specie di basso peso molecolare in funzione della presenza di polimero insolubile

Quando in un campione è presente polimero insolubile, si verifica una perdita di massa durante l'analisi GPC. Il polimero insolubile viene trattenuto in modo irreversibile sulla colonna o sul filtro del campione, mentre la porzione solubile del campione passa attraverso la colonna. Se l'incremento dell'indice di rifrazione (dn/dc) del polimero può essere stimato o misurato, si può stimare la massa di campione persa sulla colonna. In tal caso si effettua una correzione usando una taratura esterna con materiali standard di concentrazione nota e dn/dc noto per tarare la risposta del rifrattometro. Nel seguente esempio si usa uno standard di poli(metilmetacrilato) (pMMA).

Nella taratura esterna per l'analisi di polimeri acrilici, si analizza uno standard di pMMA di concentrazione nota in tetraidrofurano mediante GPC e i dati risultanti vengono usati per trovare la costante del rifrattometro secondo l'equazione:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

in cui:

K = è la costante del rifrattometro (in microvolt secondi/ml),

R = è la risposta dello standard di pMMA (in microvolt/secondi),

C = è la concentrazione dello standard di pMMA (in mg/ml),

V = è il volume di iniezione (in ml) e dn/dc è l'incremento di indice di rifrazione per il pMMA in tetraidrofurano (in ml/mg).

I seguenti sono dati tipici di uno standard di pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

II valore di K risultante, $3{,}05 \times 10^{11}$ viene poi utilizzato per calcolare la risposta teorica del rivelatore se il 100 % del polimero iniettato fosse stato eluito attraverso il rivelatore.

▼B

A.20. COMPORTAMENTO DI SOLUZIONE/ESTRAZIONE DEI POLIMERI IN ACQUA

1. METODO

II metodo descritto corrisponde alla versione riveduta del metodo OCSE TG 120 (1997). Ulteriori informazioni tecniche sono fornite nel riferimento bibliografico (1).

1.1. INTRODUZIONE

Per certuni polimeri, come i polimeri in emulsione, può essere necessario un lavoro di preparazione iniziale prima di poter utilizzare il metodo qui presentato. Il metodo non può essere applicato a polimeri liquidi e a polimeri che reagiscono con l'acqua nelle condizioni del saggio.

Quando il metodo non è pratico o è impossibile da applicare, il comportamento di soluzione/estrazione può essere studiato mediante altri metodi. In tal caso,. fornire dettagli completi e la motivazione del metodo usato.

1.2. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.3. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

II comportamento di soluzione/estrazione di polimeri in un ambiente acquoso viene determinato con il metodo del pallone (cfr. A.6. Solubilità in acqua, metodo del pallone) con le modifiche descritte nel seguito.

1.4. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.5.1. **Apparecchiatura**

Per il metodo occorre la seguente apparecchiatura:

— dispositivo di triturazione, per esempio un macinino, per la produzione di particelle di dimensioni note,

— apparecchiature di scuotimento con possibilità di controllo della temperatura,

— sistema di filtrazione su membrana,

— apparecchiature analitiche appropriate,

— setacci standardizzati.

1.5.2. **Preparazione del campione**

Un campione rappresentativo deve innanzitutto venire ridotto ad una dimensione granulometrica compresa tra 0,125 e 0,25 mm con l'utilizzo di appropriati setacci. Può essere richiesto un raffreddamento ai fini della stabilità del campione o per la macinazione. Materiali di natura gommosa possono venire tritati alla temperatura dell'azoto liquido (1).

Se non è possibile ottenere la frazione di dimensione granulometrica richiesta, ridurre il più possibile le dimensioni delle particelle e indicare il risultato nella relazione. Nella relazione è necessario indicare come è stato conservato il campione tritato prima dell'analisi.

▼B

1.5.3. **Procedura**

Tre campioni da 10 g della sostanza in analisi vengono pesati in tre recipienti dotati di tappi di vetro e in ciascun recipiente si aggiungono 1 000 ml di acqua. Se ia manipolazione di una quantità di 10 g di polimero si dimostra irrealizzabile, utilizzare la massima quantità manipolabile e regolare in proporzione il volume d'acqua.

I recipienti vengono tappati ermeticamente ed agitati a 20 ºC. Usare un dispositivo di agitazione in grado di funzionare a temperatura costante. Dopo un periodo di 24 ore, il contenuto di ciascun recipiente viene centrifugato o filtrato e si determina la concentrazione del polimero nella fase acquosa limpida mediante un adatto metodo analitico. Se non sono disponibili metodi analitici adatti per la fase acquosa, si può stimare la solubilità/estrattività totale del peso secco del residuo trattenuto sul filtro o del precipitato centrifugato.

Di solito è necessario distinguere quantitativamente le impurezze e gli additivi, da una parte, dalle specie di basso peso molecolare, dall'altra parte. Nel caso di una determinazione gravimetrica, è importante anche eseguire una prova in bianco senza sostanza in esame per tener conto di residui dovuti alla procedura sperimentale.

Il comportamento di soluzione/estrazione di polimeri in acqua a 37 ºC a pH 2 e pH 9 può venire determinato come descritto per l'esperimento a 20 ºC. Questi pH si possono ottenere mediante l'aggiunta di adatti tamponi o di acidi o basi appropriate, come acido cloridrico, acido acetico, idrossido di sodio o di potassio per analisi o NH_3.

Secondo il metodo di analisi usato, si devono eseguire una o due prove. Quando sono disponibili metodi sufficientemente specifici per determinare il componente polimerico mediante l'analisi diretta della fase acquosa, dovrebbe essere sufficiente una prova eseguita come descritto sopra. Se invece tali metodi non sono disponibili e la determinazione del comportamento di soluzione/estrazione del polimero è limitata all'analisi indiretta mediante la sola determinazione del carbonio organico totale (TOC) contenuto nell'estratto acquoso, si dovrebbe eseguire una prova addizionale. Anche questa prova addizionale deve essere eseguita in triplo utilizzando campioni di polimero dieci volte più piccoli e le stesse quantità di acqua usate nella prima prova.

1.5.4. **Analisi**

1.5.4.1. *Saggio condotto con una sola dimensione del campione*

Se disponibili, usare metodi per l'analisi diretta dei componenti polimerici nella fase acquosa. In alternativa, si può prendere in considerazione anche un'analisi indiretta dei componenti de! polimero disciolti/estratti mediante determinazione del contenuto totale di parti solubili e correzione per tener conto dei componenti non specifici del polimero.

Per determinare le specie polimeriche totali è possibile effettuare l'analisi della fase acquosa: o

mediante un metodo di sufficiente sensibilità, per esempio:

— TOC mediante digestione con persolfato o dicromato a dare CO_2, e stima mediante IR o analisi chimica,

▼B

— spettrometria di assorbimento atomico (AAS) o il suo equivalente emissione a plasma accoppiato induttivamente (ICP) per polimeri contenenti silicio o metalli,

— assorbimento UV o spettrofluorimetria per i polimeri acrilici,

— LC-MS per campioni di basso peso molecolare,

oppure mediante evaporazione a secchezza sotto vuoto dell'estratto acquoso e analisi spettroscopica (IR, UV, ecc.) o AAS/ICP del residuo.

Se l'analisi della fase acquosa tal quale non è praticabile, l'estratto acquoso dovrebbe venire estratto con un solvente organico immiscibile con l'acqua, per esempio un idrocarburo clorurato. Il solvente viene poi evaporato e il residuo viene analizzato come sopra per determinare il contenuto di polimero di cui sopra. I componenti di questo residuo identificati come impurezza o additivo devono venire sottratti per determinare così il grado di soluzione/estrazione del polimero stesso.

Quando tali sostanze sono presenti in quantità relativamente grandi, può essere necessario sottoporre il residuo per esempio ad un'analisi HPLC o GC per distinguere le impurezze dal monomero e dalle specie derivate dal monomero presenti, in modo che sia possibile determinare il reale contenuto di queste ultime.

In alcuni casi può essere sufficiente una semplice evaporazione a secchezza del solvente seguita dalla pesata del residuo secco.

1.5.4.2. *Prova condotta con due differenti dimensioni del campione*

Si determina il TOC su tutti gli estratti acquosi.

Eseguire una determinazione gravimetrica sulla parte indisciolta/non estratta del campione. Se, dopo centrifugazione o filtrazione del contenuto di ciascun recipiente, rimangono residui di polimero attaccati alla parete del recipiente, risciacquarlo con il filtrato fino a rimuoverne tutti i residui visibili, dopo di che il filtrato viene di nuovo centrifugato o filtrato. I residui che rimangono sul filtro o nella provetta da centrifuga vengono essiccati a 40 °C sotto vuoto e pesati. Continuare l'essiccazione fino a peso costante.

2. **DATI**

2.1. PROVA CONDOTTA CON UNA SOLA DIMENSIONE DEL CAMPIONE

Indicare i singoli risultati di ciascuno dei tre palloni e valori medi, in unità di massa per volume della soluzione (tipicamente mg/l) o di massa per massa del campione di polimero (tipicamente mg/g). Indicare anche la perdita di peso del campione (calcolata come peso del soluto diviso per il peso del campione iniziale). Si dovrebbero calcolare le deviazioni standard relative (RSD). Indicare i singoli valori per la sostanza totale (polimero più additivi essenziali ecc.) e per il solo polimero (cioè dopo aver sottratto il contributo di tali additivi).

▼B

2.2. PROVA CONDOTTA CON DUE DIFFERENTI DIMENSIONI DEL CAMPIONE

Fornire i singoli valori di TOC degli estratti acquosi dei due esperimenti in triplo e il valore medio di ciascun esperimento in unità di massa per volume della soluzione (tipicamente mg C/g), nonché in unità di massa per peso del campione iniziale (tipicamente mg C/g).

Se non vi sono differenze tra i risultati ai rapporti campione/acqua alto e basso, questo può indicare che effettivamente sono stati estratti tutti i componenti estraibili. In tal caso normalmente non sarà necessaria l'analisi diretta.

Indicare i singoli pesi dei residui espressi in percentuale del peso iniziale dei campioni. Per ogni esperimento calcolare le medie. Le differenze tra 100 e le percentuali trovate rappresentano le percentuali di materiale solubile ed estraibile contenuto nel campione originario.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve includere le informazioni seguenti:

3.1.1. **Sostanza esaminata:**

— informazioni disponibili sulla sostanza esaminata (identità, additivi, impurezze, contenuto di specie di basso peso molecolare).

3.1.2. **Condizioni sperimentali:**

— descrizione delle procedure usate e delle condizioni sperimentali,

— descrizione dei metodi analitici e di rivelazione.

3.1.3. **Risultati:**

— risultati di solubilità/estraibilità in mg/l; valori singoli e valori medi delle prove di estrazione nelle varie soluzioni, scomposti in contenuto di polimero e impurezze, additivi ecc.,

— risultati di solubilità/estraibilità in mg/g di polimero,

— valori di TOC per gli estratti acquosi, peso del soluto e percentuali calcolate, se misurati,

— pH di ciascun campione,

— informazioni riguardo ai valori del bianco,

— se necessario, indicazioni sulla instabilità chimica della sostanza in esame sia durante il processo di saggio che durante il processo analitico,

— tutte le informazioni ritenute importanti per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fùr Priifzwecke.

▼B

A.21. **PROPRIETÀ COMBURENTI (LIQUIDI)**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo di test è disegnato per misurare il potenziale che una sostanza liquida ha di aumentare la velocità o l'intensità di combustione di una sostanza combustibile, o di formare con una sostanza combustibile una miscela capace di autoaccensione, quando le due sostanze vengono perfettamente miscelate. Il metodo si basa sul test ONU per i liquidi comburenti (1) ed è equivalente ad esso. Poiché tuttavia il presente metodo A.21 deve fondamentalmente soddisfare i requisiti del regolamento 1907/2006, esso può limitarsi a richiedere solo un confronto con un'unica sostanza di riferimento. L'analisi e il confronto con altre sostanze di riferimento possono risultare necessari quando occorre utilizzare i risultati del test per altri scopi. ([1])

Non occorre eseguire questo test quando l'esame della formula di struttura conferma oltre ogni ragionevole dubbio che la sostanza non è in grado di reagire esotermicamente con un materiale combustibile.

Prima di eseguire il test è utile possedere informazioni preliminari su eventuali potenziali proprietà esplosive della sostanza.

Il test non è applicabile a solidi, gas, sostanze esplosive o altamente infiammabili, né a perossidi organici.

L'esecuzione di questo test può essere evitata qualora la sostanza in esame sia già stata analizzata con il test ONU sui liquidi comburenti (1).

1.2 DEFINIZIONI E UNITÀ

Per tempo medio di aumento della pressione si intende la media dei tempi misurati perché una miscela in esame produca un aumento della pressione da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave.

1.3 SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Come sostanza di riferimento si utilizza acido nitrico acquoso al 65 % (p/p) (grado analitico) ([2]).

([1]) Come, per esempio, nell'ambito della normativa ONU sui trasporti.
([2]) L'acido va titolato prima del test per confermarne la concentrazione.

▼B

A scelta, se lo sperimentatore prevede che i risultati di questo test possano alla fine essere impiegati per altri scopi ([1]), può risultare appropriato eseguire il test anche con altre sostanze di riferimento. ([2])

1.4 PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Il liquido da sottoporre a test viene miscelato con cellulosa fibrosa in rapporto 1:1 (per massa) e introdotto in un recipiente a pressione. Se durante la miscelatura o il riempimento si verifica un'accensione spontanea non occorre proseguire il test.

Se non si verifica un'accensione spontanea il test va eseguito interamente. Dopo aver riscaldato la miscela in un recipiente a pressione si misura il tempo medio di aumento della pressione da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave, infine si confronta il risultato con il tempo medio di aumento della pressione rilevato per la miscela 1:1 della/e sostanza/e di riferimento con cellulosa.

1.5 CRITERI DI QUALITÀ

In una serie di cinque prove eseguite su un'unica sostanza i risultati non devono differire di oltre il 30 % dalla media aritmetica; in caso contrario vanno scartati. Se ciò dovesse succedere, occorre provvedere a migliorare la procedura di miscelazione e di riempimento prima di ripetere il test.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1 **Preparazione**

1.6.1.1 *Sostanza combustibile*

Come materiale combustibile viene impiegata cellulosa essiccata fibrosa con fibre di lunghezza compresa fra 50 e 250 μm e diametro medio di 25 μm ([3]). L'essiccazione avviene a peso costante formando uno strato di spessore non superiore a 25 mm, ad una temperatura di 105 °C per un periodo di 4 ore. La sostanza viene dunque conservata in un essiccatore in presenza di un essiccante nella fase di raffreddamento e comunque fino al momento del suo utilizzo. Il tenore di acqua della cellulosa essiccata deve essere inferiore allo 0,5 % della massa secca ([4]), eventualmente, se necessario, prolungando il tempo di essiccazione ([5]). Per tutto il test va utilizzato un unico lotto di cellulosa.

([1]) Come, per esempio, nell'ambito della normativa ONU sui trasporti.
([2]) Ad es.: nello studio di cui alla voce bibliografica 1 vengono usati acido perclorico al 50 % (p/p) e clorato di sodio al 40 % (p/p).
([3]) Ad es. Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, numero catalogo 4021 050.
([4]) Confermato (ad esempio) con titolazione di Karl-Fisher.
([5]) In alternativa è possibile ottenere questo livello di umidità mediante (ad esempio) riscaldamento a 105 °C sotto vuoto per 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Apparecchiatura*

1.6.1.2.1 Recipiente a pressione

Si utilizza un recipiente a pressione formato da un cilindro di acciaio lungo 89 mm e avente un diametro esterno di 60 mm (vedi figura 1). Sui lati opposti occorre lavorare due superfici piane (che riducono la sezione trasversale del recipiente a 50 mm) per facilitare la presa mentre si preparano la spina di accensione e il tappo-sfiatatoio. Il recipiente, che ha un diametro interno di 20 mm, presenta alle due estremità una smussatura interna per una profondità di 19 mm ed è filettato in modo da accomodare filettature British Standard Pipe (BSP) da 1" o l'equivalente metrico. Un limitatore di pressione, formato da un braccio laterale, è avvitato sul lato curvo del recipiente a pressione a 35 mm da una delle estremità e a 90° rispetto alle superfici piane lavorate. L'incavo per il limitatore è perforato per una profondità di 12 mm e filettato in modo da accomodare il filo del BSP da 1/2" (o l'equivalente metrico) all'estremità del braccio laterale. Se necessario si inserisce un sigillo di materiale inerte per assicurare la tenuta stagna contro la fuoriuscita di gas. Il braccio laterale si estende per 55 mm oltre il corpo del recipiente a pressione e presenta un foro di 6 mm. L'estremità del braccio laterale è smussata e filettata in modo da accomodare un trasduttore di pressione del tipo a membrana. È possibile utilizzare qualunque tipo di misuratore di pressione, a condizione che non sia sensibile alla temperatura dei gas o ai prodotti della decomposizione e che sia in grado di rilevare l'aumento di pressione tra 690 e 2 070 kPa in meno di 5 millisecondi.

L'estremità del recipiente a pressione più lontana dal braccio laterale è chiusa con la spina di accensione provvista di due elettrodi, uno isolato dal corpo della spina e l'altro collegato a massa. L'altra estremità del recipiente a pressione è chiusa da un disco di rottura (pressione di scoppio di circa 2 200 kPa) mantenuto in sede con un tappo di ritenuta provvisto di un'apertura di 20 mm. Se necessario la spina di accensione può essere dotata di un sigillo di materiale inerte per assicurare la tenuta stagna contro la fuoriuscita di gas. Una base appoggio (figura 2) mantiene l'assemblato nella posizione corretta durante l'utilizzo. In genere si ricorre ad una piastra di base in acciaio dolce di 235 mm x 184 mm × 6 mm provvista di un profilato cavo di 185 mm di lunghezza a sezione quadra di dimensioni di 70 mm x 70 mm × 4 mm.

Da ciascuno dei lati opposti di un'estremità del profilato viene tagliata una sezione, in modo da formare una struttura a due gambe con i lati piatti sormontata da un tratto di profilato a sezione intatta della lunghezza di 86 mm. Le estremità di questi lati piatti sono tagliate ad angolo di 60° in orizzontale e sono saldate alla piastra di base. In un lato dell'estremità superiore della sezione della base viene eseguita una scanalatura di 22 mm di larghezza × 46 mm di profondità tale che, quando l'assemblato del recipiente a pressione viene calato dal lato dell'estremità della spina di accensione nel supporto del profilato squadrato, il braccio laterale possa inserirsi nella scanalatura. Un pezzo di acciaio largo 30 mm e spesso 6 mm viene saldato al lato inferiore interno della sezione quadra per fungere da distanziatore. Due viti a testa piatta da 7 mm inserite nella faccia opposta servono a mantenere fisso in posizione il recipiente a pressione. Due strisce d'acciaio larghe 12 mm e spesse 6 mm, saldate alle parti laterali lungo la base della sezione quadra, sostengono il recipiente a pressione dal di sotto.

▼B

1.6.1.2.2 Sistema di accensione

Il sistema di accensione è formato da un filo in Ni/Cr lungo 25 cm con diametro di 0,6 mm e resistenza di 3,85 ohm/m. Mediante un'asta del diametro di 5 mm, il filo è arrotolato a formare una bobina ed è collegato agli elettrodi della spina di accensione. La bobina deve avere una delle configurazioni mostrate nella figura 3. La distanza fra il fondo del recipiente e la parte inferiore della bobina di accensione deve essere preferibilmente di 20 mm. Se gli elettrodi non sono regolabili, le estremità del filo di accensione fra la bobina e il fondo del recipiente vanno isolate con una guaina in ceramica. Il filo è riscaldato da un alimentatore a corrente continua di almeno 10 A.

1.6.2 **Esecuzione del test** ([1])

L'apparecchiatura, assemblata con il trasduttore di pressione e il sistema di riscaldamento ma senza il disco di rottura posizionato, viene appoggiata con il lato della spina di accensione verso il basso. In un bicchiere di vetro si mescolano 2,5 g del liquido da esaminare con 2,5 g di cellulosa essiccata, utilizzando un agitatore in vetro ([2]). Per sicurezza, quando si miscelano le due sostanze occorre inserire uno schermo di protezione fra l'operatore e la miscela. Se la miscela si incendia durante il mescolamento o il riempimento, non occorre proseguire il test. La miscela va versata nel recipiente a pressione in piccole quantità, tamburellando sul contenitore e facendo in modo che essa si concentri intorno alla bobina di accensione e sia perfettamente a contatto con essa. È importante che durante questo processo di impaccamento la bobina non venga deformata per evitare risultati sfalsati ([3]). Il disco di rottura viene messo in posizione e il tappo di ritenuta viene avvitato saldamente. Il recipiente carico viene trasferito sulla base di appoggio per l'accensione, con il disco di rottura in alto e il tutto viene sistemato in un apposito armadio aspirato corazzato da laboratorio o in una camera di scoppio. L'alimentatore viene collegato ai terminali esterni della spina di accensione e impostato su 10 A. Il tempo fra l'inizio della miscelazione e l'accensione dell'alimentatore non deve superare i 10 minuti.

Il segnale prodotto dal trasduttore di pressione viene registrato mediante sistema apposito che consenta sia la valutazione dei dati, sia la generazione di un registro permanente del profilo tempo-pressione ottenuto (ad esempio un registratore di segnali transitori unito a un registratore su carta). La miscela viene scaldata fino a rottura del disco o finché siano trascorsi almeno 60 s. Se la rottura del disco non si verifica, occorre lasciare raffreddare la miscela prima di smontare con cautela l'apparecchiatura, prendendo precauzioni per tenere conto dell'eventuale pressurizzazione. In totale vengono eseguite cinque prove con la sostanza in esame e la/le sostanza/e di riferimento. Si rileva e registra il tempo impiegato dalla pressione per aumentare da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave. Infine si calcola il tempo medio di aumento della pressione.

In alcuni casi le sostanze possono generare un aumento di pressione eccessivamente alto o basso dovuto a reazioni chimiche che non caratterizzano le proprietà comburenti della sostanza in questione. In tali casi può essere necessario ripetere il test con una sostanza inerte, come la diatomite (terra a diatomee), in luogo della cellulosa, allo scopo di chiarire la natura della reazione.

([1]) Le miscele di ossidanti con cellulosa vanno trattate come potenzialmente esplosive e maneggiate con la dovuta cautela.

([2]) In pratica occorre preparare una miscela 1:1 di liquido da esaminare e cellulosa in una quantità superiore a quella necessaria per il test e poi trasferirne 5 ± 0,1 g nel recipiente a pressione. La miscela deve essere preparata fresca per ciascun test.

([3]) In particolare occorre evitare il contatto fra le spire adiacenti della bobina.

▼B

2. **DATI**

Tempi di aumento della pressione sia per la sostanza in esame che per la/le sostanze di riferimento. Tempi di aumento della pressione per la sostanza inerte eventualmente utilizzata.

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si calcolano i tempi medi di aumento della pressione, sia per la sostanza in esame che per la/le sostanze di riferimento.

Si calcola il tempo medio di aumento della pressione per la sostanza inerte eventualmente utilizzata. La tabella 1 mostra alcuni esempi di risultati.

preparata fresca per ciascun test.

Tabella 1

Esempi di risultati ([a])

Sostanza ([b])	Tempo medio di aumento della pressione per una miscela 1:1 con cellulosa (ms)
Dicromato di ammonio, soluzione acquosa satura	20 800
Nitrato di calcio, soluzione acquosa satura	6 700
Nitrato di ferro, soluzione acquosa satura	4 133
Perclorato di litio, soluzione acquosa satura	1 686
Perclorato di magnesio, soluzione acquosa satura	777
Nitrato di nickel, soluzione acquosa satura	6 250
Acido nitrico, 65 %	4 767 ([c])
Acido perclorico, 50 %	121 ([c])
Acido perclorico, 55 %	59
Nitrato di potassio, soluzione acquosa al 30 %	26 690
Nitrato di argento, soluzione acquosa satura	([d])
Clorato di sodio, soluzione acquosa al 40 %	2 555 ([c])
Nitrato di sodio, soluzione acquosa al 45 %	4 133
Sostanza inerte	
Acqua:cellulosa	([d])

([a]) Vedi voce bibliografica (1) per la classificazione in base al regime di trasporto ONU.
([b]) Le soluzioni sature vanno preparate a 20 °C.
([c]) Valore medio da studi comparativi interlaboratorio.
([d]) Pressione massima di 2 070 kPa non raggiunta.

▼B

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— identità, composizione, purezza, ecc. della sostanza di prova,

— concentrazione della sostanza di prova,

— procedura di essiccazione della cellulosa,

— contenuto di acqua della cellulosa,

— risultati delle misurazioni,

— risultati degli eventuali test con sostanza inerte,

— tempi medi calcolati di aumento della pressione,

— eventuali deviazioni dal metodo descritto e motivazioni,

— qualunque informazione od osservazione rilevante per l'interpretazione dei risultati.

3.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI ([1])

I risultati del test devono essere valutati in base ai seguenti criteri:

a) eventuale accensione spontanea della miscela formata dalla sostanza di prova e dalla cellulosa;

b) confronto del tempo medio impiegato dalla pressione per aumentare da 690 kPa a 2 070 kPa con quello della/e sostanza/e di riferimento.

Una sostanza liquida è considerata comburente quando:

a) una miscela 1:1, per massa, di sostanza e cellulosa prende fuoco spontaneamente; oppure

b) una miscela 1:1, per massa, di sostanza e cellulosa presenta un tempo medio di aumento della pressione inferiore o uguale al tempo medio di aumento della pressione di una miscela 1:1, per massa, di acido nitrico acquoso al 65 % (p/p) e cellulosa.

Allo scopo di evitare un risultato falso positivo, in sede di interpretazione dei risultati occorre, se necessario, tenere conto anche dei risultati ottenuti testando la sostanza con un materiale inerte.

([1]) Vedi voce bibliografica 1 per l'interpretazione dei risultati in base alla normativa ONU sui trasporti con varie sostanze di riferimento.

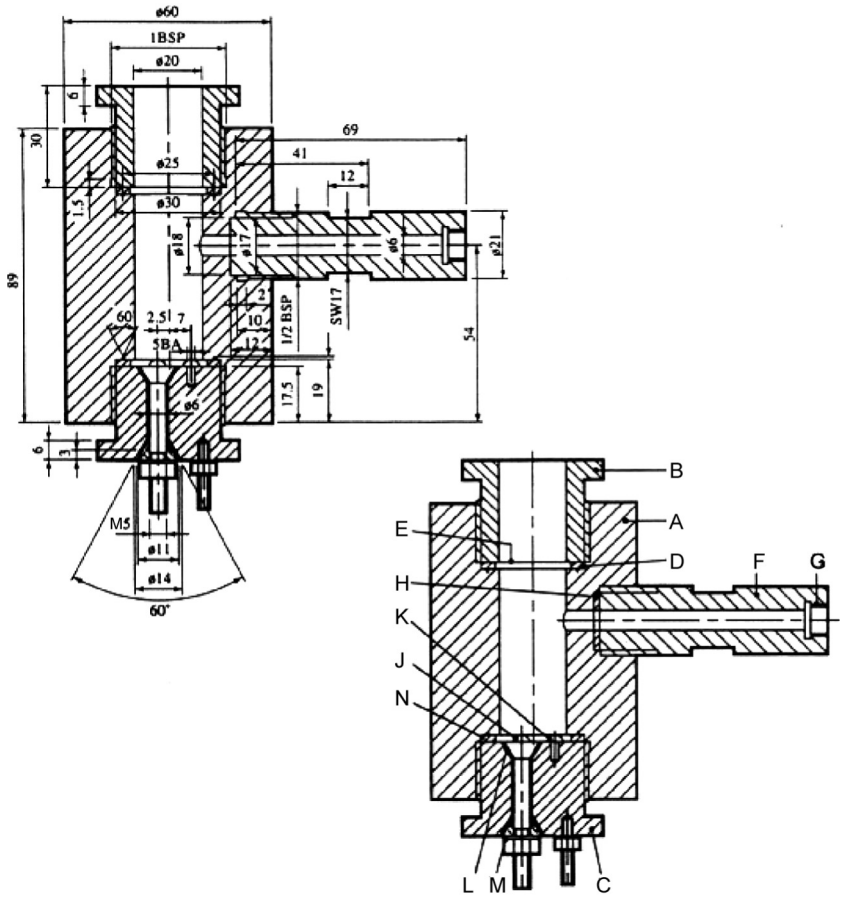
▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figura 1

Recipiente a pressione



(A) Corpo del recipiente a pressione

(B) Tappo di ritenuta del disco di rottura

(C) Spina di accensione

(D) Rondella di piombo dolce

(E) Disco di rottura

(F) Braccio laterale

(G) Testa del trasduttore di pressione

(H) Rondella

(J) Elettrodo isolato

(K) Elettrodo collegato a terra

(L) Isolante

(M) Cono d'acciaio

(N) Scanalatura per deformazione rondella

▼B

Figura 2

Base d'appoggio

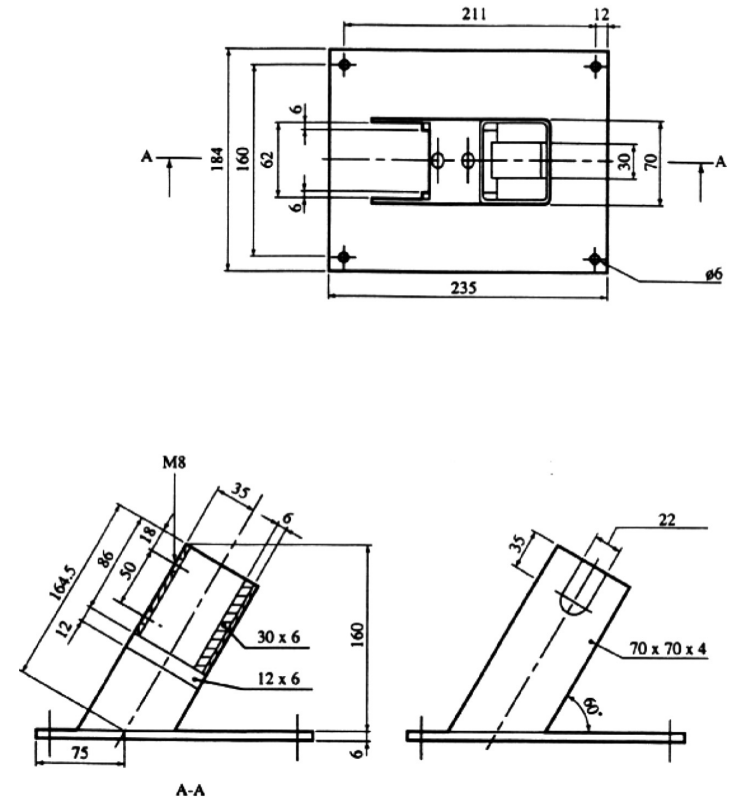
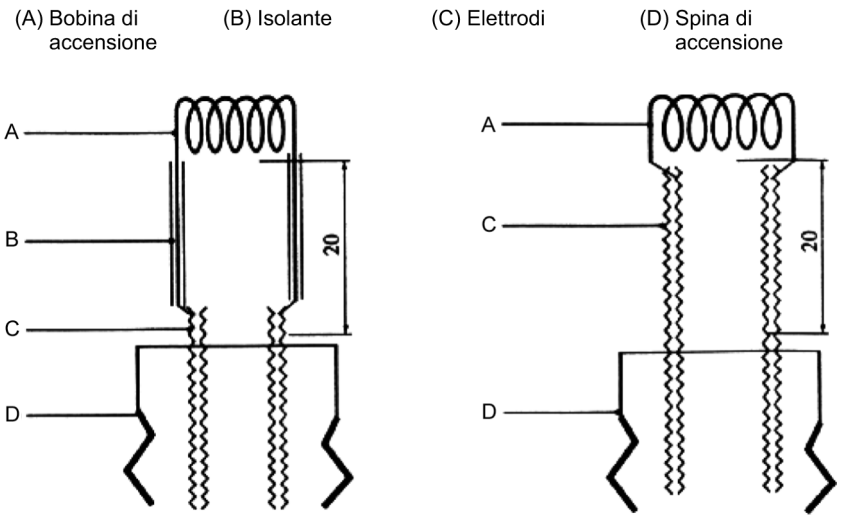


Figura 3

Sistema di accensione



Nota: entrambe queste configurazioni possono essere utilizzate.

▼M1

A.22. DIAMETRO GEOMETRICO MEDIO DELLE FIBRE PONDERATO RISPETTO ALLA LUNGHEZZA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive una procedura che permette di misurare il diametro medio geometrico ponderato rispetto alla lunghezza (DMGPL) di fibre minerali artificiali (FMA). Poiché il DMGPL della popolazione ha una probabilità del 95 % di essere compreso nei limiti di confidenza al 95 % (DMGPL ± due errori standard) del campione, il valore riportato (valore di prova) costituirà il limite inferiore di confidenza al 95 % del campione (cioè DMGPL — 2 errori standard). Il presente metodo si basa sull'aggiornamento di una bozza (del giugno 1994) di procedura concordata tra industria e HSE approvata nel corso di una riunione tra la ECFIA e la HSE a Chester il 26 settembre 1993 e sviluppata per e sulla base di un secondo confronto interlaboratoriale (1, 2). Questo metodo di misurazione può essere utilizzato per caratterizzare il diametro delle fibre di sostanze in massa o di prodotti contenenti FMA, comprese fibre ceramiche refrattarie (FCR), fibre vetrose artificiali (FVA) e fibre cristalline e policristalline.

La ponderazione in base alla lunghezza permette di compensare gli effetti sulla distribuzione del diametro dovuti alla rottura delle fibre lunghe durante il campionamento o la manipolazione del materiale. Per misurare la distribuzione dei diametri delle FMA sono utilizzate statistiche geometriche (media geometrica), giacché tali diametri hanno una distribuzione prossima alla distribuzione lognormale.

La misurazione della lunghezza e del diametro è un'operazione noiosa e lunga ma, se sono misurate solo le fibre in contatto con una linea infinitamente sottile del campo di visione del microscopio elettronico a scansione (SEM), la probabilità di selezionare una determinata fibra è proporzionale alla sua lunghezza. Poiché questo metodo tiene conto della lunghezza nei calcoli di ponderazione in base alla lunghezza, l'unica misurazione necessaria è quella del diametro, mentre il DMGPL-2ES può essere calcolato come descritto.

1.2. DEFINIZIONI

Particella: Oggetto il cui rapporto lunghezza/larghezza è inferiore a 3:1.

Fibra: Oggetto il cui rapporto lunghezza/larghezza (rapporto di allungamento) è di almeno 3:1.

1.3. SCOPO E LIMITAZIONI

Questo metodo è inteso ad esaminare la distribuzione dei diametri aventi un valore mediano compreso tra 0,5 e 6 μm. I diametri superiori possono essere misurati utilizzando ingrandimenti inferiori del SEM, ma questo metodo tende ad essere sempre più limitato man mano che la distribuzione dimensionale delle fibre diventa più fine. Per contro, se il diametro mediano è inferiore a 0,5 μm si raccomanda di eseguire le misurazioni con un microscopio elettronico a trasmissione (MET).

▼**M1**

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Un certo numero di campioni rappresentativi sono prelevati da un materassino (o feltro) di fibre oppure da fibre sciolte in massa. La lunghezza delle fibre in massa è ridotta per compressione, quindi un subcampione rappresentativo è disperso in acqua. Ne vengono estratte delle aliquote, che sono filtrate tramite un filtro in policarbonato con pori di 0,2 μm, prima di essere preparate per l'esame con la tecnica di microscopia elettronica a scansione (SEM). I diametri delle fibre sono misurati con un ingrandimento dello schermo di 10 000 × o maggiore ([1]) utilizzando il metodo della linea trasversale, in modo da ottenere una stima non distorta del diametro medio. L'intervallo inferiore di confidenza al 95 % (sulla base di un test unilaterale) è calcolato per ottenere una stima del valore minimo del diametro medio geometrico delle fibre del materiale.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.5.1. **Sicurezza/precauzioni**

L'esposizione del personale alle fibre in sospensione nell'atmosfera deve essere ridotta al minimo, e devono essere utilizzate una cappa d'aspirazione o un *glove box* in occasione della manipolazione delle fibre allo stato secco. Per determinare l'efficacia dei metodi di controllo dovranno essere eseguiti controlli periodici dell'esposizione del personale. In occasione della manipolazione delle FMA, il personale dovrà indossare guanti monouso per ridurre i rischi d'irritazione cutanea ed evitare qualsiasi contaminazione incrociata.

1.5.2. **Apparecchiatura/attrezzatura**

— Presse e matrici (capaci di produrre 10 MPa).

— Filtri in policarbonato a pori capillari di 0,2 μm (25 mm di diametro).

— Filtro a membrana in esteri misti di cellulosa (EMC) con porosità di 5 μm da utilizzare come filtro di supporto.

— Apparecchio di filtrazione in vetro (o sistemi di filtrazione monouso) disegnati per filtri di 25 mm di diametro (per esempio, kit di micro-analisi in vetro Millipore n. XX10 025 00).

— Acqua distillata di recente e filtrata attraverso un filtro con porosità di 0,2 μm per eliminare i microrganismi.

— Sistema di ricoprimento tramite bombardamento catodico (*sputter coater*) con sorgente in oro o oro/palladio.

— Microscopio elettronico a scansione con una risoluzione che può scendere fino a 10 nm ed un ingrandimento 10 000 ×.

— Varie: spatole, lama di bisturi di tipo 24, piccole pinze, supporti (*stubs*) per SEM, adesivo o nastro adesivo al carbonio, argento colloidale.

— Sonda ultrasonica o bagno a ultrasuoni da laboratorio

— Una sonda di carotaggio, per prelevare campioni nei materassini (o feltri) di FMA

([1]) questo valore d'ingrandimento è indicato per le fibre con diametri intorno a 3 μm. Per le fibre con diametro di 6 μm può essere più adatto un ingrandimento di 5 000 ×.

▼M1

1.5.3. **Procedura**

1.5.3.1. *Campionamento*

Per materassini o feltri, si utilizza una sonda di carotaggio da 25 mm per prelevare campioni dall'intero spessore. I prelievi devono essere effettuati ad intervalli uguali su tutta l'ampiezza di una porzione ridotta di tessuto o in zone scelte in modo casuale, se sono disponibili materiali di maggiore lunghezza. La stessa attrezzatura può essere utilizzata per estrarre campioni casuali dalle fibre sciolte. Ove possibile, dovrebbero essere prelevati sei campioni in modo da riflettere le variazioni spaziali nel materiale in massa.

I sei campioni devono essere compressi in una pressa da 50 mm di diametro ad una pressione di 10 MPa. Il materiale viene successivamente mescolato con una spatola e compresso di nuovo a 10 MPa. Quindi il materiale viene tolto dalla pressa e conservato in una bottiglia in vetro a chiusura ermetica.

1.5.3.2. *Preparazione del campione*

Se necessario, i leganti organici possono essere eliminati mettendo il campione in muffola a 450 °C per circa un'ora.

Utilizzare sistemi di partizione e quartatura per suddividere il campione (l'operazione deve essere realizzata all'interno di una cappa aspirante per polveri).

Con una spatola, aggiungere una piccola quantità (< 0,5 g) di campione a 100 ml di acqua distillata di recente e filtrata per mezzo di un filtro a membrana da 0,2 μm (può essere utilizzata acqua ultrapura di diversa origine, a condizione che sia di qualità soddisfacente). Disperdere accuratamente con una sonda ultrasonica a 100 W, regolata in modo da produrre cavitazione. (Se non si dispone di sonda, si utilizzi il metodo seguente: agitare ed invertire ripetutamente per 30 secondi; sottoporre ad ultrasuoni in un bagno ad ultrasuoni da laboratorio per cinque minuti: quindi agitare e invertire ripetutamente per altri 30 secondi).

Immediatamente dopo la dispersione delle fibre, prelevare un certo numero di aliquote (per esempio, tre aliquote di 3, 6 e 10 ml) per mezzo di una pipetta ad imboccatura larga (capacità di 2-5 ml).

Filtrare sotto vuoto ciascuna aliquota per mezzo di un filtro in policarbonato da 0,2 μm sostenuto da un filtro di supporto in EMC con porosità di 5 μm, utilizzando un imbuto di filtrazione in vetro da 25 mm con un serbatoio cilindrico. Porre circa 5 ml d'acqua distillata filtrata nell'imbuto e inserire lentamente nell'acqua le aliquote con l'aiuto di una pipetta, tenendo la punta della pipetta di sotto del menisco. La pipetta ed il serbatoio devono essere accuratamente puliti dopo l'utilizzo giacché le fibre più fini tendono ad aderire di più sulle superfici.

Rimuovere delicatamente il filtro e separarlo dal filtro di supporto prima di metterlo ad asciugare in un contenitore.

▼M1

Operando con movimento rotatorio, tagliare una sezione pari alla metà o a un quarto del deposito filtrato con una lama di bisturi di tipo 24. Fissare accuratamente la sezione tagliata sullo stub per il SEM mediante dischetto adesivo al carbonio o collante al carbonio. L'argento colloidale deve essere applicato almeno in tre punti per migliorare il contatto elettrico tra i bordi del filtro e lo stub. Quando l'adesivo/l'argento colloidale è asciutto, ricoprire la superficie del deposito per mezzo dello *sputter coater* con uno strato di circa 50 nm d'oro o d'oro/palladio.

1.5.3.3. *Taratura e funzionamento del SEM*

1.5.3.3.1. Taratura

La taratura del SEM deve essere verificata almeno una volta alla settimana (idealmente una volta al giorno) per mezzo di una griglia di taratura certificata. I valori della taratura devono essere confrontati con uno standard certificato e se il valore misurato (SEM) non rientra entro ± 2 % del valore certificato, la taratura con il SEM deve essere aggiustata e ricontrollata.

Il SEM deve essere in grado di fornire una risoluzione tale da rendere visibile almeno un diametro minimo di 0,2 μm, utilizzando un campione in matrice reale con un ingrandimento di 2 000 ×.

1.5.3.3.2. Modalità operative

Il SEM deve essere utilizzato con un ingrandimento di 10 000 ([1]) in condizioni che offrono una buona risoluzione ed un'immagine accettabile a velocità di scansione ridotta (per esempio, 5 secondi per schermo). Benché le condizioni operative possano variare da un SEM all'altro, per ottenere la migliore visibilità e risoluzione possibile con materiali di peso atomico relativamente basso, occorre utilizzare in generale tensioni d'accelerazione di 5-10 keV con una dimensione dello spot ridotta ed una distanza minima. Quando si applica il metodo della linea trasversale, occorre utilizzare un tilt di 0º per ridurre al minimo la necessità di rimessa a fuoco o, se il SEM ha una base eucentrica, utilizzare la distanza di lavoro eucentrica. Un ingrandimento inferiore può essere utilizzato se il materiale non contiene fibre di piccolo diametro ma fibre con diametri più grandi (> 5 μm).

1.5.3.4. *Misurazione*

1.5.3.4.1. Esame a debole ingrandimento per valutare il campione

Inizialmente, il campione deve essere esaminato con un debole ingrandimento per verificare l'esistenza di agglomerati di grandi fibre e per determinare la densità delle fibre.

In caso di eccessiva agglomerazione, si raccomanda di preparare un nuovo campione. Per garantire l'accuratezza delle statistiche, occorre misurare un numero minimo di fibre. È preferibile una densità elevata di fibre, giacché l'esame di campi vuoti richiede tempo e non contribuisce all'analisi. Tuttavia, se il filtro è sovraccarico, può diventare difficile dimensionare tutte le fibre misurabili. Inoltre, le fibre più piccole potrebbero passare inosservate perché nascoste da quelle più grandi.

([1]) Per fibre da 3 μm, cfr. la nota precedente.

▼M1

Una densità delle fibre superiore a 150 fibre per millimetro lineare trasversale può comportare una sopravvalutazione del DMGPL. D'altra parte, basse concentrazioni di fibre aumentano il tempo d'analisi. È inoltre spesso più efficiente in termine di costi preparare un campione di una densità vicina al valore ottimale, piuttosto che contare filtri a bassa concentrazione. La densità di fibre ottimale deve corrispondere ad una media di circa una o due fibre conteggiabili per campo visivo ad un ingrandimento di 5 000 ×. Tuttavia, poiché la densità ottimale dipende dalla dimensione (diametro) delle fibre, l'operatore dovrà decidere in base alla propria esperienza se la densità delle fibre è vicina al valore ottimale.

1.5.3.4.2. Ponderazione in base alla lunghezza dei diametri delle fibre

Solo le fibre che toccano (o attraversano) una linea (infinitamente) sottile tracciata sullo schermo del SEM sono contate. Per questo motivo viene tracciata una linea orizzontale (o verticale) attraverso il centro dello schermo.

In alternativa, si può fissare un unico punto al centro dello schermo e procedere ad una scansione continua in una sola direzione attraverso il filtro. Si misura e registra il diametro di qualsiasi fibra il cui rapporto tra lunghezza e diametro è superiore a 3:1 e che tocca o incrocia tale punto.

1.5.3.4.3. Misurazione delle fibre

Si raccomanda di misurare almeno 300 fibre. Ogni fibra è misurata una sola volta, nel punto d'intersezione con la linea o con il punto tracciato sullo schermo (o vicino al punto d'intersezione se i bordi della fibra sono nascosti). Se sono presenti fibre di sezione variabile, deve essere utilizzata una misura rappresentativa del diametro medio della fibra. Si dovrà prestare la massima cura nella definizione del bordo e nella misurazione della distanza più breve tra i bordi delle fibre. La misura può essere fatta direttamente o su immagini o fotografie registrate. Si raccomanda di utilizzare sistemi di misura d'immagine semiautomatici che trasferiscono direttamente i dati in un foglio di calcolo, giacché tale procedimento permette di guadagnare tempo, di evitare errori di trascrizione e di automatizzare i calcoli.

Le estremità delle fibre lunghe devono essere verificate con un ingrandimento più debole per assicurare che non ritornino nel campo di visione in cui è effettuata la misurazione e che siano misurate una sola volta.

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

In generale, i diametri delle fibre non hanno una distribuzione normale. È tuttavia possibile ottenere una distribuzione che si avvicina a quella normale effettuando una trasformazione logaritmica.

Calcolare la media aritmetica (media lnD) e la deviazione standard (DS_{lnD}) dei valori logaritmici in base *e* (lnD) dei diametri (D) delle n fibre.

$$\text{media } \ln D = \frac{\Sigma \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma\ (lnD - \text{media } lnD)^2}{n-1}} \quad (2)$$

La deviazione standard è divisa per la radice quadrata del numero di misurazioni effettuate (n) per ottenere l'errore standard (ES_{lnD}).

$$ES_{lnD} = \frac{DS}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Sottrarre due volte l'errore standard dalla media e calcolare l'esponenziale di questo valore (media meno due errori standard) per ottenere la media geometrica meno due errori standard geometrici.

$$DMGOPL - 2ES = e^{(\text{media } lnD - 2ES_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA**

RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova conterrà almeno le informazioni seguenti:

— Il valore del DMGPL -2ES.

— Tutte le eventuali modifiche procedurali, in particolare quelle che rischiano di influire sulla precisione e l'affidabilità dei risultati, nonché le relative giustificazioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett e G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (1-OTTANOLO/ACQUA): METODO DELL'AGITAZIONE LENTA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 123 (2006). Il metodo dell'agitazione lenta ha permesso di determinare con esattezza valori logaritmici del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) fino a 8,2 (1). Costituisce pertanto un approccio sperimentale adeguato per la determinazione diretta del P_{OW} di sostanze fortemente idrofobiche.

2. Tra gli altri metodi per la determinazione del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) si annoverano il metodo «dell'agitazione in bottiglia» (shake flask) (2) e la determinazione del P_{OW} dal comportamento di ritenzione nell'HPCL (cromatografia liquida ad alta prestazione) a fase inversa (3). Il metodo «dell'agitazione in bottiglia» tende a falsare i risultati a causa del trasferimento di microgoccioline di ottanolo nella fase acquosa. Con l'aumento dei valori del P_{OW}, la presenza di queste goccioline nella fase acquosa porta ad una crescente sovrastimazione della concentrazione della sostanza in esame nell'acqua. L'applicazione di questo metodo è pertanto limitata alle sostanze con log $P_{OW} < 4$. Il secondo metodo si basa su valori affidabili di P_{OW} determinati direttamente per calibrare la relazione tra il comportamento di ritenzione nell'HPLC e i valori P_{OW} misurati. Esisteva un progetto di linea guida OCSE per determinare i coefficienti di ripartizione 1-ottanolo/acqua di sostanze ionizzabili (4) che tuttavia è stato abbandonato.

3. Il presente metodo di prova è stato messo a punto nei Paesi Bassi. La precisione dei metodi descritti è stata validata e ottimizzata nel corso di uno studio di validazione interlaboratorio (ring test) al quale hanno partecipato 15 laboratori (5).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Significato e utilizzo

4. Nel caso di sostanze organiche inerti, sono state individuate relazioni molto significative tra i coefficienti di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) e il bioaccumulo di queste sostanze nei pesci. Inoltre, è stata anche dimostrata una correlazione tra il P_{OW} e, da un lato, la tossicità per i pesci e, dall'altro, l'assorbimento di sostanze chimiche nei solidi, come suoli e sedimenti Il riferimento bibliografico (6) contiene un'ampia panoramica di queste relazioni.

5. È stata accertata l'esistenza di una vasta gamma di relazioni tra il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua e altre proprietà delle sostanze, di interesse per la chimica e la tossicologia ambientali. Il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua è pertanto diventato un parametro fondamentale ai fini della valutazione del rischio ambientale delle sostanze chimiche e della previsione del destino di tali sostanze nell'ambiente.

Ambito di applicazione

6. Si ritiene che il metodo dell'agitazione lenta riduca la formazione di microgoccioline dalle goccioline di 1-ottanolo nella fase acquosa; di conseguenza non si verifica la sovrastimazione della concentrazione in fase acquosa dovuta all'associazione di molecole della sostanza di prova a queste goccioline. Il metodo dell'agitazione lenta si presta in particolare alla determinazione del P_{OW} di sostanze con log P_{OW} previsto uguale o superiore a 5, per le quali il metodo dell'agitazione in bottiglia (2) tende a fornire risultati erronei.

▼M4

DEFINIZIONI E UNITÀ

7. Il coefficiente di ripartizione di una sostanza tra l'acqua e un solvente lipofilo (1-ottanolo) caratterizza la distribuzione in equilibrio della sostanza chimica tra le due fasi. Il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) è definito come il rapporto tra la concentrazione in equilibrio della sostanza in esame in 1-ottanolo saturato con acqua (C_O) e la concentrazione in equilibrio della sostanza in esame in acqua saturata con 1-ottanolo (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

In quanto rapporto tra due concentrazioni si tratta di un valore adimensionale. Generalmente è espresso con il suo logaritmo decimale (log P_{OW}). Visto che il P_{OW} dipende dalla temperatura, la relazione sulla prova dovrà precisare la temperatura delle determinazioni.

PRINCIPIO DEL METODO

8. Al fine di determinare il coefficiente di ripartizione, l'acqua, l'1-ottanolo e la sostanza in esame devono essere portati in equilibrio tra loro a temperatura costante. Si procede successivamente a misurare le concentrazioni della sostanza in esame nelle due fasi.

9. Il metodo dell'agitazione lenta proposto permette di ridurre le difficoltà sperimentali associate alla formazione di microgoccioline che si verificano nel metodo dell'agitazione in bottiglia. Con il metodo dell'agitazione lenta, l'acqua, l'1-ottanolo e la sostanza in esame si equilibrano in un reattore termostatato sottoposto ad agitazione. Gli scambi tra le fasi sono accelerati dall'agitazione. Quest'ultima produce una leggera turbolenza che favorisce gli scambi tra 1-ottanolo e acqua senza provocare la formazione di microgoccioline (1).

APPLICABILITÀ DELLA PROVA

10. Dato che la presenza di sostanze diverse dalla sostanza in esame potrebbe influenzare il coefficiente di attività di quest'ultima, essa deve essere testata allo stato puro. Ai fini della determinazione del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua occorre utilizzare una sostanza che presenti il grado di purezza più elevato disponibile in commercio.

11. Il presente metodo si applica alle sostanze pure che non si dissociano né si associano e che non manifestano un'attività interfacciale significativa. Può essere utilizzato per determinare il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua di tali sostanze e delle relative miscele. In quest'ultimo caso, i coefficienti di ripartizione ottenuti variano in funzione della composizione chimica della miscela in esame e della composizione elettrolitica della fase acquosa. Adottando alcune misure supplementari, il metodo può essere applicato anche a sostanze che si dissociano o si associano (paragrafo 12).

12. A motivo della molteplicità di equilibri dell'acqua e dell'1-ottanolo presenti nella ripartizione 1-ottanolo/acqua delle sostanze dissociabili, come acidi organici e fenoli, basi organiche e composti organometallici, il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua è una costante fortemente dipendente dalla composizione elettrolitica (7) (8). Ai fini della determinazione di questo coefficiente, è necessario controllare il pH e la composizione elettrolitica, i cui valori devono essere riportati nella relazione sulla prova. La valutazione di questi coefficienti di ripartizione deve essere effettuata da specialisti («giudizio esperto»). Utilizzando i valori delle costanti di dissociazione, occorre scegliere valori di pH adeguati in modo da stabilire un coefficiente di ripartizione per ciascuno stato di ionizzazione. I composti organometallici devono essere testati usando tamponi non complessanti (8). Alla luce delle conoscenze attuali in materia di chimica in fase acquosa (costanti di complessazione e di dissociazione), le condizioni sperimentali devono essere scelte in modo da poter stimare la speciazione della sostanza in esame in fase acquosa. La forza ionica deve essere identica in tutti gli esperimenti, grazie all'utilizzo di un elettrolita di fondo.

▼M4

13. Le sostanze con bassa idrosolubilità o un elevato valore P_{OW} possono creare problemi in quanto le loro concentrazioni in acqua sono talmente deboli che diventa difficile determinarle con esattezza. Il presente metodo di prova fornisce indicazioni su come risolvere questo problema.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

14. Il livello di purezza dei reagenti chimici deve corrispondere almeno al grado analitico. Si raccomanda di utilizzare sostanze non marcate, di composizione chimica nota e di purezza pari almeno al 99 % o sostanze radiomarcate di composizione chimica e purezza radiochimica note. Nel caso di traccianti radioattivi a breve emivita, occorre applicare correzioni a fronte della degradazione. Se la sostanza in esame è radiomarcata, occorre usare un metodo analitico specifico, in modo che la radioattività misurata sia correlata direttamente alla sostanza in esame.

15. La stima del valore log v può essere ottenuta utilizzando gli appositi software venduti in commercio, o basandosi sul rapporto tra le solubilità in entrambi i solventi.

16. Prima di applicare il metodo dell'agitazione lenta per la determinazione del P_{OW}, occorre disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

a) formula strutturale;

b) metodi analitici adeguati per la determinazione della concentrazione della sostanza in acqua e in 1-ottanolo;

c) costante o costanti di dissociazione di sostanze ionizzabili (Linea guida OCSE n. 112) (9);

d) idrosolubilità (10);

e) idrolisi abiotica (11);

f) pronta biodegradabilità (12);

g) tensione di vapore (13).

DESCRIZIONE DEL METODO

Materiale e apparecchiatura

17. L'esperimento richiede un'apparecchiatura standard di laboratorio, in particolare:

— agitatori magnetici e bacchette di agitazione magnetiche rivestite di Teflon per agitare la fase acquosa,

— strumenti analitici che permettono di determinare la concentrazione della sostanza in esame alle concentrazioni previste,

— un agitatore dotato di rubinetto alla base. In funzione della stima del log P_{OW} e del limite di rivelabilità (*Limit of Detection* — LOD) della sostanza in esame, occorre considerare l'utilizzo di un recipiente di reazione con la medesima geometria ma di volume superiore ad un litro, in modo da ottenere un volume di acqua sufficiente per l'estrazione e l'analisi chimiche. La concentrazione della sostanza in esame nell'estratto acquoso sarà pertanto più elevata, rendendo così più affidabile la determinazione analitica. All'appendice 1 figura una tabella che riporta le stime del volume minimo necessario, il LOD del composto, la stima del valore log P_{OW} e l'idrosolubilità del composto. La tabella si basa sulla relazione tra il log P_{OW} e il rapporto tra le solubilità in ottanolo e in acqua, secondo Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

dove:

$SR = S_{oct}/S_w$ (concentrazione molare),

e sulla relazione presentata da Lyman (15) per la stima dell'idrosolubilità. Le idrosolubilità calcolate con l'equazione riportata nell'appendice 1 sono da considerarsi come una prima stima. Occorre rilevare che l'utilizzatore è libero di determinare l'idrosolubilità mediante qualsiasi altro rapporto che si ritenga rappresenti meglio il rapporto tra idrofobicità e solubilità. Per i composti solidi, ad esempio, si raccomanda di includere il punto di fusione nella previsione della solubilità. Se si utilizza un'equazione modificata, occorre accertarsi che l'equazione per il calcolo della solubilità in ottanolo sia tuttora valida. L'appendice 2 riporta una rappresentazione schematica di un agitatore con rivestimento esterno in vetro, di capacità di circa un litro. Le proporzioni del contenitore rappresentato nell'appendice 2 si sono dimostrate ottimali e devono essere mantenute qualora si utilizzi un apparecchiatura di dimensioni diverse,

— è indispensabile disporre di un dispositivo per mantenere costante la temperatura durante l'esperimento di agitazione lenta.

18. I recipienti devono essere in materiale inerte in modo che l'adsorbimento sulle loro superfici sia trascurabile.

Preparazione delle soluzioni di prova

19. La determinazione del P_{OW} deve essere eseguita utilizzando 1-ottanolo della qualità più pura disponibile in commercio (grado di purezza minima di 99 %). Si raccomanda di purificare la soluzione mediante estrazione acida, basica e con acqua, seguita da essiccazione. L'1-ottanolo può, inoltre, essere purificato per distillazione. Le soluzioni standard delle sostanze in esame devono essere preparate con 1-ottanolo purificato. L'acqua usata per la determinazione del P_{OW} deve essere distillata in apparecchi di vetro o quarzo, o trattata con un sistema di purificazione o di qualità HPLC. La filtrazione dell'acqua distillata deve essere eseguita mediante filtro di 0,22 μm; è altresì necessario prevedere delle prove in bianco per assicurarsi che gli estratti concentrati non contengano impurità che possano interferire con la sostanza in esame. Se si usa un filtro in fibra di vetro, occorre pulirlo lasciandolo almeno tre ore in un forno a 400 °C.

20. Entrambi i solventi devono essere reciprocamente saturati prima dell'esperimento, portandoli all'equilibrio in un recipiente sufficientemente grande. A tal fine occorre sottoporre il sistema a due fasi di agitazione lenta per due giorni.

21. Selezionare un'adeguata concentrazione della sostanza in esame e scioglierla in 1-ottanolo (saturato con acqua). È necessario determinare il coefficiente di ripartizione in soluzioni diluite in 1-ottanolo e acqua. Pertanto la concentrazione della sostanza di prova non deve superare il 70 % della sua solubilità con una concentrazione massima di 0,1 M in ciascuna fase (1). Le soluzioni di 1-ottanolo utilizzate per l'esperimento devono essere prive della sostanza in esame in sospensione allo stato solido.

22. Sciogliere la quantità adeguata di sostanza in esame in 1-ottanolo (saturato con acqua). Se la stima del valore logaritmico di P_{OW} è superiore a 5, ci si deve assicurare che le soluzioni di 1-ottanolo utilizzate per l'esperimento non contengano la sostanza in esame in sospensione allo stato solido. A tale fine, si esegue la procedura seguente per le sostanze chimiche il cui valore stimato di log P_{OW} è > 5:

— si scioglie la sostanza in esame in 1-ottanolo (saturato con acqua),

▼M4

— si lascia riposare la soluzione sufficientemente a lungo perché la sostanza solida sospesa si depositi. Durante la decantazione, la concentrazione della sostanza in esame è monitorata,

— una volta che le concentrazioni misurate nella soluzione di 1-ottanolo hanno raggiunto un valore stabile, si diluisce la soluzione madre con un volume adeguato di 1-ottanolo,

— si misura la concentrazione della soluzione madre diluita. Se la concentrazione misurata è coerente con la diluizione, la soluzione madre diluita può essere utilizzata nell'esperimento ad agitazione lenta.

Estrazione e analisi di campioni

23. L'analisi della sostanza in esame è effettuata mediante un metodo analitico convalidato. I ricercatori devono dimostrare che, durante la prova, le concentrazioni nella fase di 1-ottanolo saturato con l'acqua e in fase acquosa saturata con 1-ottanolo sono superiori al limite di quantificazione del metodo analitico usato. Occorre stabilire prima dell'esperimento i recuperi analitici mediante analisi della sostanza in esame in fase acquosa e in fase 1-ottanolo, laddove siano necessari metodi di estrazione. Il segnale analitico deve essere corretto per tenere conto delle prove in bianco e si provvederà ad evitare qualsiasi trasferimento dell'analita da un campione all'altro.

24. Prima dell'analisi, in caso di basse concentrazioni delle sostanze di prova idrofobiche in fase acquosa, sarà probabilmente necessario estrarre la fase acquosa mediante un solvente organico e preconcentrare l'estratto. Per la stessa ragione, è necessario ridurre le concentrazioni delle eventuali prove in bianco. A tale scopo, si devono utilizzare solventi di estrema purezza, preferibilmente solventi utilizzati per l'analisi dei residui. Inoltre, una pulizia accurata (ad esempio lavaggio con solvente o essiccazione a temperatura elevata) degli strumenti in vetro prima dell'esperimento può diminuire il rischio di contaminazione incrociata.

25. È possibile ottenere una stima del log P_{OW} con un apposito programma o ricorrendo al parere di uno specialista. Se il suo valore è superiore a sei, è necessario prestare molta attenzione alle correzioni in funzione dei bianchi e ai trasferimenti dell'analita da un campione all'altro. D'altro canto, se il log P_{OW} è superiore a 6, è obbligatorio uno standard surrogato per correggere il tasso di recupero, in modo da ottenere fattori di preconcentrazione elevati. Esistono in commercio diversi programmi software per il calcolo della stima del log P_{OW} ad esempio, Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) e ACD log P (19) ([1]). I riferimenti bibliografici (da 20 a 22) descrivono i vari metodi di stima.

26. I limiti di quantificazione (limits of quantification — LOQ) della sostanza in esame in 1-ottanolo e in acqua sono stabiliti secondo metodi riconosciuti. Come principio di base, il limite di quantificazione di un metodo corrisponde alla concentrazione in acqua o in 1-ottanolo che produce un rapporto segnale-disturbo pari a dieci. Occorre scegliere metodi di estrazione e di preconcentrazione adeguati e precisare i recuperi analitici. Occorre scegliere un fattore di preconcentrazione adeguato che produca un segnale dell'intensità richiesta nel corso della determinazione analitica.

([1]) Questa informazione è fornita soltanto a titolo indicativo. Possono essere utilizzati altri software equivalenti se è dimostrato che producono gli stessi risultati.

▼M4

27. In funzione dei parametri del metodo analitico e delle concentrazioni previste, si stabilisce il volume approssimativo del campione che permetterà un'accurata determinazione della concentrazione della sostanza. Per ottenere un segnale analitico sufficiente, è opportuno non utilizzare campioni di acqua troppo esigui. D'altro canto, i campioni di acqua non devono neanche essere troppo grandi, poiché il volume di acqua restante rischia di essere insufficiente per il numero minimo di analisi necessario (n = 5). Nell'appendice 1 sono riportati i volumi minimi dei campioni in funzione del volume del recipiente, il limite di quantificazione della sostanza in esame e la sua solubilità.

28. La quantificazione delle sostanze di prova si effettua per confronto con le curve di calibrazione dei loro composti. Le concentrazioni nei campioni analizzati devono essere comprese tra le concentrazioni degli standard.

29. Per le sostanze in esame il cui log P_{OW} stimato è superiore a sei, occorre aggiungere uno standard surrogato nel campione di acqua prima dell'estrazione per rilevare le perdite che si verificano durante l'estrazione e la preconcentrazione dei campioni di acqua. Affinché la correzione del recupero sia accurata, gli standard surrogati devono avere proprietà molto simili o identiche a quelle della sostanza in esame. A tale scopo, si utilizzano preferibilmente analoghi marcati con isotopi (stabili) della sostanza di prova (perdeuterati o marcati ^{13}C, ad esempio). Se l'utilizzo di analoghi marcati con isotopi stabili (^{13}C o ^{2}H) risulta impossibile, si deve dimostrare, basandosi su dati affidabili tratti da pubblicazioni, che le proprietà fisico-chimiche dello standard surrogato sono molto vicine a quelle della sostanza in esame. Nel corso dell'estrazione liquido-liquido della fase acquosa possono formarsi emulsioni, che possono essere ridotte con l'aggiunta di sale e lasciando decantare l'emulsione tutta la notte. I metodi utilizzati per estrarre e preconcentrare i campioni devono essere riportati nella relazione sulla prova.

30. Prima di essere analizzati, i campioni prelevati dalla fase 1-ottanolo possono, se necessario, essere diluiti con un adeguato solvente. Inoltre, si raccomanda l'utilizzo di standard surrogati per correggere il tasso di recupero per le sostanze che hanno evidenziato un grado di variazione elevato nel corso delle prove di recupero (deviazione standard relativa > 10 %).

31. La relazione sulla prova dovrà contenere i dettagli del metodo analitico, e includere: il metodo di estrazione, i fattori di preconcentrazione e di diluizione, i parametri degli strumenti, il processo di calibrazione, l'intervallo di calibrazione, il recupero analitico della sostanza in esame dall'acqua, l'aggiunta di standard surrogati per correggere il tasso di recupero, i valori delle prove in bianco, i limiti di rivelabilità e i limiti di quantificazione.

Esecuzione della prova

Rapporti volumetrici ottimali 1-ottanolo/acqua

32. La scelta dei volumi di acqua e di 1-ottanolo deve avvenire in funzione degli elementi seguenti: il limite di quantificazione in 1-ottanolo e in acqua, i fattori di preconcentrazione applicati ai campioni di acqua, i volumi di campionamento prelevati in 1-ottanolo e in acqua nonché le concentrazioni previste. Per ragioni sperimentali, il volume di 1-ottanolo nel metodo dell'agitazione lenta deve essere scelto in modo che lo strato di 1-ottanolo sia sufficientemente spesso (> 0,5 cm) da non risultare alterato dopo un campionamento della fase 1-ottanolo.

33. Per determinare i composti il cui log P_{OW} è uguale o superiore a 4,5, il rapporto tra i volumi di ciascuna fase abitualmente utilizzati sono da 20 a 50 ml di 1-ottanolo e da 950 a 980 ml di acqua in un recipiente da un litro.

▼M4

Condizioni sperimentali

34. Durante la prova, al recipiente di reazione è applicato un termostato in modo da limitare la variazione di temperatura a meno di 1 °C. La prova deve essere effettuata a 25 °C.

35. Il sistema sperimentale deve essere protetto dalla luce del giorno, effettuando la prova in una camera oscura o coprendo il recipiente di reazione con un foglio di alluminio.

36. La prova deve essere effettuata in un ambiente (per quanto possibile) privo di polvere.

37. Il sistema 1-ottanolo/acqua è agitato fino al raggiungimento dell'equilibrio. Il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio è valutato in un esperimento pilota effettuando una prova ad agitazione lenta durante la quale l'acqua e l'1-ottanolo sono sottoposti periodicamente a campionamento. I campionamenti devono avvenire ad intervalli di almeno cinque ore.

38. La determinazione del P_{OW} deve essere effettuata sulla base di almeno tre prove indipendenti di agitazione lenta.

Determinazione del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio

39. Si considera che l'equilibrio sia stato raggiunto quando la regressione del rapporto delle concentrazioni 1-ottanolo/acqua in funzione del tempo (in un arco temporale che comprende quattro punti) si traduce in una pendenza che non si discosta in modo significativo da zero per un livello p uguale a 0,05. Occorre raggiungere l'equilibrio almeno 24 ore prima di poter iniziare il campionamento. In linea di massima, il campionamento delle sostanze il cui log P_{OW} stimato è < 5 può essere effettuato nel corso del secondo e terzo giorno. È possibile che il tempo necessario per giungere all'equilibrio sia più lungo per le sostanze maggiormente idrofobiche. Nel caso di una sostanza con log P_{OW} = 8,23 (decaclorobifenile), sono state sufficienti 144 ore per raggiungere l'equilibrio. L'equilibrio è valutato mediante una serie di campionamenti effettuati dallo stesso recipiente.

Inizio della prova

40. All'inizio della prova, riempire il recipiente di reazione con acqua saturata in 1-ottanolo; attendere quindi che il sistema raggiunga la temperatura termostata.

41. Aggiungere con attenzione al recipiente di reazione la quantità voluta di sostanza in esame (disciolta nel volume richiesto di 1-ottanolo saturato con acqua). Si tratta di un momento critico della prova poiché si deve evitare una miscela turbolenta delle due fasi. A tal fine, la fase 1-ottanolo può essere versata delicatamente con una pipetta sulla parete del contenitore di prova, vicino alla superficie dell'acqua. In tal modo scorrerà lungo la parete formando una pellicola sopra la fase acquosa. Evitare accuratamente di decantare l'1-ottanolo direttamente nella bottiglia; le gocce di 1-ottanolo non devono cadere direttamente nell'acqua.

42. Una volta iniziata la fase di agitazione, aumentare lentamente la velocità. Qualora non sia possibile regolare adeguatamente i motori dell'agitatore, si consideri il ricorso ad un trasformatore. La velocità di agitazione deve essere regolata in modo da creare un vortice nell'interfaccia acqua/1-ottanolo di profondità massima compresa tra 0,5 e 2,5 cm. Occorre diminuire la velocità di agitazione se la profondità del vortice supera 2,5 cm; altrimenti si possono formare microgoccioline di 1-ottanolo nella fase acquosa che determinano una sovrastimazione della concentrazione della sostanza in esame nell'acqua. Sulla base dei risultati di una prova interlaboratorio di convalida (5), si raccomanda di applicare una velocità massima di agitazione di 2,5 cm. Ciò rappresenta un compromesso che permette di giungere rapidamente all'equilibrio pur limitando la formazione di microgoccioline di 1-ottanolo.

▼M4

Prelievo e trattamento dei campioni

43. Prima di effettuare i prelievi, spegnere l'agitatore e attendere che i liquidi si immobilizzino. Una volta effettuato il campionamento, riavviare delicatamente l'agitatore, come sopra descritto, e quindi aumentare progressivamente la velocità di agitazione.

44. I campioni di fase acquosa sono prelevati da un rubinetto posto alla base del recipiente di reazione. Scartare sempre il volume morto di acqua contenuto nei rubinetti (circa 5 ml per il contenitore illustrato nell'appendice 2). L'acqua contenuta nei rubinetti non è stata sottoposta ad agitazione e non è pertanto in equilibrio con il resto del liquido. Prendere nota del volume dei campioni di acqua e, al momento di determinare il bilancio di massa, assicurarsi di tener conto della quantità di sostanza di prova presente nell'acqua eliminata. Ridurre al minimo le perdite dovute a evaporazione facendo scorrere delicatamente l'acqua nell'imbuto separatore in modo da non perturbare lo strato acqua/1-ottanolo.

45. I campioni di 1-ottanolo sono ottenuti aspirando una piccola parte (circa 100 µl) dello strato di 1-ottanolo con una siringa da 100 µl in vetro e metallo, evitando accuratamente di agitare l'interfaccia. Prendere nota del volume di liquido prelevato. È sufficiente una piccola quota, dato che il campione di 1-ottanolo sarà diluito.

46. Si devono evitare i trasferimenti inutili dei campioni. A tal fine è opportuno determinare il volume dei campioni mediante analisi gravimetrica. Nel caso di campioni di acqua, il volume è determinato mediante la raccolta del campione in un imbuto di separazione che contiene già il volume di solvente richiesto.

DATI E RELAZIONE

47. Nel presente metodo di prova il valore P_{OW} è determinato effettuando tre esperimenti ad agitazione lenta (tre unità sperimentali) con il composto in esame, in condizioni sperimentali identiche. La regressione utilizzata per dimostrare il raggiungimento dell'equilibrio deve basarsi sui risultati di almeno quattro determinazioni C_O/C_W effettuate in momenti consecutivi. Ciò consente di calcolare la varianza, come misura dell'incertezza del valore medio ottenuto in ciascuna unità sperimentale.

48. Il P_{OW} può essere caratterizzato dalla varianza dei dati ottenuti in ciascuna unità sperimentale. Tali informazioni sono utilizzate per calcolare il P_{OW} come la media ponderata dei risultati di ciascuna unità sperimentale. A tal fine, come coefficiente di ponderazione è utilizzato l'inverso della varianza dei risultati delle unità sperimentali. Di conseguenza, i dati che presentano una accentuata variazione (espressa in termini di varianza), e che sono pertanto meno affidabili, incideranno in misura minore sul risultato finale rispetto ai dati con varianza limitata.

49. La deviazione standard ponderata è calcolata in modo analogo. Caratterizza la ripetibilità della misurazione del P_{OW}. Una deviazione standard ponderata con valore basso sta a indicare una ripetibilità elevata della determinazione del P_{OW} in uno stesso laboratorio. L'elaborazione statistica formale dei dati è riassunta come illustrato qui di seguito.

▼M4

Trattamento dei risultati

Dimostrazione del conseguimento dell'equilibrio

50. Il logaritmo della relazione delle concentrazioni della sostanza in esame in 1-ottanolo e in acqua (log C_O/C_W) è calcolato per ciascun tempo di prelievo. Il raggiungimento dell'equilibrio chimico si dimostra tracciando una curva di questa relazione in funzione del tempo. Una fase di plateau in questo tracciato, in corrispondenza di almeno quattro punti consecutivi sull'asse del tempo, indica che l'equilibrio è stato raggiunto e che il composto è completamente disciolto in 1-ottanolo. In caso contrario, si deve proseguire la prova fino ad ottenere, per quattro punti consecutivi sull'asse del tempo, una pendenza non significativamente diversa da zero per un livello p uguale a 0,05, che dimostra che il log C_O/C_W è indipendente dal tempo.

Calcolo del log P_{OW}

51. Il valore del log P_{OW} dell'unità sperimentale corrisponde alla media ponderata del logaritmo C_O/C_W per la parte della curva del logaritmo C_O/C_W in funzione del tempo per la quale è stato dimostrato che l'equilibrio è stato raggiunto. Questa media è calcolata ponderando i dati con l'inverso della varianza, in modo che l'influenza dei dati sul risultato finale sia inversamente proporzionale alla loro incertezza.

Media del log P_{OW}

52. Il valore medio del log P_{OW} di varie unità sperimentali corrisponde alla media dei risultati di ciascuna unità sperimentale ponderati con le loro rispettive varianze.

Il calcolo è effettuato secondo la formula seguente:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

dove:

$\log P_{OW,i}$ = valore log P_{OW} di ciascuna unità sperimentale i;

$\log P_{OW,Av}$ = valore medio ponderato di ciascuna determinazione di log P_{OW};

w_i = ponderazione statistica attribuita al valore log P_{OW} dell'unità sperimentale i.

L'inverso della varianza del log $P_{OW,i}$ è utilizzata come $w_i[w_i = (\text{varlog } P_{OW,i}^{-1})]$.

53. La stima dell'errore della media del log P_{OW} corrisponde alla ripetibilità del log C_O/C_W determinato durante la fase di equilibrio in ciascuna unità sperimentale. È espressa come la deviazione ponderata standard del $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) che a sua volta misura l'errore associato al log $P_{OW,Av}$. La deviazione ponderata può essere calcolata a partire dalla varianza ponderata ($var_{\log Pow,Av}$) nel modo seguente:

$$var_{\log Pow,Av} = (Sw_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (Sw_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

dove «n» rappresenta il numero di unità sperimentali.

▼M4

Relazione sulla prova

54. La relazione sulla prova deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza in esame:

— nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale (eventualmente, con indicazione della posizione in caso di sostanze radiomarcate) e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. paragrafo 17),

— purezza (impurità) della sostanza in esame,

— purezza radiochimica delle sostanze marcate e attività molare (se del caso),

— stima preliminare del log P_{OW} e metodo utilizzato per calcolare questo valore.

Condizioni sperimentali:

— date di realizzazione degli studi,

— temperatura nel corso dell'esperimento,

— volumi di 1-ottanolo e di acqua all'inizio della prova,

— volumi dei campioni di 1-ottanolo e di acqua prelevati,

— volumi di 1-ottanolo e di acqua che restano nei recipienti di prova,

— descrizione dei recipienti di prova e delle condizioni di agitazione (la geometria della barra di agitazione e del recipiente di prova, altezza del vortice in mm, e quando disponibile:

— metodi analitici utilizzati per determinare la sostanza in esame e loro limite di quantificazione,

— tempi di campionamento,

— pH della fase acquosa e tamponi utilizzati quando si regola il pH in presenza di molecole ionizzabili,

— numero di ripetizioni.

Risultati:

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici usati,

— concentrazioni della sostanza di prova determinate in 1-ottanolo e in acqua in funzione del tempo,

— dimostrazione del bilancio di massa,

— temperatura e deviazione standard della temperatura o intervallo delle temperature, durante la prova,

— regressione del rapporto delle concentrazioni in funzione del tempo,

— valore medio del log $P_{ow,Av}$ e suo errore standard,

— analisi e interpretazione dei risultati,

▼M4

— esempi di dati grezzi di analisi rappresentative (tutti i dati grezzi devono essere conservati conformemente alle buone pratiche di laboratorio), in particolare il tasso di recupero dei surrogati, il numero di livelli utilizzato nella calibrazione (oltre ai criteri per il coefficiente di correlazione della curva di taratura) e risultati del GQ/CQ,

— se è disponibile: relazione di validazione del protocollo sperimentale (da citare nei riferimenti bibliografici).

BIBLIOGRAFIA:

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. Environ. Toxicol. Chem., 8: 499-512.

(2) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di partizione.

(3) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di partizione.

(4) OCSE (2000). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Parigi.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (P_{OW}) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OCSE (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Parigi.

(10) Capitolo A.6 del presente allegato, Idrosolubilità.

(11) Capitolo C.7 del presente allegato, Degradazione — Idrolisi della degradazione abiotica in funzione del pH.

(12) Capitolo C.4 — parti da II a VII (Metodi da A a F) del presente allegato, Determinazione della pronta biodegradabilità.

(13) Capitolo A.4 del presente allegato, Tensione di vapore.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther*. 14: 479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendice 1

Tabelle di calcolo dei volumi minimi di acqua richiesti per l'individuazione delle sostanze in esame con valori log P_{OW} diversi in fase acquosa

Ipotesi:

— Volume massimo di ciascuna aliquota = 10 % del volume totale; 5 aliquote = 50 % del volume totale

— Concentrazione delle sostanze in esame = $0,7 \times$ solubilità in ciascuna fase. Se le concentrazioni sono inferiori, si dovranno utilizzare volumi maggiori

— Volume utilizzato per la determinazione del limite di rivelabilità (LOD) = 100 ml

— Il rapporto del log P_{OW} in funzione di log S_W e del log P_{OW} in funzione di SR (solubilità relativa, S_{oct}/S_w) sono rappresentazioni ragionevoli dei rapporti per le sostanze in esame

Stima di S_w

log P_{ow}	equazione	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–3,192	6,427E-04

Stima di S_{oc}

log P_{ow}	equazione	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Massa totale della sostanza in esame (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcolo dei volumi

Volume minimo richiesto per la fase H_2O a ciascuna concentrazione del limite di rivelabilità (LOD)

$\log K_{ow}$	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume usato per LOD (l)	0,1					

Legenda

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 1 litro.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 2 litri.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 5 litri.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 10 litri.

Supera del 10 % anche il recipiente di equilibrazione da 10 litri.

▼M4

Tabella riassuntiva dei volumi necessari, in funzione della solubilità dell'acqua e del Log P_{OW}

Volume minimo richiesto per la fase H_2O ad ogni concentrazione LOD (ml)

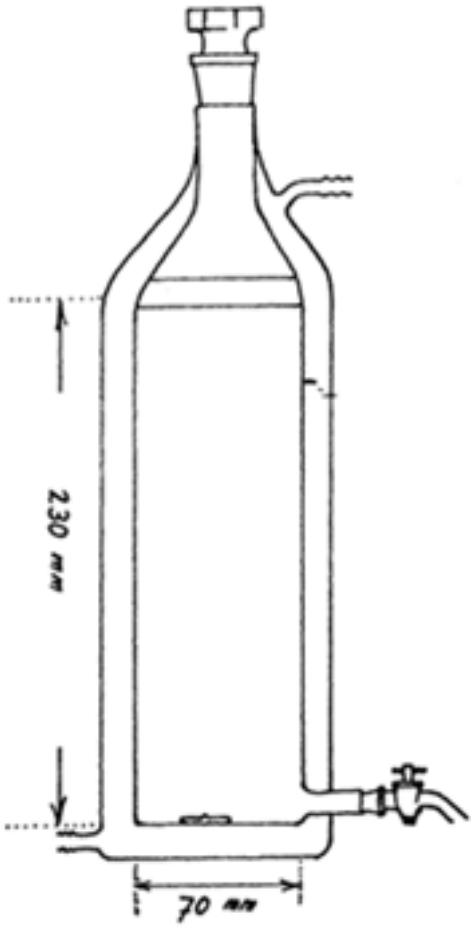
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume usato per la determinazione del LOD (l)		0,1					

Appendice 2

Esempio di recipiente di prova con rivestimento esterno in vetro per il metodo dell'agitazione lenta al fine di determinare il P_{OW}.



▼B

PARTE B: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ E DEGLI ALTRI EFFETTI SULLA SALUTE

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE

B.1 *bis*. TOSSICITÀ ORALE ACUTA — METODO A DOSE FISSA

B.1 *ter*. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

B.2. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE

B.3. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA CUTANEA

B.4. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA

B.5. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

B.6. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

B.7. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA ORALE NEI RODITORI

B.8. TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 28 GIORNI

B.9. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA CUTANEA

B.10. MUTAGENICITÀ — TEST *IN VITRO* DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA NEI MAMMIFERI

B.11. MUTAGENICITÀ — TEST *IN VIVO* DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUL MIDOLLO OSSEO DI MAMMIFERI

B.12. MUTAGENICITÀ — TEST *IN VIVO* SUI MICRONUCLEI NEGLI ERITROCITI DI MAMMIFERO

B.13/14. MUTAGENICITÀ — TEST DI REVERSIONE SU BATTERI

B.15. SAGGIO DI MUTAGENESI E PRESCREENING DI CANCEROGENESI MUTAZIONE GENICA: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. RICOMBINAZIONE MITOTICA: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17. MUTAGENICITÀ — TEST *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO

B.18. DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA: SINTESI NON PROGRAMMATA DEL DNA — CELLULE DI MAMMIFERO *IN VITRO*

B.19. SAGGIO DEGLI SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI *IN VITRO*

B.20. SAGGIO DEI LETALI RECESSIVI LEGATI AL SESSO: *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21.	SAGGIO *IN VITRO* DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO
B.22.	SAGGIO DEI LETALI DOMINANTI NEI RODITORI
B.23.	TEST DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO
B.24.	SAGGIO DELLE MACCHIE (SPOT TEST): TOPI
B.25.	TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO
B26.	TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI RODITORI
B.27.	TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI NON RODITORI
B.28	SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI
B.29	TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 90 GIORNI
B.30	STUDI DI TOSSICITÀ CRONICA
B.31.	STUDIO DI TOSSICITÀ PRENATALE
B.32	STUDI DI CANCEROGENESI
B.33	STUDI COMBINATI DI TOSSICITÀ CRONICA/CANCEROGENESI
B.34.	SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE
B.35.	STUDIO DI TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA A DUE GENERAZIONI
B.36.	TOSSICOCINETICA
B.37.	NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE DOPO ESPOSIZIONE ACUTA
B.38.	NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE: STUDIO CON SOMMINISTAZIONE RIPETUTA PER 28 GIORNI
B.39.	TEST *IN VIVO* DI SINTESI NON PROGRAMMATA DI DNA (UDS) SU CELLULE EPATICHE DI MAMMIFERO
B.40.	CORROSIONE CUTANEA *IN VITRO:* TEST DI RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA (TER)
B.40*bis*.	CORROSIONE CUTANEA *IN VITRO:* TEST SU MODELLI DI PELLE UMANA

▼**B**

B.41. SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY

B.43. STUDI DI NEUROTOSSICITÀ NEI RODITORI

B.44. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VIVO*

B.45. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VITRO*

B.46. IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: TEST SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

B.47. SAGGIO DI OPACITÀ E PERMEABILITÀ DELLA CORNEA NEI BOVINI (*BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY* – BCOP) PER L'IDENTIFICAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI

B.48. METODO DI PROVA SULL'OCCHIO ISOLATO DEI POLLI (ISOLATED CHICKEN EYE - ICE) PER L'IDENTIFICAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI

B.49. TEST DEL MICRONUCLEO IN VITRO CON CELLULE DI MAMMIFERO

B.50. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: DA

B.51. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: BrdU-ELISA

▼**M4**

B.52. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

▼B

INTRODUZIONE GENERALE

A. CARATTERIZZAZIONE DELLA SOSTANZA IN ESAME

Prima dell'inizio di qualsiasi studio di tossicità occorre conoscere la composizione della sostanza in esame, incluse le impurità principali e le proprietà fisico-chimiche pertinenti, compresa la stabilità.

Le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame forniscono informazioni importanti per la scelta della via di somministrazione, per la progettazione dei vari studi e per il trattamento e la conservazione della sostanza in esame.

L'elaborazione di un metodo analitico per la determinazione qualitativa e quantitativa della sostanza in esame (comprese, se possibile, le principali impurità) nel mezzo di dosaggio e nel materiale biologico deve precedere l'inizio dello studio.

Tutte le informazioni relative all'identificazione, alle proprietà fisico-chimiche, alla purezza e al comportamento della sostanza devono essere riportate nella relazione del saggio.

B. CURA DEGLI ANIMALI

Nei saggi di tossicità è indispensabile esercitare un rigoroso controllo delle condizioni ambientali e utilizzare tecniche adeguate per la cura degli animali.

(i) *Condizioni di alloggiamento*

Le condizioni ambientali nei locali o nei recinti degli animali da laboratorio devono essere appropriate per le specie sperimentali. Per ratti, topi e porcellini d'India è indicata una temperatura ambiente di 22 °C ±3 °C con un'umidità relativa del 30-70 %. Per i conigli, la temperatura deve essere di 20 ± 3 °C con un'umidità relativa del 30-70 %.

Talune tecniche sperimentali sono particolarmente sensibili agli effetti della temperatura e, in tali casi, la descrizione del metodo di saggio comprende indicazioni precise sulle condizioni adeguate. In tutti gli studi di tossicità, la temperatura e l'umidità devono essere controllate, registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

L'illuminazione deve essere artificiale ed alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Le condizioni di illuminazione devono essere dettagliatamente registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

Salvo nel caso in cui venga diversamente specificato nel metodo, gli animali dovranno essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. In questo caso il numero degli animali non dovrà essere superiore a cinque.

Nelle relazioni sugli esperimenti effettuati su animali dovranno essere indicati il tipo di gabbie utilizzate e il numero di animali alloggiati in ogni gabbia sia durante l'esposizione alla sostanza chimica che durante tutto il periodo successivo di osservazione.

▼B

(ii) *Condizioni di alimentazione*

La dieta deve soddisfare tutte le esigenze nutrizionali della specie utilizzata per il saggio. Qualora le sostanze in esame vengano somministrate agli animali nella loro dieta, il valore nutrizionale degli alimenti potrebbe essere ridotto per effetto dell'interazione tra la sostanza ed un costituente dietetico. Nell'interpretazione dei risultati dei saggi si dovrà tener conto di questa possibilità. Gli animali potranno essere nutriti con diete convenzionali da laboratorio ed abbeverati con acqua a sazietà. La scelta della dieta potrà essere condizionata dalla necessità di garantire un apporto adeguato della sostanza in esame, qualora essa venga somministrata con gli alimenti.

I contaminanti dietetici suscettibili di influenzare la tossicità non dovrebbero essere presenti in condizioni tali da causare interferenze.

C. **METODI ALTERNATIVI**

L'Unione europea è impegnata a sviluppare e collaudare tecniche alternative che consentano di ottenere lo stesso livello di informazioni degli attuali esperimenti su animali, riducendo tuttavia il numero di animali utilizzati e le sofferenze ad essi inflitte o evitando del tutto il ricorso agli animali.

Non appena perfezionati, tali metodi dovranno costituire, ove possibile, la scelta d'elezione per gli studi miranti alla caratterizzazione dei rischi e alla conseguente classificazione ed etichettatura delle sostanze in funzione dei rischi intrinseci.

D. **VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE**

Nella valutazione ed interpretazione dei saggi occorre tener conto dei limiti entro i quali i risultati di studi su animali e in vitro possono essere estrapolati direttamente all'uomo; laddove si abbia evidenza di effetti avversi per l'uomo, questa potrà essere utilizzata per confermare i risultati sperimentali.

E. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

La maggior parte di detti metodi è stata messa a punto nell'ambito del programma per la definizione di linee guida elaborato dall'OCSE in materia di saggi. Essi dovranno essere applicati in conformità con i principi delle buone pratiche di laboratorio allo scopo di garantire il più possibile il «reciproco riconoscimento dei dati».

Ulteriori informazioni sono reperibili nei riferimenti citati nelle linee guida dell'OCSE e nell'ampia letteratura esistente in materia.

▼B

B.1. *bis.* **TOSSICITÀ ORALE ACUTA — METODO A DOSE FISSA**

1. **METODO**

Questo metodo di prova è equivalente al metodo OCSE TG 420 (2001)

1.1. INTRODUZIONE

I metodi tradizionali di valutazione della tossicità acuta utilizzano come *endpoint* la morte degli animali. Nel 1984, la *British Toxicology Society* ha proposto un nuovo metodo, basato sulla somministrazione di una serie di dosi fisse (1), che invece di utilizzare come *endpoint* la morte degli animali prevede l'osservazione di segni evidenti di tossicità in seguito alla somministrazione di una dose facente parte di una serie prestabilita. In seguito a studi di validazione *in vivo* eseguiti nel Regno Unito (2) e a livello internazionale (3), il procedimento è stato adottato come metodo di prova nel 1992. Successivamente, le proprietà statistiche del metodo a dose fissa sono state oggetto di valutazione in una serie di studi basati sull'impiego di modelli matematici (4)(5)(6). Sia gli studi *in vivo* sia quelli di modellizzazione hanno dimostrato che il procedimento è riproducibile, utilizza un minor numero di animali provocando meno sofferenze rispetto ai metodi tradizionali, e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di prova della tossicità acuta.

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per un determinato scopo, si rimanda alle linee guida OCSE sui test di tossicità orale acuta (7), che contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del metodo di prova B.1 *bis*.

Il metodo prevede che nello studio principale si utilizzino solo dosi a moderata tossicità, evitando di somministrare dosi che possano avere un effetto letale. Inoltre non è necessario somministrare dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto dell'azione corrosiva o fortemente irritante. Gli animali moribondi o che manifestano dolore evidente o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e ai fini dell'interpretazione dei risultati devono essere assimilati agli animali morti durante lo svolgimento del test. I criteri da applicare per decidere la soppressione degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di specifiche linee guida, che indicano anche come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (8).

Il metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il GHS *(Global Harmonized System),* sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9).

Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza, i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini, l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza del test per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità orale acuta: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose o di più dosi di una sostanza nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente, durante il periodo di osservazione di 14 giorni.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale sottoposto al test (ad es. mg/kg).

Tossicità manifesta: termine generale che indica la presenza di chiari segni di tossicità in seguito alla somministrazione della sostanza di prova [per alcuni esempi, cfr. (3)], tali da far prevedere alla dose fissa immediatamente superiore manifestazioni di dolore intenso e segni persistenti di grave sofferenza, uno stato di agonia [i criteri che definiscono tale stato sono illustrati nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)] o la morte della maggior parte degli animali.

GHS (Globally Harmonized System): sistema armonizzato globale per la classificazione delle sostanze e delle miscele chimiche. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute umana e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle merci pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'Organizzazione internazionale del lavoro (comunicazione del rischio), coordinata dal programma IOMC per la gestione ottimale delle sostanze chimiche *(Inter-organization programme for the sound management of chemicals).*

Morte imminente: stato in cui si prevede l'agonia o la morte dell'animale prima della successiva osservazione in programma. Per i roditori tra i segni indicativi di morte imminente figurano le convulsioni, la posizione laterale o prona e il tremore [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

DL_{50} (dose letale 50): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, capace di provocare la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} viene espresso in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il test (2 000 o 5 000 mg/kg).

Stato di agonia: fase in cui l'animale è moribondo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n.(8)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, come ad esempio l'incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

La sostanza viene somministrata a gruppi di animali dello stesso sesso seguendo un procedimento articolato in più fasi successive che prevede la somministrazione di dosi fisse di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (in casi eccezionali può essere prevista una dose fissa aggiuntiva di 5 000 mg/kg: cfr. punto 1.6.2). Il livello di dose iniziale è scelto sulla base di uno studio di osservazione, ed è la dose alla quale si prevede che si manifestino alcuni segni di tossicità, senza tuttavia causare effetti tossici gravi o la morte degli animali. I segni clinici e le condizioni associate a dolore, sofferenza e morte imminente sono descritti in apposite linee guida OCSE (8). A seconda della presenza o dell'assenza di segni di tossicità o mortalità, la sostanza in esame può essere somministrata ad altri gruppi di animali a dosi superiori o inferiori. La procedura prosegue fino a quando viene identificata la dose che causa tossicità manifesta o la morte di un solo animale o fino alla somministrazione della dose più elevata, se non vengono riscontrati effetti, mentre viene immediatamente interrotta se si verificano decessi alla dose più bassa.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.4.1. **Scelta delle specie animale**

È preferibile utilizzare il ratto, ma è possibile ricorrere anche ad altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (7), perché la letteratura esistente sui test convenzionali DL_{50} indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (10). Tuttavia se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche strutturalmente affini indicano la probabilità che i maschi siano più sensibili delle femmine, si devono utilizzare animali di sesso maschile. In quest'ultimo caso, occorre fornire un'adeguata giustificazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani, appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. All'inizio del trattamento ciascun animale deve avere un'età compresa tra 8 e 12 settimane ed un peso del ± 20 % del peso medio degli animali a cui è già stata somministrata la sostanza.

1.4.2. **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose somministrata, ma il numero di animali per gabbia non deve impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3. **Preparazione degli animali**

Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

▼B

1.4.4. **Preparazione delle dosi**

In genere la sostanza di prova va somministrata a volume costante per tutte le dosi, variando la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il test viene eseguito su prodotti o miscele allo stato liquido, ai fini della valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; alcune autorità di regolamentazione impongono obbligatoriamente l'uso della sostanza non diluita. In ogni caso, non deve essere superato il volume massimo della dose somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale, e nei roditori non deve di norma superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa, seguita in ordine di preferenza da una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) e infine da una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e ritenuta accettabile.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da esaminare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o apposita cannula per intubazione. Nel remoto caso in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, ques'ultima può essere frazionata e somministrata in un arco di tempo non superiore a 24 ore.

Prima della somministrazione della sostanza gli animali devono essere tenuti a digiuno (ad esempio, l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente per i ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, l'alimentazione può essere sospesa per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, a seconda della durata del periodo di somministrazione può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali.

1.5.2. **Studio di osservazione**

Lo scopo dello studio di osservazione è di consentire la scelta della giusta dose iniziale per lo studio principale. La sostanza in esame viene somministrata in maniera sequenziale a singoli animali, secondo il diagramma di flusso riportato nell'allegato 1. Lo studio di osservazione si conclude quando è possibile decidere la dose iniziale da utilizzare nello studio principale (o se la dose fissa più bassa provoca la morte di un animale).

La dose iniziale da utilizzare nello studio di osservazione, scelta tra i livelli di dose fissi di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, è la dose che si prevede possa provocare tossicità manifesta sulla base, ove possibile, di dati *in vivo* e *in vitro* relativi alla stessa sostanza chimica e a sostanze di struttura affine. In mancanza di questi dati, si utilizza una dose iniziale di 300 mg/kg.

Tra le somministrazioni a ciascun animale devono trascorrere almeno 24 ore. Tutti gli animali devono essere tenuti in osservazione per almeno 14 giorni.

▼B

In casi eccezionali, e solo se giustificato da specifiche esigenze normative, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso pari a 5 000 mg/kg (cfr. allegato 3). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alla dose stabilita per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di questa dose va preso in considerazione solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute umana o animale o per la protezione dell'ambiente.

Se la somministrazione della dose fissa più bassa (5 mg/kg) provoca la morte dell'animale nel corso dello studio di osservazione, la procedura normale prevede l'interruzione dello studio e l'assegnazione della sostanza alla categoria GHS 1 (cfr. allegato 1). Tuttavia, qualora sia necessaria un'ulteriore conferma della classificazione, può essere utilizzata la seguente procedura supplementare facoltativa: la sostanza viene somministrata a un secondo animale alla dose di 5 mg/kg; se questo secondo animale muore, viene confermata la classificazione nella categoria GHS 1 e lo studio viene immediatamente interrotto; se invece sopravvive, la sostanza viene somministrata alla dose di 5 mg/kg a non più di altri tre animali. A causa dell'elevato rischio di mortalità, per proteggere gli animali la sostanza esaminata deve essere somministrata in maniera sequenziale. L'intervallo di tempo tra le somministrazioni ai diversi animali deve essere sufficiente ad accertare che l'animale trattato in precedenza riesca a sopravvivere. Se si verifica un secondo decesso, la sequenza deve essere immediatamente interrotta e la sostanza non deve essere somministrata ad altri animali. Dal momento che il verificarsi di un secondo decesso (indipendentemente dal numero di animali a cui è già stata somministrata la sostanza al momento dell'interruzione) rientra nel risultato A (2 o più decessi), si applica la regola di classificazione di cui all'allegato 2 alla dose fissa di 5 mg/kg (categoria 1 se vi sono 2 o più morti o categoria 2 se c'è un'unica morte). L'allegato 4 riporta la classificazione prevista dal sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

1.5.3. **Studio principale**

1.5.3.1. *Numero di animali e livelli di dose*

I diagrammi di flusso di cui all'allegato 2 illustrano le tappe da seguire dopo la somministrazione del livello di dose iniziale. Vi sono tre possibilità: interrompere il test e assegnare la sostanza alla classe di rischio appropriata; effettuare il test a una dose fissa superiore; effettuare il test a una dose fissa inferiore. Tuttavia, per salvaguardare gli animali, se un livello di dose ha causato la morte di un animale durante lo studio di osservazione, questo livello non deve più essere utilizzato nello studio principale (cfr. allegato 2). L'esperienza indica che dopo la somministrazione del livello di dose iniziale in genere è possibile classificare la sostanza senza bisogno di effettuare ulteriori test.

Per ciascun livello di dose, normalmente si usano in tutto cinque animali dello stesso sesso: l'animale a cui nello studio di osservazione è stato somministrato lo stesso livello di dose, più altri quattro animali (tranne nel caso remoto in cui un livello di dose utilizzato nello studio principale non sia stato incluso nello studio di osservazione).

L'intervallo di tempo tra le somministrazioni dei vari livelli di dose ai diversi animali viene determinato in funzione della comparsa, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere alla somministrazione della dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente. Si consiglia di far trascorrere, se necessario, 3 o 4 giorni tra le somministrazioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non convincenti.

▼B

Quando si prevede di utilizzare una dose fissa superiore di 5 000 mg/kg, è necessario attenersi alla procedura descritta nell'allegato 3 (cfr. anche punto 1.6.2).

1.5.3.2. *Saggio limite*

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame non è probabilmente tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da test su composti, miscele o prodotti simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza sono scarse o nulle o si prevede che la sostanza in esame sia tossica occorre eseguire lo studio principale.

Ai fini delle presenti linee-guida, per il saggio limite si utilizza, seguendo il procedimento normale, una dose iniziale di 2 000 mg/kg (o in casi eccezionali 5 000 mg/kg) nello studio di osservazione, quindi si somministra la stessa dose ad altri quattro animali.

1.6. OSSERVAZIONI

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, prestando particolare attenzione alle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni, a meno che non muoiano o non sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per risparmiare loro sofferenze eccessive. Tuttavia, la durata del periodo di osservazione non è tassativa, ma va stabilita in funzione della natura delle reazioni tossiche, del momento della loro comparsa e dei tempi di recupero e può quindi essere prolungata in caso di necessità. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se questi ultimi tendono ad apparire tardivamente (11). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità sono necessarie ulteriori osservazioni, che devono riguardare le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al punto (8). Gli animali agonizzanti o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, occorre registrare con la massima precisione possibile il momento del decesso.

1.6.1. **Peso corporeo**

1 singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza di prova e in seguito almeno una volta alla settimana. Occorre calcolare e registrare le variazioni ponderali. Al termine del test, gli animali sopravvissuti devono essere pesati prima di essere sottoposti a eutanasia.

▼B

1.6.2. **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del test e quelli che sono ritirati dallo studio per risparmiare loro eccessive sofferenze) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, può essere opportuno l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti, che potrebbe fornire indicazioni utili.

2. **DATI**

Occorre fornire risultati individuali per ciascun animale. Tutti i dati devono essere riassunti in una tabella nella quale devono essere indicati per ciascun gruppo sottoposto al test il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il test o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici, il loro decorso e l'eventuale reversibilità e i risultati della necroscopia.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza di prova:

— natura fisica, purezza e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione),

— dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se pertinente):

— motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

— specie/ceppo utilizzato,

— condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note,

— numero, età e sesso degli animali (compresa l'eventuale giustificazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine),

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta ecc.

Condizioni del test:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza di prova, comprese informazioni sullo stato fisico del preparato somministrato,

— modalità di somministrazione della sostanza di prova, compreso il volume delle dosi e l'orario di somministrazione,

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza degli alimenti, provenienza dell'acqua),

— motivazione della scelta della dose iniziale.

▼B

Risultati:

— tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti),

— tabella del peso corporeo e delle variazioni ponderali,

— peso dei singoli animali nel giorno della somministrazione, e in seguito ad intervalli di una settimana e al momento della morte o del sacrificio,

— data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato,

— momento della comparsa dei segni di tossicità, decorso ed eventuale reversibilità per ciascun animale,

— referto necroscopico e referto istopatologico per ciascun animale, se disponibili.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). *Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity.* Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). *Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity.* Human Toxicol., 62, 79-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). *The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test.* Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). *Statistical evaluation of the fixed-dose procedure.* Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). *Reducing numbers in the fixed-dose procedure.* Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). *Statistical evaluation ofthe revised fixed dose procedure.* Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use ofClinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

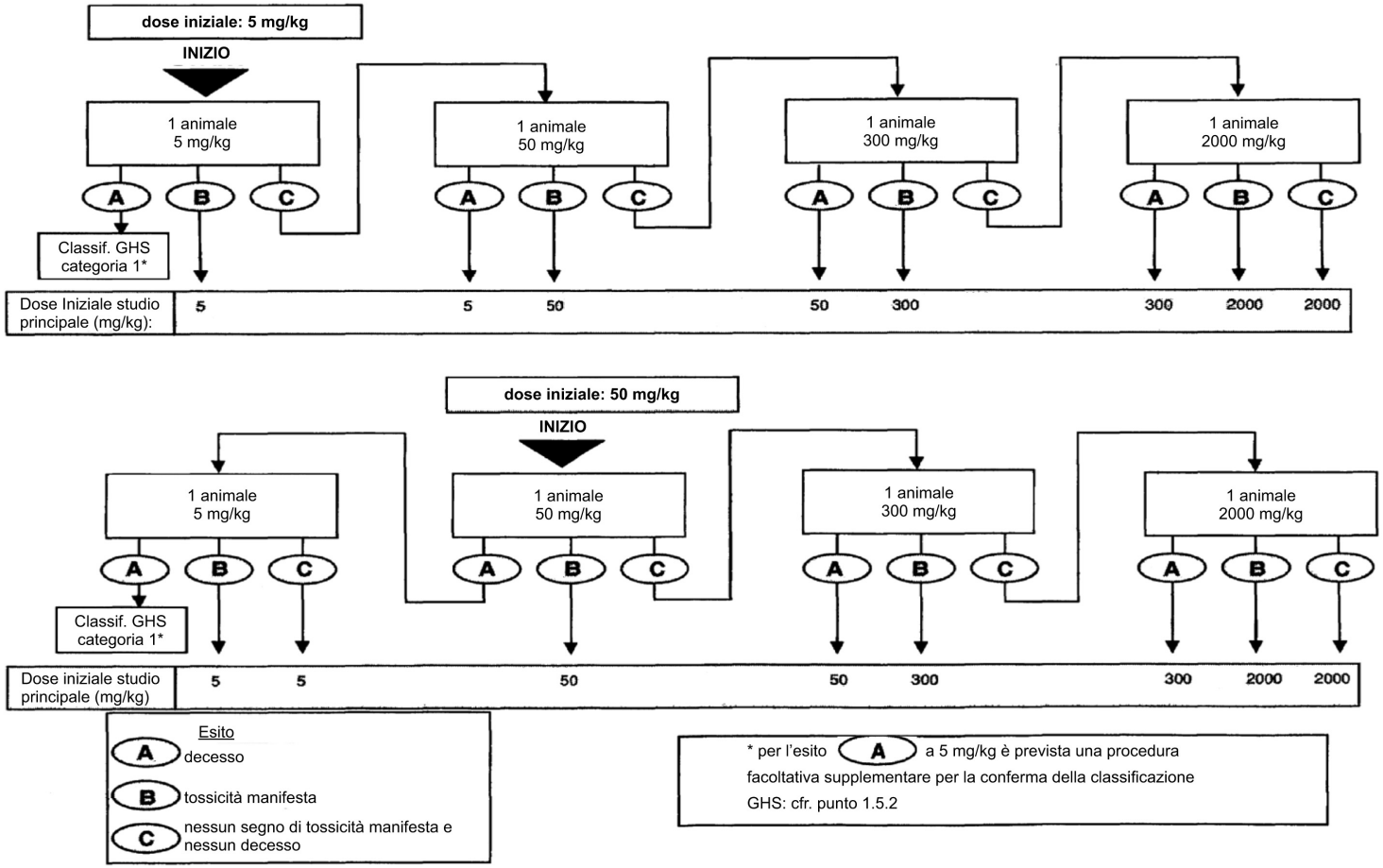
(9) OECD (1998). *Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* Approvato alla 28ª riunione congiunta del Chemicals Committee e del Working Party on Chemicals nel novembre 1998, parte 2, pag. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no- 0,FF.html].

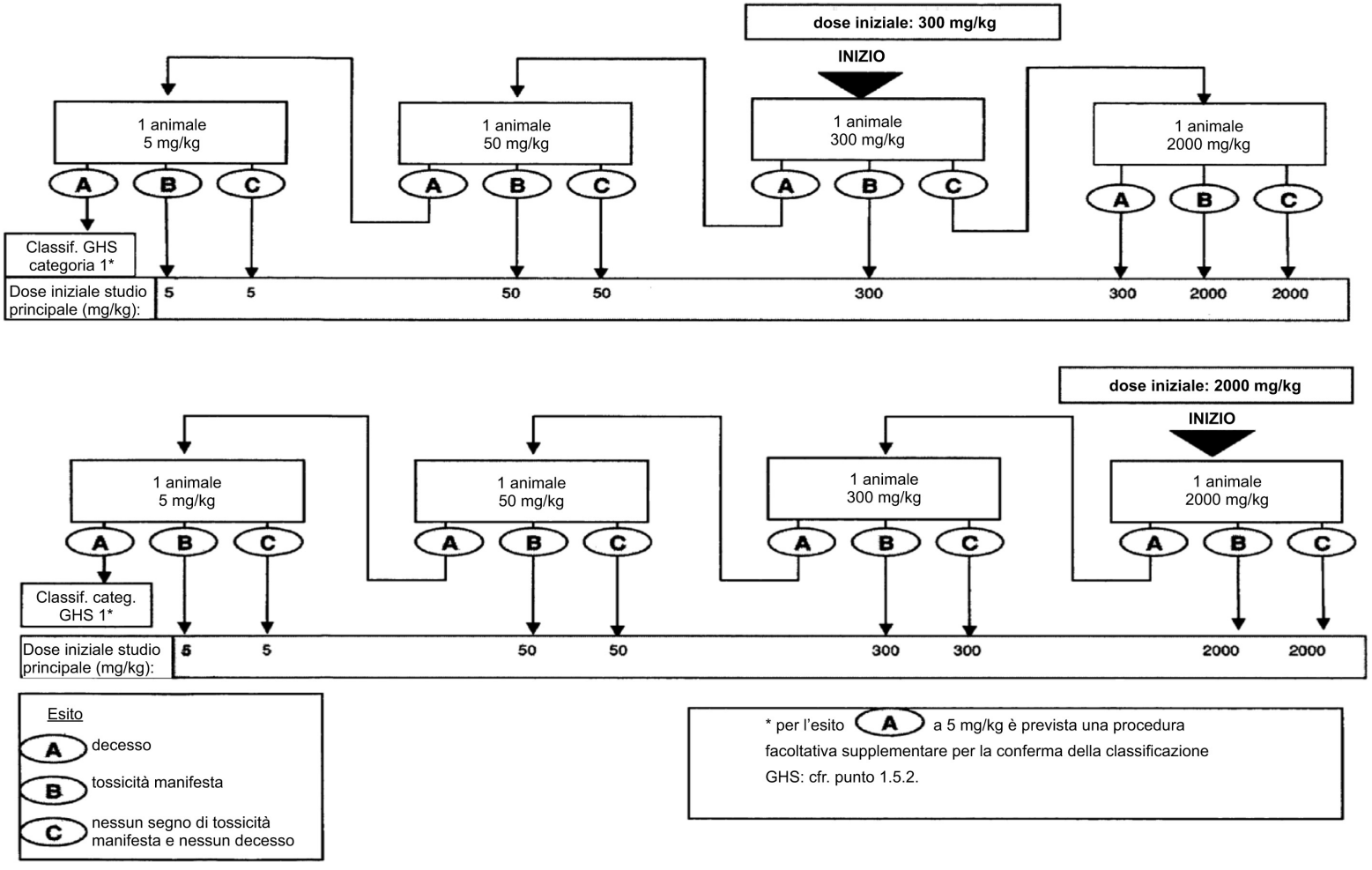
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). *Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures.* Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Cap. 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, in A.W. Hayes (a cura di), *Principles and Methods of Toxicology,* terza edizione, Raven Press, Ltd. New York, USA.

ALLEGATO 1:

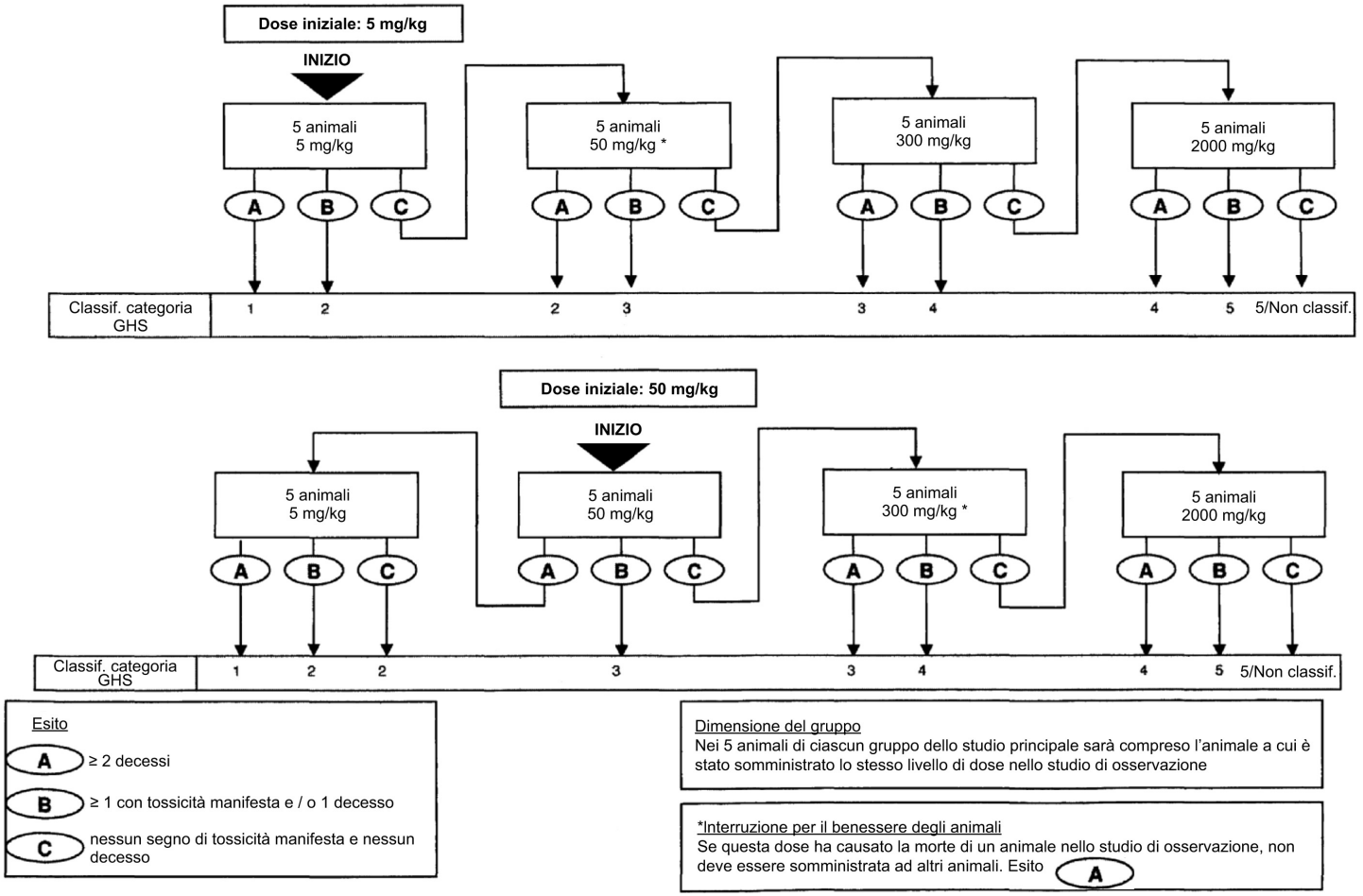
DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO DI OSSERVAZIONE

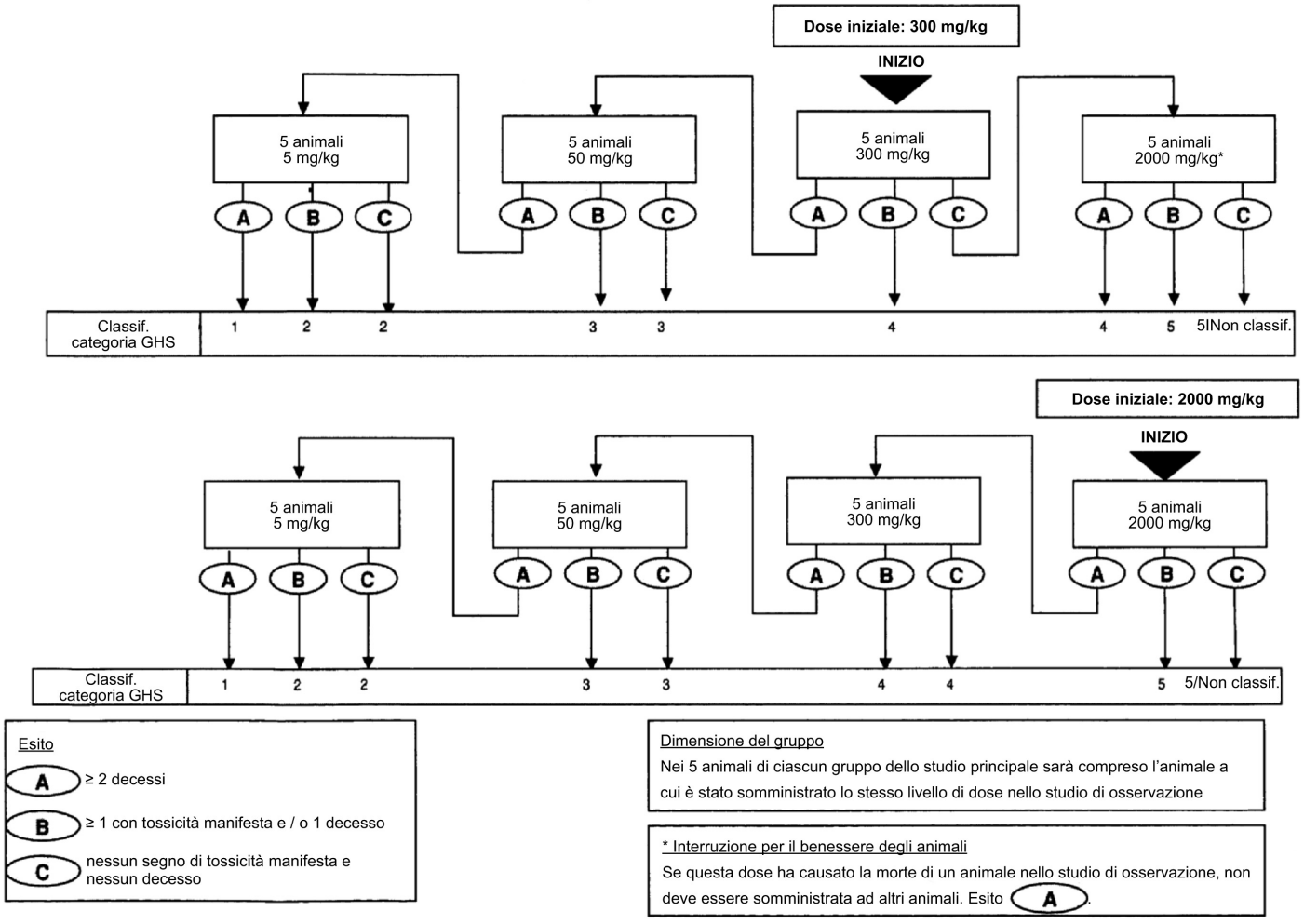



dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
1 animale 5 mg/kg
1 animale 50 mg/kg
1 animale 300 mg/kg
1 animale 2000 mg/kg
A B C
Classif. GHS categoria 1*
Dose iniziale studio principale (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
1 animale 5 mg/kg
1 animale 50 mg/kg
1 animale 300 mg/kg
1 animale 2000 mg/kg
A B C
Classif. categ. GHS 1*
Dose iniziale studio principale (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Esito
A decesso
B tossicità manifesta
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
* per l'esito A a 5 mg/kg è prevista una procedura facoltativa supplementare per la conferma della classificazione GHS: cfr. punto 1.5.2.

ALLEGATO 2:

DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO PRINCIPALE




Dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg*
A B C
Classif. categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5INon classif.
Dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg
Classif. categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Non classif.
Esito
A ≥ 2 decessi
B ≥ 1 con tossicità manifesta e / o 1 decesso
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
Dimensione del gruppo
Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione
* Interruzione per il benessere degli animali
Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito A.

▼B

Allegato 3

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI PREVISTI DI LD_{50} SUPERIORI A 2 000 MG/KG PER LE QUALI NON È NECESSARIO ESEGUIRE IL TEST DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 servono a consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che in determinate circostanze possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze per le quali è prevista una DL_{50} orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei seguenti casi:

a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 2 porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;

b) se sono già disponibili prove attendibili che indicano che la DL_{50} si situa nell'intervallo di valori della categoria 5 o se altri studi su animali o sugli effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per la salute umana;

c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione ad una classe di rischio superiore, e se:

   — sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o

   — si osserva mortalità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o

   — i pareri degli esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o

   — i pareri degli esperti confermano l'esistenza di informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

ESECUZIONE DEL TEST A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg. Al fine di proteggere gli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose di 5 000 mg/kg, che va presa in considerazione solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli animali o degli esseri umani.

Studio di osservazione

Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 1 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio di osservazione si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (decesso) si effettua il test su un secondo animale a 2 000 mg/kg; in caso di esito B o C (tossicità manifesta o nessun segno di tossicità) si può scegliere la dose di 5 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito B o C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A si utilizza la dose di 2 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale; in caso di esito B o C si utilizza la dose di 5 000 mg/kg

▼B

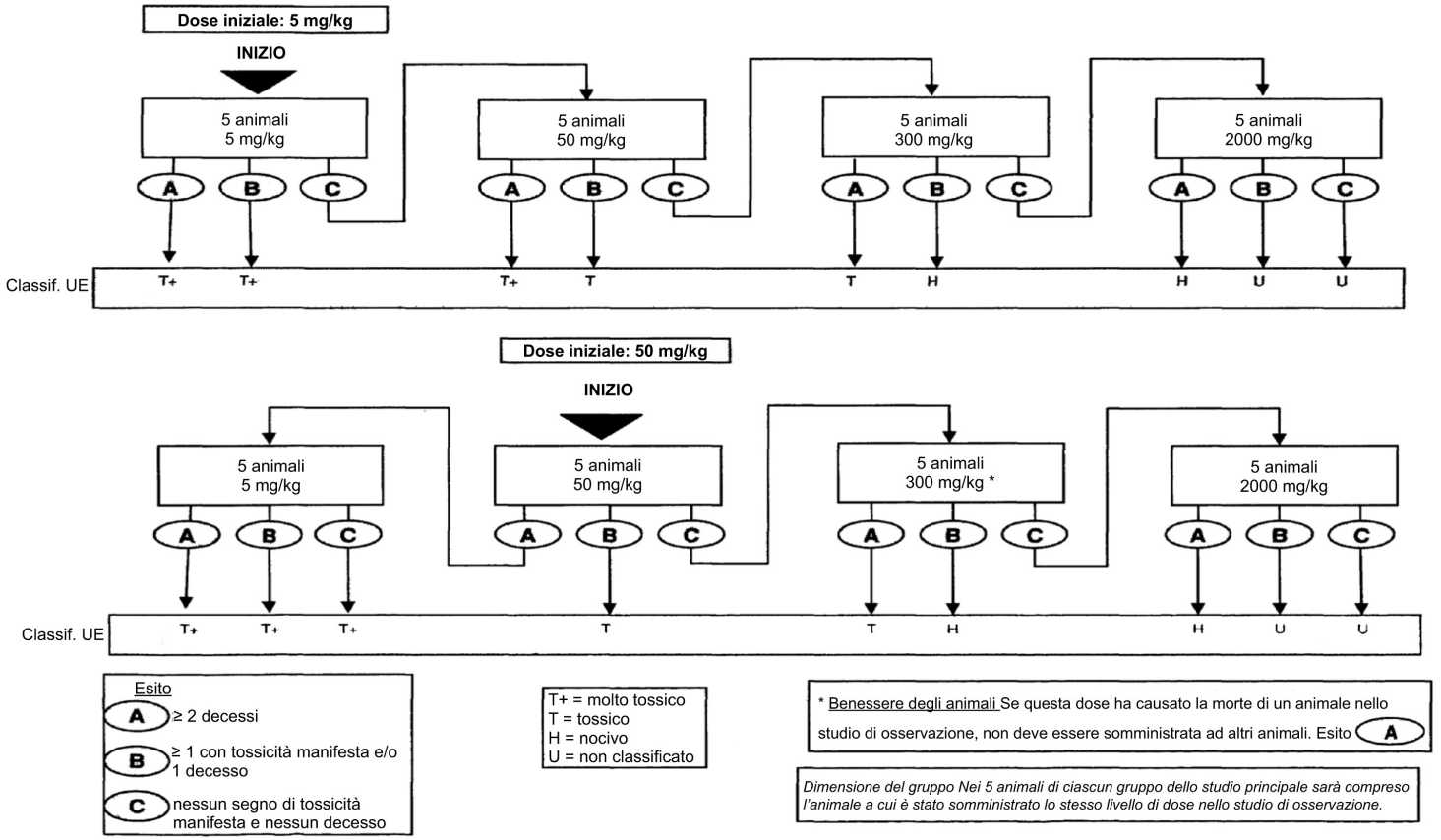
Studio principale

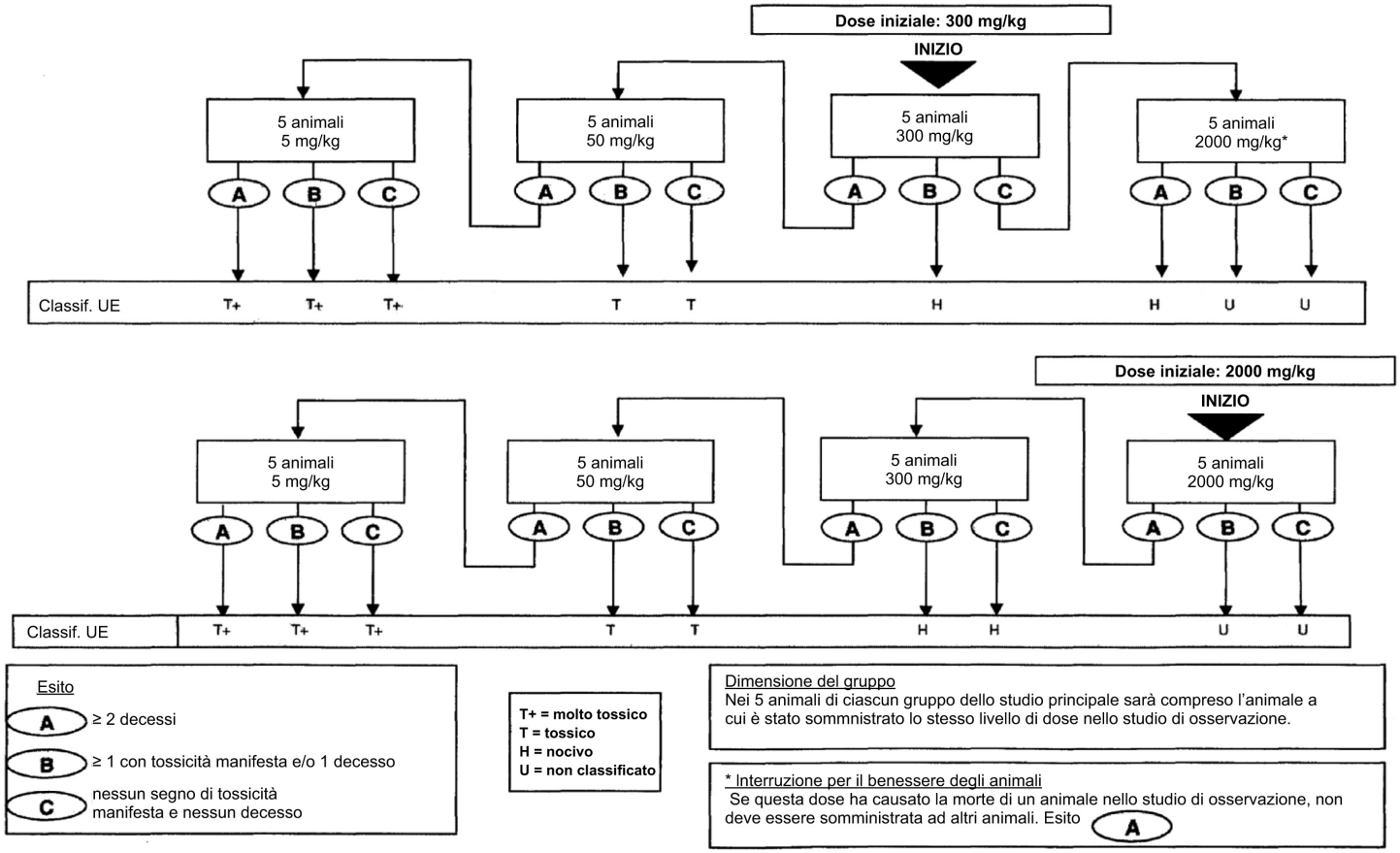
Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 2 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio principale si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (≥ 2 decessi) è necessario effettuare il test su un secondo gruppo a 2 000 mg/kg; in caso di esito B (tossicità evidente e/o ≤ 1 decesso) o C (nessun segno di tossicità) la sostanza non viene classificata nel sistema GHS. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A la sostanza è assegnata alla categoria 5 GHS, in caso di esito B o C la sostanza non è classificata.

Allegato 4

METODO DI PROVA B.1 *bis*

Guida alla classificazione transitoria UE in attesa dell'effettiva attuazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [cfr. riferimento bibliografico n. (8)]




Dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg*
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Esito
A ≥ 2 decessi
B ≥ 1 con tossicità manifesta e/o 1 decesso
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
T+ = molto tossico
T = tossico
H = nocivo
U = non classificato
Dimensione del gruppo
Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione.
* Interruzione per il benessere degli animali
Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito A

▼B

B.1*ter*. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

1. METODO

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

Il metodo della classe di tossicità acuta (1) qui descritto è un procedimento articolato in più fasi successive che prevede l'uso di 3 animali dello stesso sesso in ogni fase. In media, per valutare la tossicità acuta di una sostanza sono necessarie 2-4 fasi, in funzione del numero di animali morti e/o moribondi. Il procedimento è riproducibile, utilizza un numero molto limitato di animali e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di determinazione della tossicità acuta. Il metodo della classe di tossicità acuta si basa su valutazioni biometriche (2)(3)(4)(5) e utilizza dosi fisse, opportunamente separate, per consentire la classificazione della sostanza ai fini dell'assegnazione a una particolare categoria e della valutazione dei rischi. Il metodo, adottato nel 1996, è stato ampiamente convalidato *in vivo* mediante dati sulla DL_{50} ricavati dalla letteratura esistente, sia a livello nazionale (6) che a livello internazionale (7).

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per scopi specifici, si rimanda al documento orientativo sui saggi di tossicità acuta per via orale dell'OCSE (8). Tale documento contiene anche ulteriori informazioni sull'applicazione e sull'interpretazione del metodo di saggio B.1 *ter*.

Non è necessario somministrare le sostanze da esaminare in dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto delle proprietà corrosive o fortemente irritanti delle sostanze stesse. Ai fini dell'interpretazione dei risultati del saggio, gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e assimilati agli animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito al sacrificio degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno specifico documento orientativo, che riporta anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (9).

Il metodo utilizza dosi prestabilite e i risultati che se ne ricavano permettono di classificare la sostanza esaminata conformemente al sistema armonizzato su scala mondiale (GHS) per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (10).

In linea di principio, il metodo non ha lo scopo di determinare una DL_{50} precisa, ma consente di stabilire range di esposizione verosimilmente letali: la morte di una certa percentuale di animali, infatti, costituisce ancora l'endpoint principale di questo saggio. Il metodo consente di determinare un valore di DL_{50} solo quando almeno due dosi provocano una mortalità superiore allo 0 % e inferiore al 100 %. L'uso di dosi prestabilite, indipendentemente dalla sostanza in esame, e la classificazione esplicitamente legata al numero di animali osservati in diversi stati favoriscono la congruenza e la ripetibilità dei dati presentati dai vari laboratori.

▼B

Il laboratorio che esegue il saggio deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di effettuare lo studio. Tali informazioni devono riguardare quantomeno l'identità e la struttura chimica; le proprietà chimico-fisiche; i risultati di eventuali altri saggi di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza; i dati tossicologici su sostanze di struttura affine; l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati la rilevanza del saggio per la protezione della salute degli esseri umani, e sono utili per la scelta della dose iniziale più appropriata.

1.2 DEFINIZIONI

Tossicità acuta per via orale: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose di una sostanza o di più dosi nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente nei 14 giorni del periodo di osservazione.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg).

GHS: sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche e dei relativi miscugli. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute degli esseri umani e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle sostanze pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'ILO (comunicazione dei rischi), coordinata dal programma inter-organizzazioni per una gestione responsabile delle sostanze chimiche (IOMC).

Morte imminente: stato in cui si prevede che l'animale sarà moribondo o morto prima della successiva osservazione in programma. Nei roditori, tra i segni indicativi di morte imminente sono compresi convulsioni, posizione laterale o prona e tremore [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

DL_{50} (dose letale mediana): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, che si prevede causi la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} viene espresso in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il saggio (2 000 o 5 000 mg/kg).

Moribondo: che sta morendo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, ad esempio incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

▼B

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il metodo prevede l'applicazione di un procedimento articolato in fasi successive che richiede l'uso di un numero minimo di animali in ciascuna fase e permette di ricavare informazioni sufficienti per la classificazione della tossicità acuta della sostanza in esame. La sostanza viene somministrata per via orale a un gruppo di animali da laboratorio in una delle dosi prestabilite. Il saggio viene effettuato seguendo un procedimento in fasi successive; in ciascuna fase vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso (normalmente femmine). In funzione della presenza o assenza di mortalità riferibile alla sostanza in esame tra gli animali trattati, per ciascuna fase si possono avere tre esiti diversi:

— interruzione del saggio

— somministrazione della sostanza ad altri tre animali, alla stessa dose

— somministrazione della sostanza ad altri tre animali al livello di dose immediatamente superiore o inferiore.

Lo schema dettagliato del procedimento è riportato nell'allegato 1. Il metodo consente di valutare la sostanza allo scopo di assegnarla a una delle classi di tossicità definite da valori discriminanti fissi di DL_{50}.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta delle specie di animali**

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (9), perché la letteratura esistente circa i saggi convenzionali sulla DL_{50} indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (11). Peraltro, se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche di struttura affine indicano che i maschi sono verosimilmente più sensibili delle femmine, si devono usare animali di sesso maschile. Qualora vengano usati animali di sesso maschile, se ne deve fornire un'adeguata motivazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Ciascun animale, all'inizio del trattamento, deve essere di età compresa fra 8 e 12 settimane e di peso del ± 20 % del peso medio di eventuali animali a cui è stata precedentemente somministrata la sostanza in esame.

1.4.2 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose, ma il numero di animali per gabbia non deve essere tale da impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

▼B

1.4.3 **Preparazione degli animali**

Gli animali devono essere scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Preparazione delle dosi**

In genere le somministrazioni delle sostanze in esame devono avere un volume costante per tutte le dosi oggetto del saggio; a questo scopo, si varia la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il saggio viene eseguito su prodotti o miscugli che si presentano in forma liquida, ai fini della successiva valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; peraltro, l'uso della sostanza non diluita è prescritto da alcune autorità di regolamentazione. In ogni caso, non si deve superare il volume massimo somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Nei roditori, di norma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa oppure, in ordine di preferenza, una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) o una soluzione in altri veicoli. Nel caso in cui si utilizzino veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di tossicità degli stessi. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e si sia dimostrata accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da saggiare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Nel caso infrequente in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

Gli animali devono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza (p. es. l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente nei ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali in misura adeguata alla durata del periodo di somministrazione.

1.5.2 **Numero di animali e livelli di dose**

Si utilizzano tre animali in ciascuna fase. La dose iniziale viene scelta fra quattro livelli fissi: 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. Il livello di dose iniziale deve essere quello che con maggior probabilità provoca la morte di una parte degli animali trattati. I diagrammi di flusso dell'allegato 1 illustrano il procedimento da seguire per ciascuna delle dosi iniziali, mentre l'allegato 4 riporta indicazioni sulla classificazione secondo il sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

▼B

Qualora, alla luce delle informazioni disponibili, la mortalità risulti improbabile al livello di dose iniziale più elevato (2 000 mg/kg di peso corporeo), si deve fare ricorso a un saggio limite. In mancanza di informazioni su una sostanza da esaminare, per il benessere degli animali si raccomanda di utilizzare la dose iniziale di 300 mg/kg di peso corporeo.

L'intervallo di tempo tra il trattamento dei diversi gruppi viene determinato in funzione dell'esordio, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere al trattamento degli animali alla dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente.

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg (vedi allegato 2). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alle dosi stabilite per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di tali dosi è da prevedere solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute degli animali o dell'uomo o per la salvaguardia dell'ambiente.

1.5.3 **Saggio limite**

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame è verosimilmente non tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da conoscenze su composti, miscugli o prodotti simili esaminati, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Nel caso in cui le informazioni sulla tossicità della sostanza siano scarse o nulle, o in cui ci si attenda che la sostanza in esame sia tossica, il saggio principale deve essere eseguito.

Il saggio limite si effettua con un unico livello di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo su sei animali (tre animali per fase). In casi eccezionali, si può utilizzare un unico livello di dose di 5 000 mg/kg su tre animali (vedi allegato 2). Se si osservano decessi riferibili alla sostanza in esame, può essere necessario eseguire un altro saggio al livello di dose immediatamente inferiore.

1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, ponendo particolare attenzione nelle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni in tutto, tranne nel caso in cui sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per motivi legati al loro benessere, o nel caso in cui vengano rinvenuti morti. Tuttavia, la durata dell'osservazione non è tassativa, e va stabilita in funzione delle reazioni tossiche, del momento della loro insorgenza e della durata del periodo di recupero; se necessario, quindi, è possibile prolungarla. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva (12). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

▼B

Ulteriori osservazioni sono necessarie qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità. Dette osservazioni devono comprendere le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9). Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

1.6.1 **Peso corporeo**

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza da saggiare e in seguito almeno una volta alla settimana. Le variazioni ponderali devono essere calcolate e registrate. Al termine del saggio, gli animali sopravvissuti devono essere pesati e sottoposti a eutanasia.

1.6.2 **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del saggio e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti potrebbe fornire indicazioni utili ed essere quindi opportuno.

2. **DATI**

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo del saggio, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e i risultati della necroscopia.

3. **RELAZIONE**

3.1 **Relazione sul saggio**

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);

— dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

— specie/ceppo utilizzato;

▼B

— condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;

— numero, età e sesso degli animali (compresa, se del caso, la motivazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni sperimentali:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame, comprese informazioni sulla forma fisica del preparato somministrato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame, compresi volumi e orari delle somministrazioni;

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza, provenienza dell'acqua);

— motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

— tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);

— tabella del peso corporeo e delle relative modificazioni;

— peso dei singoli animali il giorno della somministrazione, quindi a intervalli di una settimana, e infine al momento della morte o del sacrificio;

— data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato;

— momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale;

— reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66,455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69,659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Allegato 1

PROCEDIMENTO DA SEGUIRE PER CIASCUNA DELLE DOSI INIZIALI

OSSERVAZIONI GENERALI

Il procedimento da seguire per ciascuna dose iniziale è indicato nei diagrammi di questo allegato.

— Allegato 1a: dose iniziale 5 mg/kg di peso corporeo

— Allegato 1b: dose iniziale 50 mg/kg di peso corporeo

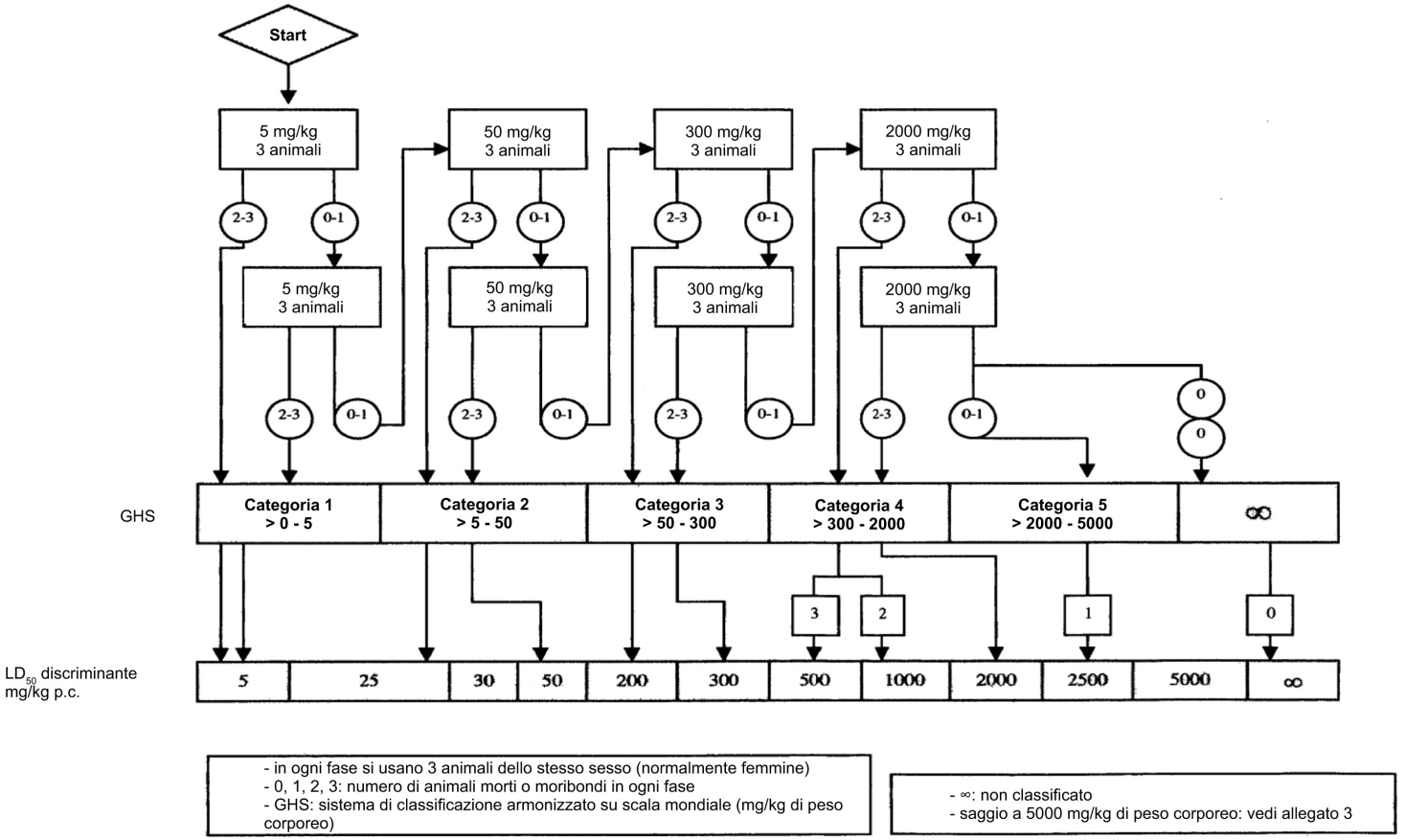
— Allegato 1c: dose iniziale 300 mg/kg di peso corporeo

— Allegato 1d: dose iniziale 2 000 mg/kg di peso corporeo

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

Allegato 1 A

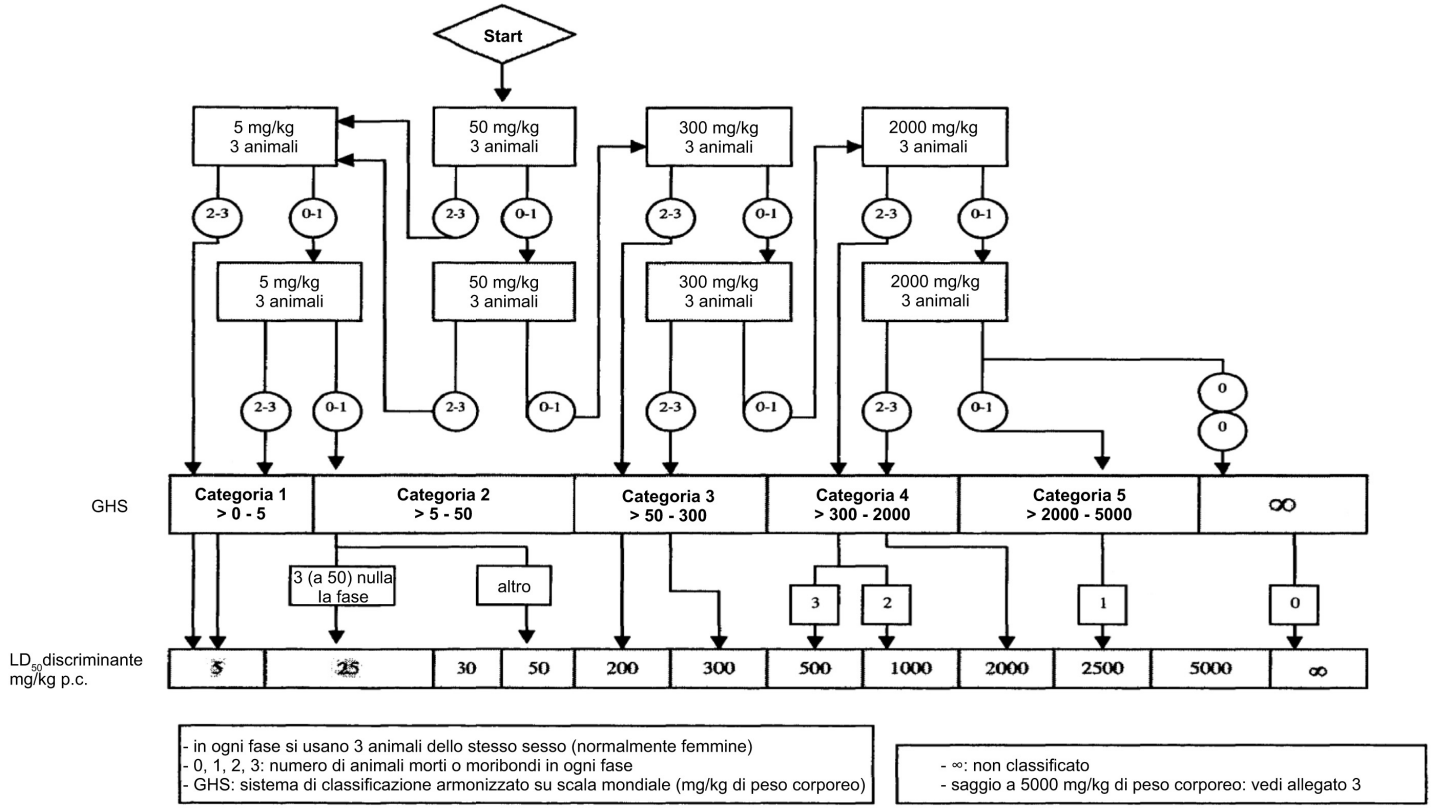
PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 5 MG/KG DI PESO CORPOREO



2008R0440 — IT — 22.03.2014 — 004.001 — 208

Allegato 1 B

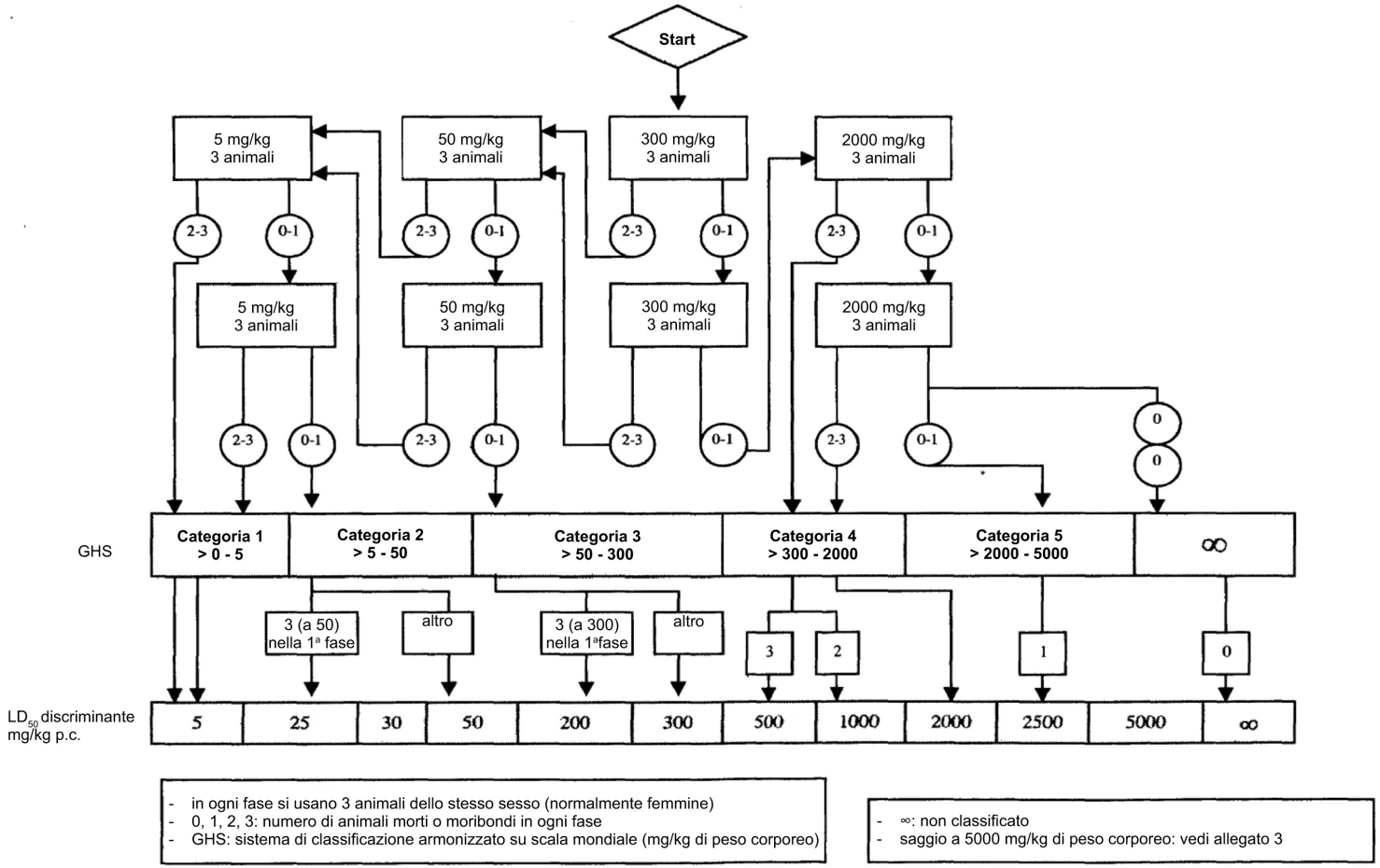
PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 50 MG/KG DI PESO CORPOREO



2008R0440 — IT — 22.03.2014 — 004.001 — 209

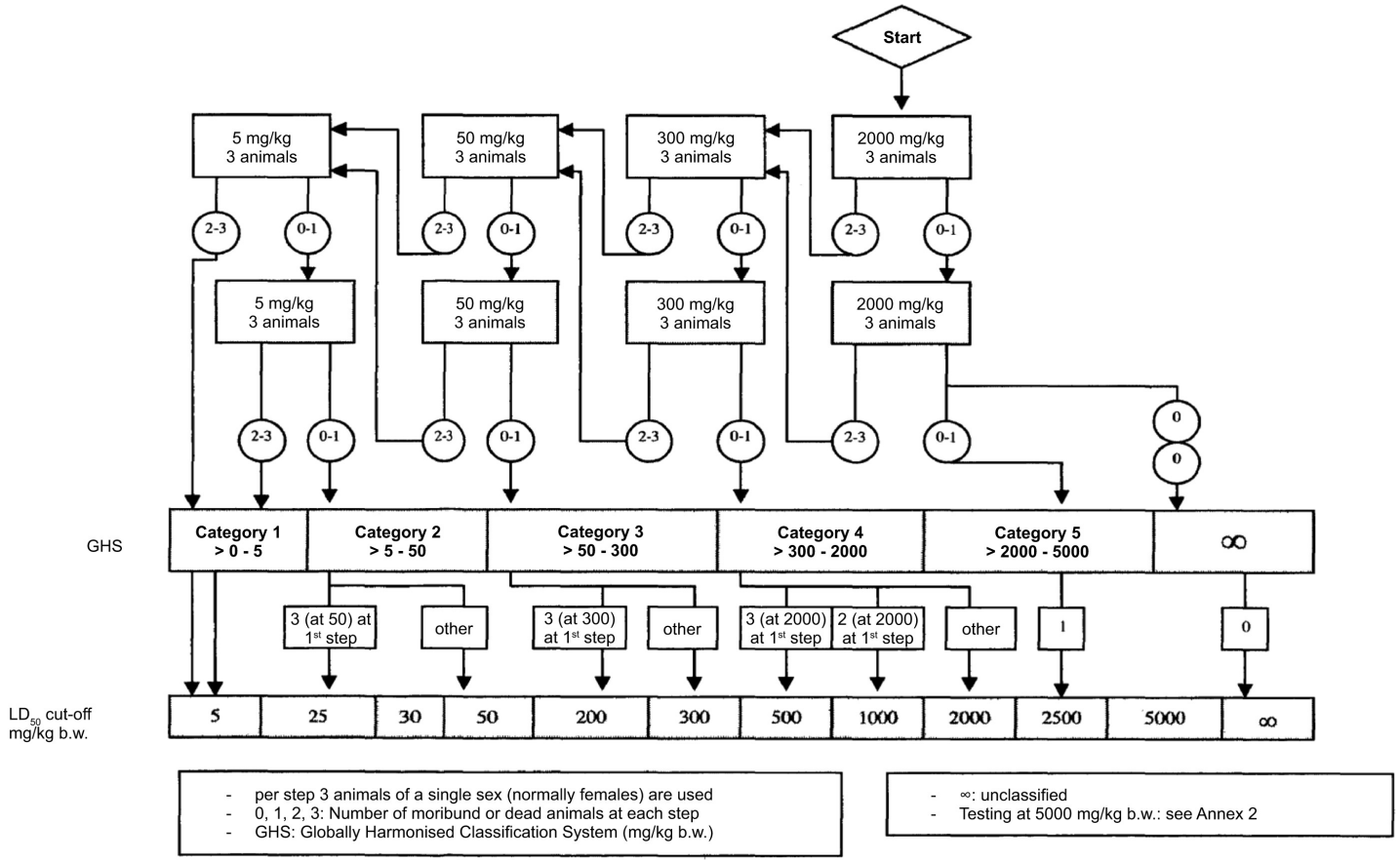
Allegato 1 C

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 300 MG/KG DI PESO CORPOREO



Allegato 1 D

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 2 000 MG/KG DI PESO CORPOREO



▼B

Allegato 2

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI DI DL_{50} ATTESI SUPERIORI A 2 000 MG/KG SENZA BISOGNO DI ESEGUIRE UN SAGGIO DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 hanno lo scopo di consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che, in determinate situazioni, possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze che si prevede abbiano una DL_{50} orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei casi seguenti:

a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 1a-1d porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;

b) se sono già disponibili dati obiettivi attendibili che indicano che la DL_{50} si situa nell'intervallo di valori della categoria 5, o se altri studi su animali o effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per l'uomo;

c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione a una classe di rischio maggiore, e se

   — sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o

   — si osserva mortalità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o

   — valutazioni di esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o

   — valutazioni di esperti confermano informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

ESECUZIONE DEL SAGGIO A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

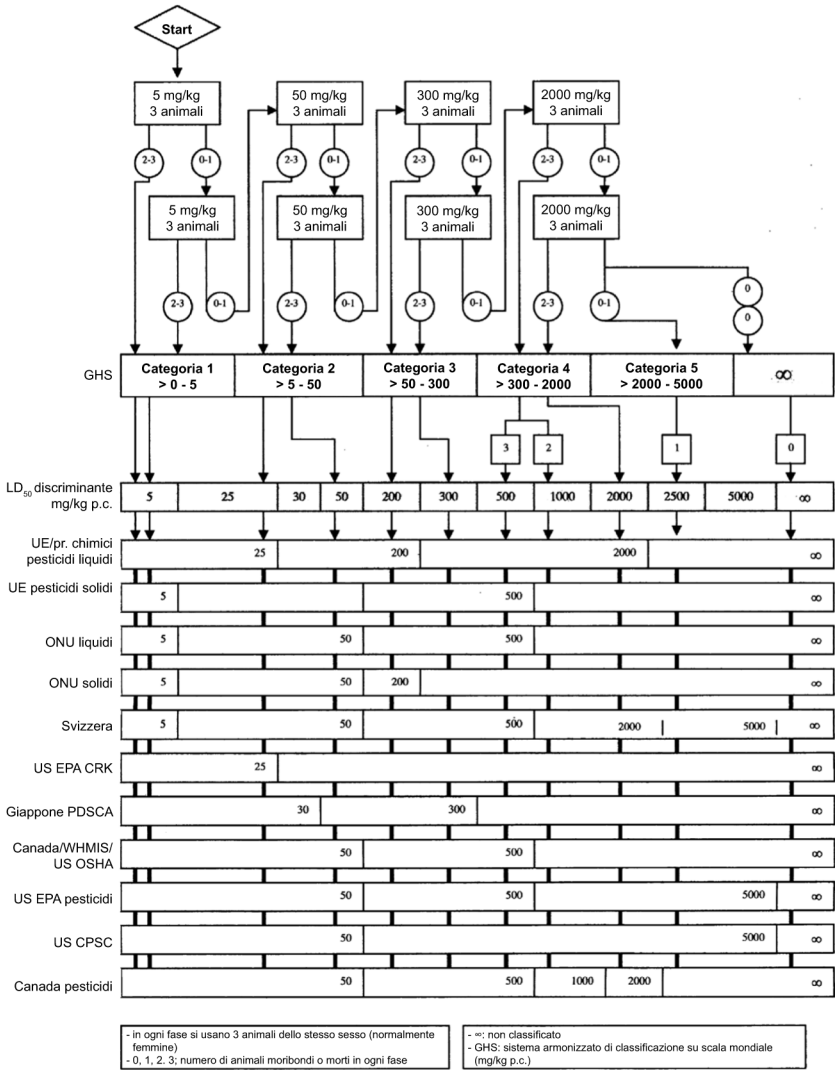
Data la necessità di tutelare il benessere degli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose prevista per la categoria 5 (5 000 mg/kg); l'utilizzo di tale dose è da prevedere solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli esseri umani o degli animali (10). Non devono essere effettuati ulteriori saggi a livelli di dose superiori.

Quando è necessario effettuare un saggio di tossicità alla dose di 5 000 mg/kg, tale saggio deve essere eseguito in una sola fase (e quindi su tre animali). Se il primo animale a cui viene somministrata la sostanza muore, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg, così come indicato nei diagrammi di flusso dell'allegato 1. Se il primo animale sopravvive, la sostanza viene somministrata alla stessa dose ad altri due animali. Se solo uno dei tre animali muore, si ritiene che il valore di DL_{50} sia superiore a 5 000 mg/kg. Se due animali muoiono, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg.

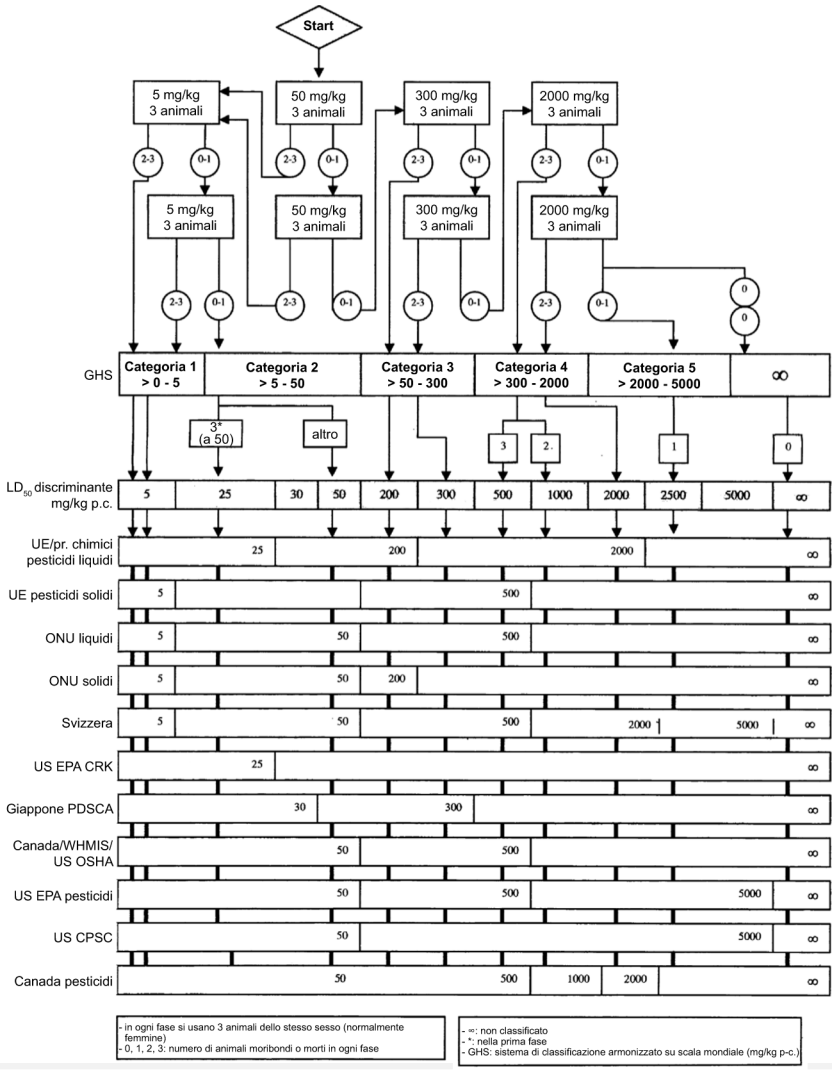
▼B

Allegato 3

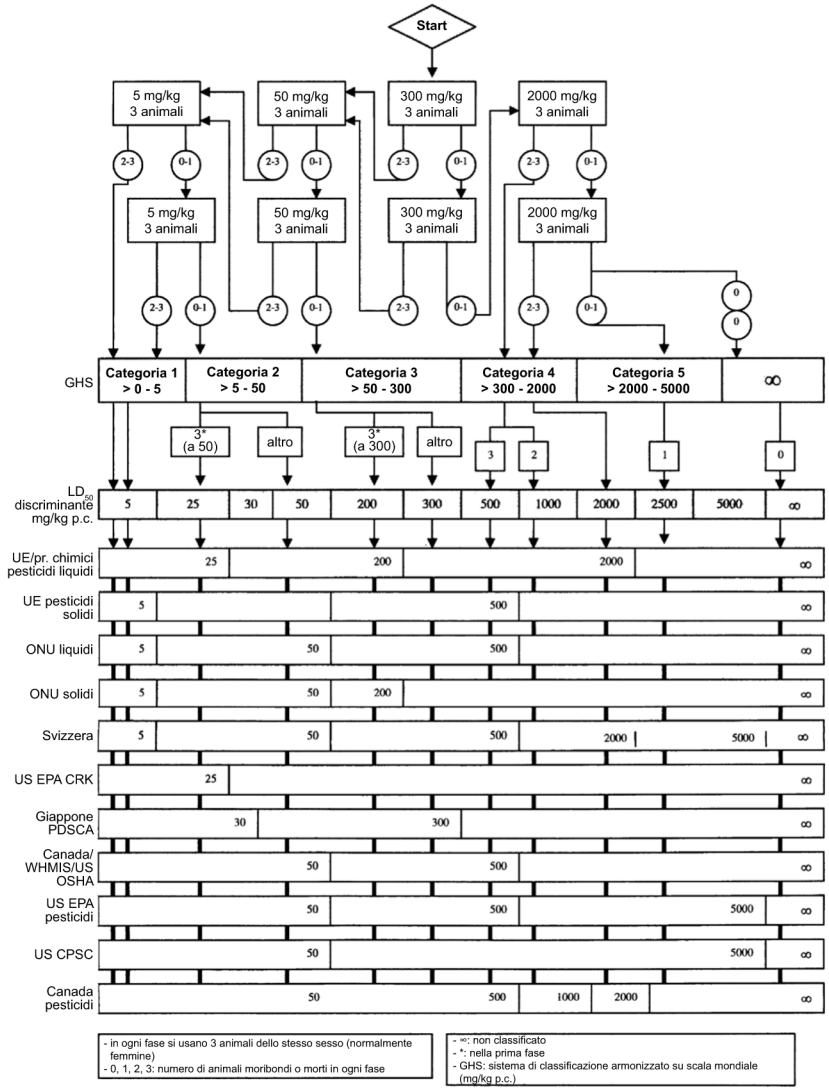
METODO DI SAGGIO B.1 *ter*: indicazioni sulla classificazione secondo lo schema UE nel periodo di transizione in attesa della piena applicazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [ricavate dalla voce bibliografica (8)]



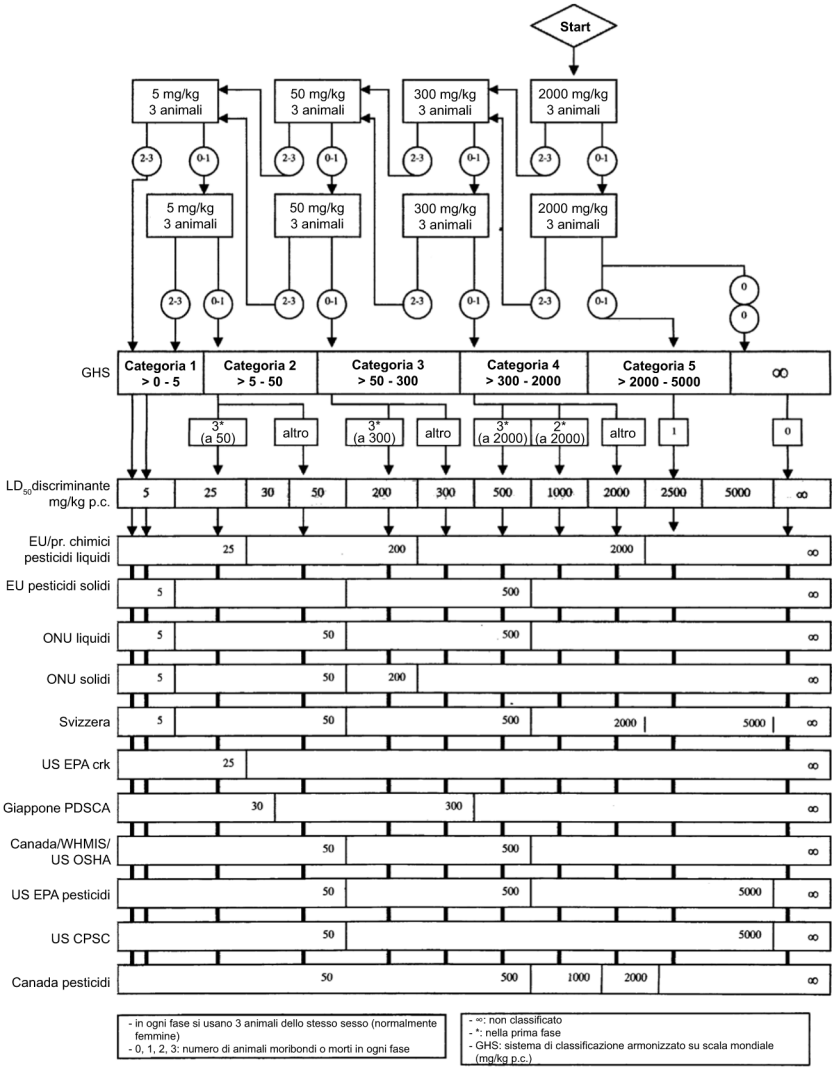
▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3
2
1
0
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/pr. chimici pesticidi liquidi
UE pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA CRK
Giappone PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- =: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p-c.)

▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3* (a 300)
altro
3
2
1
0
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/pr. chimici pesticidi liquidi
UE pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA CRK
Giappone PDSCA
Canada/ WHMIS/US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- ∞: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/pr. chimici pesticidi liquidi
EU pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA crk
Giappone PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- ∞: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

▼M4

B.2. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 403 (2009) (1). La prima linea guida sulla tossicità acuta per inalazione n. 403 è stata adottata nel 1981. Questo metodo di prova rivisto B.2 (equivalente alla linea guida n. 403 rivista) è stato concepito per offrire una maggior flessibilità, ridurre l'utilizzo di animali e rispondere alle prescrizioni normative. Questo metodo di prova prevede due tipi di studi: un protocollo tradizionale di determinazione della LC_{50} e un protocollo «concentrazione × tempo» (C × t). Le caratteristiche principali di questo metodo di prova sono la capacità di ottenere un rapporto concentrazione/risposta che va da «letale» a «non letale» al fine del calcolo della mediana della concentrazione letale (CL_{50}), della soglia di concentrazione non letale (come la CL_{01}) e della pendenza, nonché la capacità di determinare un'eventuale sensibilità legata al sesso. Il protocollo C × t deve essere utilizzato quando sussiste una particolare esigenza scientifica o normativa che preveda una prova su animali per varie durate di esposizione, ad esempio per la pianificazione territoriale o la pianificazione della risposta di emergenza [per ottenere, ad esempio, i livelli guida di esposizione acuta (*Acute Exposure Guideline Levels* — AEGL), le raccomandazioni per la pianificazione delle misure di emergenza (*Emergency Response Planning Guidelines* — ERPG), o i livelli soglia di esposizione acuta (*Acute Exposure Threshold Levels — AETL*)].

2. Nel documento d'orientamento sulla prove di tossicità acuta per inalazione (documento d'orientamento n. 39) (2) sono riportate indicazioni sulla realizzazione e l'interpretazione degli studi legati a questo metodo di prova.

3. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono specificate alla fine del capitolo e nel documento di orientamento n. 39 (2).

4. Questo metodo di prova consente di caratterizzare le sostanze in esame, di sottoporle ad una valutazione quantitativa dei rischi e di classificarle a norma del regolamento (CE) n. 1272/2008 (3). Il documento di orientamento n. 39 (2) fornisce indicazioni per la scelta del metodo di prova adeguato per le prove di tossicità acuta. Quando sono necessarie solo informazioni sulla classificazione e l'etichettatura, si raccomanda di far riferimento al capitolo B.52 del presente allegato (4) [cfr. documento d'orientamento n. 39 (2)]. Questo metodo di prova B.2 non è specificamente destinato a testare materiali speciali come le sostanze isometriche o fibrose poco solubili o i nanomateriali di sintesi.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Prima di decidere di avvalersi di questo metodo di prova, il laboratorio che esegue la prova deve esaminare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, ivi compresi gli studi esistenti [ad esempio capitolo B.52 del presente allegato (4)] i cui risultati renderebbero inutili prove aggiuntive, al fine di ricorrere il meno possibile agli animali. Tra le informazioni utili per la scelta della specie, del ceppo, del sesso, della modalità di esposizione e delle concentrazioni più adeguati, rientrano l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame; i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo; gli impieghi previsti e il potenziale in termini di esposizione umana; dati (Q)SAR e dati tossicologici disponibili su sostanze chimiche di struttura affine [cfr. documento d'orientamento n. 39 (2)].

▼M4

6. Occorre evitare il più possibile di testare sostanze chimiche corrosive o gravemente irritanti a concentrazioni che possono provocare dolore e sofferenza intensi. Per stabilire se sia possibile evitare prove aggiuntive, occorre valutare il potenziale di corrosione/irritazione secondo i criteri degli specialisti in funzione degli elementi seguenti: dati sperimentali sull'uomo e l'animale (provenienti, ad esempio, da prove a dosi ripetute realizzate a concentrazioni non corrosive né irritanti), dati in vitro disponibili [ad esempio dai capitoli B.40 (5), B.40 *bis* (6) del presente allegato o dalla linea guida dell'OCSE n. 435 (7)], valori del pH, informazioni concernenti sostanze analoghe o qualsiasi altro dato pertinente. Per specifiche esigenze normative (ad esempio per la pianificazione di emergenza), questo metodo di prova può essere utilizzato per esporre animali a sostanze di questo tipo in quanto consente al responsabile dello studio o al ricercatore principale di scegliere le concentrazioni. Tuttavia le concentrazioni auspicate non devono avere effetti corrosivi/irritanti gravi, pur essendo sufficienti a prolungare la curva concentrazione-risposta fino a livelli corrispondenti all'obiettivo scientifico e normativo della prova. Occorre sempre giustificare le concentrazioni scelte [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)].

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Questo metodo di prova rivisto B.2 è stato concepito per ottenere informazioni sufficienti sulla tossicità acuta di una sostanza chimica al fine di consentirne la classificazione e fornire dati sulla letalità (CL_{50}, CL_{01} e inclinazione) per uno o entrambi i sessi. Questi dati sono necessari per le valutazioni quantitative dei rischi. Il metodo in questione prevede due procedure diverse. La prima è un protocollo tradizionale in cui gruppi di animali sono esposti ad una concentrazione limite (prova limite) o a una serie di concentrazioni secondo una procedura articolata in fasi successive per una durata prestabilita, di solito pari a 4 ore. Se necessario per motivi regolamentari, la durata dell'esposizione può essere diversa. La seconda procedura è un protocollo («C × t») in cui gruppi di animali sono esposti ad una concentrazione (concentrazione limite) o a una serie di concentrazioni diverse per durate diverse.

8. Ai fini dell'interpretazione dei risultati della prova, gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e considerati alla stregua degli animali morti naturalmente nel corso della prova. I criteri da applicare per decidere in merito all'eutanasia degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno documento d'orientamento specifico, che contiene anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (8).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

9. Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La specie generalmente utilizzata è il ratto e occorre motivare l'eventuale scelta di una specie diversa.

Preparazione degli animali

10. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Il giorno dell'esposizione, gli animali selezionati devono essere giovani adulti di età compresa tra 8 e 12 settimane il cui peso corporeo non deve superare, per ciascun sesso, ± 20 % del peso medio degli animali di ciascun sesso della stessa età precedentemente esposti. Gli animali sono scelti a caso e marcati per l'identificazione individuale. Affinché si adattino alle condizioni di laboratorio, devono essere lasciati nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova e, poco prima della prova, vanno anche acclimatati alle apparecchiature di prova per attenuare la tensione causata dal nuovo ambiente.

▼M4

Condizioni di allevamento degli animali

11. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ± 3 °C. L'umidità relativa va idealmente mantenuta tra 30 e 70 %, anche se ciò potrebbe non essere possibile quando si utilizza l'acqua come veicolo. Prima e dopo l'esposizione, gli animali sono generalmente tenuti in gabbia, suddivisi per sesso e concentrazione, ma il numero di animali per gabbia non deve interferire con un'agevole osservazione di ogni singolo animale e deve ridurre al minimo le perdite dovute a cannibalismo e combattimenti. Se l'esposizione avviene unicamente per via nasale, potrebbe essere necessario abituarli ai dispositivi di contenzione, che non devono provocare agli animali eccessivi stress fisici, termici o dinamici. La contenzione può incidere sugli effetti misurati (endpoint) fisiologici, come la temperatura corporea (ipertermia) e/o il volume respiratorio al minuto. Se si dispone di dati generici che dimostrano che nessuna di queste alterazioni avviene a un livello apprezzabile, il periodo di adattamento ai dispositivi di contenzione non è necessario. Gli animali esposti «a corpo intero» ad un aerosol devono essere stabulati separatamente per la durata dell'esposizione per evitare che filtrino l'aerosol attraverso il pelo degli altri animali presenti nella gabbia. Salvo nei periodi di esposizione, gli animali possono essere nutriti in base a diete convenzionali e certificate da laboratorio, accompagnate da acqua a volontà. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità.

Camere di inalazione

12. La scelta della camera di inalazione dipende dalla natura della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Il metodo preferito di esposizione è quello per via nasale (con cui s'intende l'esposizione unicamente della testa, del naso o del muso). Di norma si predilige l'esposizione «a naso solo» per gli studi di aerosol liquidi o solidi e per i vapori che si possono condensare sotto forma di aerosol. L'esposizione «a corpo intero» può essere più indicata per conseguire obiettivi di studio particolari, ma tale scelta deve essere giustificata nella relazione sullo studio. Per garantire la stabilità atmosferica di una camera di esposizione «a corpo intero», il volume complessivo degli animali sottoposti alla prova non deve superare il 5 % del volume della camera. Il documento di orientamento n. 39 (2) descrive i principi delle tecniche di esposizione «a corpo intero» e per sola via nasale, nonché i relativi vantaggi e svantaggi.

CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Somministrazione delle concentrazioni

13. Le esposizioni «a naso solo» possono durare fino a 6 ore per i ratti. Nel caso dei topi, questa forma di esposizione deve durare al massimo 4 ore. Qualora siano necessari esposizioni di più lunga durata, occorre spiegarne il motivo [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Gli animali esposti agli aerosol in camere «a corpo intero» devono essere sistemati individualmente per evitare l'ingestione della sostanza in esame nel corso della pulizia degli altri animali presenti nella stessa gabbia. Durante il periodo di esposizione l'alimentazione va sospesa. Nel corso dell'esposizione «a corpo intero» si può continuare a somministrare acqua.

14. Gli animali sono esposti alla sostanza in esame sotto forma di gas, vapore, aerosol o una loro miscela. Lo stato fisico da testare dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, dalla concentrazione prescelta e/o dalla forma fisica nella quale è più probabile che si presenti nel corso della sua manipolazione e del suo utilizzo. Le sostanze igroscopiche e reattive dal punto di vista chimico devono essere saggiate in atmosfera secca. Occorre prestare attenzione al fine di evitare concentrazioni esplosive.

▼M4

Distribuzione granulometrica

15. La granulometria deve essere effettuata per tutti gli aerosol e i vapori che potrebbero condensarsi e formare aerosol. Per consentire l'esposizione di tutte le zone pertinenti delle vie respiratorie, si raccomanda di utilizzare degli aerosol con diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) compreso tra 1 e 4 μm con una deviazione standard geometrica (σ_g) compresa tra 1,5 e 3,0 (2) (9) (10). Occorre fare quanto possibile per rispettare queste condizioni, ma qualora non ci si riuscisse è necessario il parere di uno specialista. Ad esempio, le particelle dei fumi metallici possono essere più piccole del limite inferiore sopraindicato, e le particelle caricate, le fibre e i materiali igroscopici (le cui dimensioni aumentano nell'ambiente umido delle vie respiratorie) possono oltrepassare il limite superiore.

Preparazione della sostanza in esame in un veicolo

16. Per ottenere la concentrazione e la granulometria adeguate della sostanza in esame nell'atmosfera si può utilizzare un veicolo. Di norma è preferibile utilizzare l'acqua. Le particelle possono essere sottoposte a processi meccanici per ottenere la distribuzione granulometrica voluta, tuttavia occorre prestare attenzione a non decomporre o alterare la sostanza in esame. Qualora si ritenga che i processi meccanici abbiano alterato la composizione della sostanza in esame (temperatura estrema dovuta alla frizione da eccessiva macinazione), occorrerà verificare mediante analisi la composizione della sostanza in esame. Occorre prestare particolare attenzione a non contaminare la sostanza in esame. Non è necessario testare le materie granulari non friabili, appositamente concepite per essere non inalabili. Per dimostrare che la manipolazione del materiale granulare non produce particelle respirabili, effettuare una prova di logorio per attrito. Se la prova di logorio produce sostanze respirabili, occorre effettuare una prova di tossicità per inalazione.

Animali di controllo

17. Non è necessario un gruppo di controllo negativo (aria) in parallelo. Se per produrre l'atmosfera di prova si utilizza un veicolo diverso dall'acqua, è necessario allestire un gruppo di controllo del veicolo solo se non si dispone di dati storici sulla tossicità. Se in uno studio di tossicità della sostanza in esame in un mezzo non si rileva tossicità, ciò significa che il mezzo non è tossico alla concentrazione in questione; pertanto non occorre un gruppo di controllo del veicolo.

MONITORAGGIO DELLE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Flusso d'aria nella camera di esposizione

18. Durante ogni esposizione è necessario regolare attentamente, monitorare in continuo e registrare almeno una volta l'ora il flusso d'aria nella camera. Il monitoraggio della concentrazione (o stabilità) dell'atmosfera di prova costituisce una misurazione permanente di tutti i parametri dinamici e un modo indiretto di controllare quelli che regolano la produzione dell'atmosfera di prova. Nelle camere d'esposizione «a naso solo», si farà il possibile, per evitare la reinalazione qualora il flusso d'aria attraverso il sistema di esposizione non sia in grado di garantire una circolazione dinamica dell'atmosfera di prova. Esistono metodi specifici cui si può ricorrere per dimostrare che non si verificano reinalazioni nelle condizioni sperimentali prescelte (2) (11). La concentrazione di ossigeno deve essere pari ad almeno il 19 % e la concentrazione di biossido di carbonio non deve superare l'1 %. Qualora si ritenga di non poter rispettare questi standard, è necessario misurarle.

▼M4

Temperatura e umidità relativa della camera

19. La temperatura della camera deve essere mantenuta a 22 °C ± 3 °C. L'umidità relativa nella zona in cui respira l'animale, sia per le esposizioni «a naso solo» che per quelle «a corpo intero», è monitorata e registrata almeno tre volte (per le prove che durano fino a 4 ore) e tutte le ore per le durate più brevi. L'umidità relativa deve idealmente essere mantenuta tra 30 e 70 % ma può accadere che questi valori non siano raggiungibili (ad esempio, quando si testano miscele acquose) o che l'umidità non possa essere misurata per via delle interferenze della sostanza in esame con il metodo di prova.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione nominale

20. Laddove possibile, si deve calcolare e registrare la concentrazione nominale nella camera di esposizione. La concentrazione nominale è data dalla divisione della massa generata dalla sostanza in esame per il volume totale di aria circolata nella camera. La concentrazione nominale non serve a caratterizzare l'esposizione degli animali, ma un confronto tra la concentrazione nominale e la concentrazione reale dà un'indicazione dell'efficienza di produzione del sistema di prova e può essere utile per individuare eventuali problemi a questo livello.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione reale

21. La concentrazione reale è la concentrazione della sostanza in esame nella zona della camera di inalazione in cui gli animali respirano. Le concentrazioni reali possono essere determinate con metodi specifici (ad esempio campionamento diretto, metodi di adsorbimento o di reazione chimica, e successiva caratterizzazione analitica) o con metodi non specifici come l'analisi gravimetrica mediante filtrazione. Il ricorso all'analisi gravimetrica è accettabile solo per gli aerosol di polveri che contengono un unico componente o per gli aerosol di liquidi poco volatili e deve fondarsi su opportune caratterizzazioni, specifiche per la sostanza in esame, effettuate prima dello studio. È possibile ricorrere all'analisi gravimetrica per determinare la concentrazione di un aerosol che contiene varie componenti in polvere, ma occorrono dati analitici che dimostrino che la composizione del materiale in sospensione nell'aria è analoga a quella del materiale di partenza. In assenza di questi dati, può essere necessario rianalizzare periodicamente la sostanza in esame (idealmente sotto forma di aerosol) durante lo studio. Per gli agenti aerosolizzati che possono evaporare o sublimarsi, occorre dimostrare che tutte le fasi sono state raccolte con il metodo prescelto. Le concentrazioni bersaglio nominali e reali devono essere riportate nella relazione, ma nell'analisi statistica per il calcolo dei valori delle concentrazioni letali sono utilizzate solo le concentrazioni reali.

22. Si deve utilizzare, se possibile, un unico lotto della sostanza in esame e il campione allo studio va conservato in condizioni che ne mantengano la purezza, l'omogeneità e la stabilità. Prima di iniziare lo studio, occorre caratterizzare la sostanza in esame, valutandone anche la purezza e, se tecnicamente fattibile, l'identità e le quantità di contaminanti e di impurità individuati. A tal fine occorre conoscere quanto meno i dati seguenti: tempo di ritenzione e relativa area di picco, peso molecolare risultante dalla spettroscopia di massa o dalla gascromatografia, o altre stime. Il laboratorio che effettua la prova non è responsabile dell'identità del campione in esame, tuttavia per precauzione è opportuno che confermi almeno in parte la caratterizzazione del cliente (colore, natura fisica ecc.).

23. L'atmosfera di esposizione è mantenuta il più costante possibile e monitorata in continuo e/o in modo intermittente secondo il metodo di analisi. Quando si procede ad un campionamento intermittente, in uno studio di quattro ore si devono raccogliere campioni dell'atmosfera della camera almeno due volte. Se ciò non è possibile, per via di limitazioni inerenti al flusso d'aria o delle basse concentrazioni, è possibile prelevare un solo campione nell'intero periodo di esposizione. Se si osservano evidenti fluttuazioni da un campione all'altro, per le concentrazioni successive si devono

▼M4

prelevare quattro campioni per esposizione. Gli scarti di concentrazione in ogni camera e la concentrazione media non devono superare ± 10 % per i gas e i vapori o ± 20 % per gli aerosol liquidi o solidi. Occorre calcolare e prender nota del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera di esposizione (t_{95}) La durata di un'esposizione coincide con il tempo di produzione della sostanza in esame, ivi compreso il tempo necessario per ottenere il t_{95}. Il documento di orientamento n. 39 (2) contiene indicazioni per la stima di t_{95}.

24. Per le miscele molto complesse costituite da gas o vapori e da aerosol (atmosfere di combustione o sostanze di prova propulse da prodotti/dispositivi specializzati, ad esempio), ogni fase può comportarsi diversamente nella camera di inalazione. Per ciascuna fase (gas/vapore e aerosol) occorre pertanto scegliere una sostanza indicatrice (analita). Quando la sostanza in esame è una miscela, la concentrazione analitica dovrà essere indicata per la preparazione e non solo per la sostanza attiva o il componente (analita). Informazioni aggiuntive sulle concentrazioni reali sono reperibili nel documento d'orientamento n. 39 (2).

Sostanza chimica in esame: Distribuzione granulometrica

25. La distribuzione granulometrica degli aerosol deve essere determinata almeno due volte nel corso di ciascuna esposizione di 4 ore, utilizzando un impattore a cascata o un altro strumento, come uno spettrometro APS (*Aerodynamic Particle Sizer*). Se i risultati ottenuti con l'impattore a cascata e con un altro strumento risultano equivalenti, quest'ultimo può essere utilizzato nel corso dell'intero studio. Per confermare l'efficienza di estrazione dello strumento principale, occorre utilizzare parallelamente un secondo strumento, come un filtro gravimetrico o un impinger/gorgogliatore. La concentrazione massica ottenuta dall'analisi granulometrica deve avvicinarsi, con scarti ragionevoli, a quella ottenuta mediante l'analisi su filtro [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Se questa equivalenza viene stabilita nella fase iniziale dello studio, non è necessario effettuare ulteriori misurazioni di conferma. Per il benessere degli animali occorre ridurre il più possibile i dati incerti che potrebbero comportare la necessità di ripetere un'esposizione. È necessario effettuare un'analisi granulometrica nel caso di vapori che possono condensarsi e formare aerosol o se, in un'atmosfera di vapore, si rilevano particelle che si presume possano formare fasi miste (cfr. paragrafo 15).

PROCEDURA

26. Qui di seguito sono descritti due tipi di studio: il protocollo tradizionale e il protocollo C × t. Entrambi i protocolli possono comprendere uno studio di osservazione, uno studio principale e/o una prova limite (protocollo tradizionale) o una prova a concentrazione limite (C × t). Se uno dei due sessi è notoriamente più sensibile, il responsabile dello studio può scegliere di effettuare queste prove solo con animali di questo sesso. Se per l'esposizione «a naso solo» s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è possibile adeguare la durata massima d'esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. Prima di iniziare lo studio, è opportuno esaminare tutti i dati disponibili al fine di ridurre al minimo l'utilizzo di animali. Ad esempio, i dati ottenuti sulla base del capitolo B.52 del presente allegato (4) possono rendere superfluo lo studio di osservazione e dimostrare anche se uno dei due sessi è più sensibile [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLLO TRADIZIONALE:

Osservazioni generali: Protocollo tradizionale

27. In uno studio tradizionale, gruppi di animali sono esposti a una sostanza di prova per un periodo stabilito di tempo (generalmente 4 ore) in una camera di esposizione «a naso solo» o «a corpo intero». Gli animali sono esposti ad una concentrazione limite (prova limite) o ad almeno tre concentrazioni in fasi successive (studio principale). Lo studio principale può essere preceduto da uno studio di osservazione, a meno che non si disponga già di alcune informazioni sulla sostanza in esame, tratte da uno studio B.52 precedente [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)].

Studio di osservazione: Protocollo tradizionale

28. Uno studio di osservazione consente di stimare l'attività della sostanza in esame, di individuare le differenze tra i sessi in termini di sensibilità alla sostanza, e di scegliere più agevolmente i livelli di concentrazione per lo studio principale o la prova limite. Al momento della scelta dei livelli di concentrazione per lo studio di osservazione, è opportuno utilizzare tutte le informazioni disponibili, ivi compresi i dati (Q)SAR e i dati relativi a sostanze chimiche analoghe. Per ogni concentrazione, è opportuno esporre al massimo tre maschi e tre femmine (può essere necessario utilizzare tre animali per sesso per stabilire una differenza di sensibilità tra i sessi). Uno studio di osservazione può essere effettuato con un'unica concentrazione, ma se necessario si possono testare più concentrazioni. Questo studio non deve vertere su un numero di animali e di concentrazioni analogo a quello utilizzato per uno studio principale. Invece di effettuare uno studio di osservazione, è possibile utilizzare i risultati di uno studio B.52 (4) precedente [cfr. documento di orientamento n. 39(2)].

Prova limite: Protocollo tradizionale

29. Un prova limite viene effettuata quando si sa per certo o si prevede che la sostanza di prova sarà praticamente non tossica, ossia determinerà una reazione di tossicità solo al di sopra della concentrazione limite regolamentare. In una prova limite, un solo gruppo di tre maschi e tre femmine è esposto alla sostanza in esame ad una concentrazione limite. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da conoscenze relative a sostanze simili testate, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Nel caso in cui le informazioni sulla tossicità della sostanza siano scarse o nulle, o in cui ci si attenda che la sostanza in esame sia tossica, occorre eseguire la prova principale.

30. La scelta delle concentrazioni limite dipende in genere dagli obblighi normativi. Quando si utilizza il regolamento (CE) n. 1272/2008, le concentrazioni limite per i gas, i vapori e gli aerosol sono rispettivamente di 20 000 ppm, 20 mg/l e 5 mg/l (o, altrimenti, la concentrazione massima raggiungibile) (3). Può risultare tecnicamente difficile raggiungere le concentrazioni limite di alcune sostanze, in particolare se si tratta di vapori e aerosol. Per le prove con aerosol, l'obiettivo principale è giungere ad una dimensione delle particelle che sia respirabile (ossia DAMM da 1 a 4 μm), il che è possibile con la maggior parte delle sostanze testate ad una concentrazione di 2 mg/l. [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Il regolamento (CE) n. 1272/2008 sconsiglia di effettuare delle prove a concentrazioni superiori alla concentrazione limite per ragioni di benessere degli animali. Le prove con concentrazioni limite devono essere prese in considerazione solo quando è molto probabile che i loro risultati rivestano un interesse diretto per la protezione della salute umana (3) e, in tal caso, occorre spiegarlo nella relazione. Nel caso di sostanze potenzialmente esplosive si devono adottare precauzioni per evitare condizioni che favoriscano un'esplosione. Per evitare il ricorso inutile ad animali, occorre effettuare una prova senza animali prima della prova limite, per accertarsi che sia possibile ottenere le condizioni di prova nella camera.

▼M4

31. Se alla concentrazione limite si registrano mortalità o stati di agonia, i risultati della prova limite possono fungere da studio di osservazione per ulteriori prove a concentrazioni diverse (cfr. studio principale). Se le proprietà fisiche o chimiche di una sostanza in esame impediscono di raggiungere una concentrazione limite, occorrerà testare la massima concentrazione raggiungibile. Se la letalità a questa concentrazione è inferiore al 50 %, non occorre proseguire la prova. Qualora non sia stato possibile raggiungere la concentrazione massima, occorre fornire, nella relazione di studio, una spiegazione e dati giustificativi. Se la concentrazione massima raggiungibile per un vapore non comporta tossicità, può essere necessario produrre la sostanza in esame sotto forma di aerosol liquido.

Studio principale: Protocollo tradizionale

32. In uno studio principale di norma si utilizzano cinque maschi e cinque femmine (o cinque animali del sesso più sensibile, se noto) per livello di concentrazione, con almeno tre livelli diversi di concentrazione. Per effettuare un'adeguata analisi statistica, occorre prevedere un numero sufficiente di livelli di concentrazione. L'intervallo di tempo tra l'esposizione dei vari gruppi è determinato dalla comparsa, dalla durata e dalla gravità dei segni di tossicità rilevati. L'esposizione al livello di concentrazione superiore deve essere ritardata fino a quando non si abbia la ragionevole certezza che gli animali già sottoposti alla prova siano sopravvissuti. Il responsabile dello studio può in tal caso adeguare la concentrazione «bersaglio» per il gruppo successivo. Per gli studi sulla tossicità per inalazione, che richiedono tecnologie sofisticate, non sarà sempre possibile procedere in questo modo; in tal caso l'esposizione degli animali alla concentrazione superiore si dovrà basare sull'esperienza acquisita e sui pareri di esperti. Per le prove riguardanti le miscele, è opportuno fare riferimento al documento di orientamento n. 39 (2).

PROTOCOLLO «CONCENTRAZIONE × TEMPO» (C × T)

Osservazioni generali: Protocollo C × t

33. Uno studio sequenziale «concentrazione × tempo» (C × t) può costituire un'alternativa al protocollo tradizionale quando si tratta di valutare la tossicità per inalazione (12) (13) (14). Nell'ambito di questo approccio gli animali sono esposti alla sostanza in esame a vari livelli di concentrazione e per durate di esposizioni variabili. Tutte le prove sono effettuate in camere di esposizione «a naso solo», in quanto le camere «a corpo intero» non sono adatte a questo protocollo. Il diagramma di flusso all'appendice 1 illustra questo protocollo. Un'analisi di simulazione ha evidenziato che il protocollo tradizionale e il protocollo C × t erano entrambi in grado di fornire valori affidabili della CL_{50} ma che il protocollo C × t consentiva generalmente di ottenere valori più affidabili per la CL_{01} e la CL_{10} (15).

34. Un'analisi di simulazione ha evidenziato che generalmente è opportuno utilizzare due animali per intervallo di C × t (un animale di ciascun sesso o due animali del sesso più sensibile) per testare 4 concentrazioni e 5 durate di esposizione nel corso di uno studio principale. Il responsabile dello studio, in determinate circostanze, può decidere di utilizzare due ratti per sesso per intervallo di C × t (15). L'utilizzo di 2 animali per sesso, per punto di concentrazione e di tempo può contribuire a ridurre gli errori sistematici e la variabilità delle stime, aumentare il tasso di precisione delle stime e migliorare la copertura dell'intervallo di confidenza. Tuttavia in caso di correlazione insufficiente dei dati (quando si utilizza un animale di ciascun sesso o due animali del sesso più sensibile), può bastare anche una quinta concentrazione di esposizione. Per ulteriori informazioni sul numero di animali e le concentrazioni da utilizzare per uno studio C × t, cfr. il documento di orientamento n. 39 (2).

▼M4

Studio di osservazione: Protocollo C × t

35. Uno studio di osservazione consente di stimare l'attività della sostanza in esame, e di scegliere più agevolmente i livelli di concentrazione per l'esposizione nello studio principale. Uno studio di osservazione con al massimo tre animali per sesso e per concentrazione può essere utile per scegliere un'adeguata concentrazione di partenza per lo studio principale e ridurre il numero di animali utilizzati, [per maggiori informazioni cfr. l'appendice III del documento di orientamento n. 39 (2)]. Per stabilire la differenza di sensibilità tra i sessi possono essere necessari tre animali per sesso. Questi animali devono essere oggetto di una sola esposizione, in genere di 240 minuti. La possibilità di generare atmosfere di prova adeguate deve essere valutata nel corso di prove tecniche preliminari senza animali. Di norma non occorre effettuare uno studio di osservazione se i dati sulla mortalità sono già disponibili [tratti da uno studio B.52 (4)]. Nel selezionare la concentrazione iniziale auspicata in uno studio B.2, il responsabile dello studio tiene conto dei profili di mortalità osservati in un qualsiasi studio B.52 (4) disponibile, per entrambi i sessi e per tutte le concentrazioni testate [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)].

Concentrazione iniziale: Protocollo C × t

36. La concentrazione iniziale (sessione di esposizione I) (appendice 1) è una concentrazione limite o una concentrazione scelta dal responsabile dello studio in base allo studio di osservazione. Dei gruppi formati da un animale di ciascun sesso sono esposti a questa concentrazione per periodi di durata variabile (15, 30, 60, 120 o 240 minuti) per un totale di 10 animali per quella che viene denominata «sessione di esposizione I» (appendice 1).

37. La scelta delle concentrazioni limite dipende in genere dagli obblighi normativi. Quando si utilizza il regolamento (CE) n. 1272/2008, le concentrazioni limite per i gas, i vapori e gli aerosol sono rispettivamente di 20 000 ppm, 20 mg/l e 5 mg/l (o, altrimenti, la concentrazione massima raggiungibile) (3). Può risultare tecnicamente difficile raggiungere le concentrazioni limite di alcune sostanze, in particolare se si tratta di vapori e aerosol. Per le prove su aerosol, l'obiettivo è giungere ad una dimensione delle particelle che sia respirabile (ossia DAMM da 1 a 4 μm) a una concentrazione limite di 2 mg/l. Ciò è possibile con la maggior parte delle sostanze chimiche in esame. Le prove con aerosol a concentrazioni superiori a 2 mg/l sono eseguite solo se si è riusciti a generare particelle di dimensioni respirabili [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Il regolamento (CE) n. 1272/2008 sconsiglia di effettuare delle prove a concentrazioni superiori alla concentrazione limite per ragioni di benessere degli animali (3). Le prove effettuate superando il limite di concentrazione vanno prese in considerazione solo se è altamente probabile che i loro risultati rivestano un interesse diretto per la protezione della salute umana (3) e occorre giustificare questa scelta nella relazione di studio. Nel caso di sostanze potenzialmente esplosive si devono adottare precauzioni per evitare condizioni che favoriscano un'esplosione. Per evitare l'uso inutile di animali, occorre effettuare una prova senza animali prima della prova alla concentrazione iniziale per accertarsi che è possibile ottenere nella camera le condizioni sperimentali di una prova a tale concentrazione.

38. Se alla concentrazione iniziale si verificano mortalità o agonie, i risultati a questa concentrazione possono fungere da punto di partenza per ulteriori prove ad altre concentrazioni (cfr. studio principale). Se la concentrazione limite non è raggiungibile per via delle proprietà fisiche o chimiche della sostanza in esame, si effettueranno le prove in questione alla concentrazione massima raggiungibile. Se la letalità a questa concentrazione è inferiore al 50 %, non occorre proseguire la prova. Qualora non sia stato possibile raggiungere la concentrazione massima, occorre fornire, nella relazione di studio, una spiegazione e dati giustificativi. Se la concentrazione massima raggiungibile per un vapore non comporta tossicità, può essere necessario produrre la sostanza in esame sotto forma di aerosol liquido.

▼M4

Studio principale: Protocollo C × t

39. La concentrazione iniziale (sessione di esposizione I) (appendice 1) testata nello studio principale è una concentrazione limite o una concentrazione scelta dal responsabile dello studio in base allo studio di osservazione. Se nel corso o successivamente alla sessione di esposizione I si riscontrano casi di mortalità, l'esposizione minima (C × t) che ha provocato la mortalità funge da parametro per stabilire la concentrazione e i periodi di esposizione per la sessione di esposizione II. Ciascuna sessione di esposizione successiva dipenderà dalla sessione precedente (cfr. appendice 1).

40. Per molte sostanze i risultati ottenuti alla concentrazione iniziale, insieme a quelli ottenuti nelle tre sessioni di esposizione supplementari su una scala temporale più corta (la durata dei periodi di esposizione successivi secondo una progressione geometrica di fattore √2), sono sufficienti per stabilire il rapporto di mortalità C × t (15), anche se può essere utile ricorrere ad una quinta concentrazione di esposizione [cfr. appendice 1 e documento di orientamento n. 39 (2)]. Per il trattamento matematico dei risultati per il protocollo C × T, cfr. appendice 1.

OSSERVAZIONI

41. Durante il periodo di esposizione è necessario eseguire frequenti esami clinici degli animali. Dopo l'esposizione, l'esame clinico va effettuato almeno due volte il giorno stesso dell'esposizione, o più spesso a seconda della risposta degli animali al trattamento, e almeno una volta al giorno nei successivi 14 giorni. Il periodo di osservazione non ha durata fissa, in quanto dipende dalla natura dei segni clinici, dal momento della loro comparsa e dalla durata del periodo di recupero. Un elemento importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun animale. Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia, per ragioni legate al loro benessere. Occorre fare attenzione, quando si effettuano gli esami clinici alla ricerca di segni di tossicità, a non confondere un cattivo aspetto iniziale e alterazioni respiratorie passeggere, imputabili al procedimento di esposizione, con la tossicità delle sostanze in esame che richiederebbe un'uccisione prematura degli animali. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento di orientamento OCSE (19) citato in bibliografia al punto (7). Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

42. Si osserveranno eventuali alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Si annoterà, laddove possibile, l'eventuale differenziazione tra gli effetti locali e sistemici. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. La misura della temperatura rettale può corroborare una bradipnea riflessa o un'ipo/ipertermia causate dal trattamento o dal confinamento.

Peso corporeo

43. Il peso di ciascun animale è rilevato e annotato una volta durante il periodo di adattamento, il giorno dell'esposizione, prima che questa abbia inizio (giorno 0), e almeno nei giorni 1, 3 e 7 (e successivamente una volta la settimana), così come al momento del decesso o dell'eutanasia, se posteriore al giorno 1. Il peso corporeo è manifestamente uno degli indici fondamentali di tossicità, pertanto gli animali che mostrano un calo ≥ 20 % rispetto al peso anteriore allo studio devono essere monitorati attentamente. Alla fine del periodo post esposizione si pesano e si sottopongono a eutanasia gli animali sopravvissuti.

▼M4

Patologia

44. Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso della prova o che sono sottoposti a eutanasia e ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a autopsia macroscopica. Se non è possibile eseguire l'autopsia subito dopo il rilevamento del decesso, l'animale deve essere refrigerato (non congelato) ad una temperatura sufficientemente bassa da ridurre al minimo l'autolisi. L'autopsia deve essere eseguita non appena possibile, di norma entro un giorno o due dal decesso. Per ogni animale si annoteranno tutte le alterazioni patologiche macroscopiche, prestando particolare attenzione a quelle delle vie respiratorie.

45. È possibile effettuare altri esami previamente inclusi nel disegno sperimentale, per ampliare il valore interpretativo dello studio, quali, ad esempio, la determinazione del peso polmonare nei ratti sopravvissuti e/o la ricerca, per esame microscopico, di irritazioni delle vie respiratorie. Si possono anche esaminare gli organi che mostrano macropatologie negli animali che sopravvivono più di 24 ore, così come gli organi per i quali si ha la certezza o il sospetto che siano stati colpiti. L'esame microscopico dell'intero apparato respiratorio può fornire informazioni utili sulle sostanze in esame che reagiscono con l'acqua, come gli acidi e le sostanze chimiche igroscopiche.

DATI E RELAZIONE

Dati

46. Si devono indicare il peso corporeo e i risultati dell'autopsia per ciascun animale. I dati degli esami clinici devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo sottoposto alla prova, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni specifici di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e l'esito dell'autopsia.

Relazione sulla prova

47. La relazione deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Animali sperimentali e condizioni di allevamento:

— descrizione delle condizioni di stabulazione, tra cui: numero (o modifica del numero) di animali per gabbia, materiale utilizzato per la lettiera, temperatura ambiente e umidità relativa, fotoperiodo e dieta,

— specie/ceppo utilizzati e giustificazione dell'impiego di specie diverse dal ratto,

— numero, età e sesso degli animali,

— metodo di randomizzazione,

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta e origine dell'acqua),

— descrizione dell'eventuale condizionamento prima della prova, in particolare per quanto concerne dieta, quarantena e terapie.

▼M4

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione),

— dati di identificazione e numero CAS (*Chemical Abstract Services*), se noto.

Veicolo:

— motivazione dell'utilizzo di un veicolo e giustificazione della scelta del veicolo utilizzato (se diverso dall'acqua),

— dati storici o paralleli che dimostrano che il veicolo non interferisce con i risultati dello studio.

Camera di inalazione:

— descrizione della camera di inalazione, che includa le dimensioni e il volume,

— provenienza e descrizione delle apparecchiature utilizzate per l'esposizione degli animali e per la generazione dell'atmosfera,

— apparecchi di misurazione della temperatura, dell'umidità, della granulometria e della concentrazione reale,

— fonte dell'aria, trattamento dell'aria immessa/estratta e sistema di climatizzazione utilizzato,

— metodi utilizzati per tarare l'apparecchiatura al fine di garantire l'omogeneità dell'atmosfera di prova,

— differenza di pressione (positiva o negativa),

— bocchette di esposizione per camera («a naso solo»); ubicazione degli animali nel sistema (camera di esposizione «a corpo intero»),

— omogeneità/stabilità nel tempo dell'atmosfera di prova,

— ubicazione dei sensori termometrici e igrometrici e dei punti di campionamento dell'atmosfera di prova nella camera,

— velocità del flusso d'aria, velocità del flusso d'aria in ogni bocchetta di esposizione («a naso solo») o rapporto tra il volume occupato dagli animali e il volume della camera («a corpo intero»),

— informazioni sull'apparecchiatura utilizzata per misurare l'ossigeno e il diossido di carbonio, se applicabile,

— tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera (t_{95}),

— numero di ricambi del volume per ora,

— dosatori (se applicabile).

Dati sull'esposizione:

— giustificazione della scelta della concentrazione bersaglio dello studio principale,

— concentrazioni nominali (ottenute dividendo la massa della sostanza in esame immessa nella camera d'inalazione per il volume dell'aria fatta circolare nella camera),

— concentrazioni reali ottenute nella zona in cui respirano gli animali; per le miscele in esame che producono forme fisiche eterogenee (gas, vapori, aerosol), si può analizzare separatamente ciascuna di esse,

▼M4

— esprimere le concentrazioni atmosferiche in unità di massa (ad esempio, mg/l, mg/m^3 ecc.), indicando facoltativamente tra parentesi le unità di volume (ad esempio, ppm, ppb ecc.),

— distribuzione delle dimensioni delle particelle, diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (σ_g), con relativi metodi di calcolo; devono essere indicate anche le singole analisi granulometriche.

Condizioni sperimentali

— ragguagli sulla preparazione della sostanza chimica in esame, precisando le eventuali procedure impiegate per ridurre la granulometria delle sostanze solide o per preparare soluzioni della sostanza in esame. Qualora i processi meccanici abbiano alterato la composizione della sostanza, includere i risultati delle analisi eseguite per verificare la composizione,

— descrizione (di preferenza corredata di uno schema) dell'apparecchiatura utilizzata per generare l'atmosfera sperimentale e per esporvi gli animali,

— ragguagli sul metodo d'analisi chimica impiegato e sulla convalida di tale metodo (specificando l'efficienza di recupero della sostanza in esame dal mezzo campionato),

— giustificazione della scelta delle concentrazioni sperimentali.

Risultati

— tabella con la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera,

— tabella con le concentrazioni nominali e reali nella camera,

— tabella con i dati granulometrici, ivi compresi i dati analitici sul campionamento, sulla distribuzione granulometrica e i calcoli del DAMM e della σ_g,

— tabella con i dati sulle risposte e il livello di concentrazione per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa, natura, gravità, inizio e durata degli effetti),

— peso corporeo di ciascun animale oggetto dello studio; data e ora della morte se avviene prima dell'eutanasia prevista, momento dell'insorgenza e evoluzione dei segni di tossicità e, se del caso, loro reversibilità,

— reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale,

— stime della letalità (CL_{50}, DL_{01}), con limiti di confidenza del 95 % e inclinazione (se fornita dal metodo di valutazione),

— relazione statistica, ivi compresa la stima del fattore n (per il protocollo $C \times t$). Occorre fornire il nome del software statistico utilizzato.

▼M4

Discussione e interpretazione dei risultati

— dare particolare importanza alla descrizione dei metodi impiegati per soddisfare i criteri del presente metodo di prova, ad esempio per quanto concerne la concentrazione limite o la granulometria,

— esaminare la respirabilità delle particelle alla luce dei risultati complessivi, in special modo se i criteri granulometrici non sono stati soddisfatti,

— spiegare perché è stato necessario sottoporre ad eutanasia animali che manifestavano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente, in base ai criteri illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE citato in bibliografia al punto (8),

— se una prova in base al capitolo B.52 del presente allegato (4) ha dovuto essere interrotta in favore del presente metodo B.2 occorre spiegare il motivo,

— nella valutazione globale dello studio, occorre tener conto della coerenza dei metodi utilizzati per determinare le concentrazioni nominali e reali e del rapporto tra loro,

— occorre esaminare la causa probabile di decesso e il meccanismo d'azione prevalente (sistemico o locale).

BIBLIOGRAFIA:

(1) OCSE (2009). Determinazione della tossicità acuta per inalazione. Linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 403, OCSE, Parigi. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) OCSE (2009). Documento di orientamento per la determinazione della tossicità acuta per inalazione. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OCSE, Parigi. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(3) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

(4) Capitolo B.52 del presente allegato. Tossicità acuta per inalazione — Metodo della classe di tossicità acuta.

(5) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: Test di resistenza elettrica transcutanea (TER).

(6) Capitolo B.40 *bis* testguidelines del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: Test su modelli di pelle umana.

(7) OCSE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. Linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 435 OCSE, Parigi. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OCSE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OCSE, Parigi. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Appl. Toxicol. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OCSE (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OCSE, Parigi. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Londra/New York.

DEFINIZIONE

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

▼M4

Appendice 1

Protocollo C × t

1. Uno studio sequenziale «concentrazione × tempo» (C × t) può costituire un'alternativa al protocollo tradizionale quando si tratta di valutare la tossicità per inalazione (12) (13) (14). Va eseguito di preferenza quando sussiste una particolare esigenza normativa o scientifica che richiede prove su animali per varie durate di esposizione, ad esempio per la pianificazione della risposta di emergenza o la pianificazione territoriale. Si inizia solitamente con una prova alla concentrazione limite (sessione di esposizione I) nel corso della quale gli animali sono esposti alla sostanza in esame per cinque durate diverse (ad esempio 15, 30, 60, 120 e 240 minuti) in modo da ottenere varie durate di esposizione nel corso di una stessa sessione (cfr. figura 1). Quando si utilizza il regolamento (CE) n. 1272/2008, le concentrazioni limite per i gas, i vapori e gli aerosol sono rispettivamente di 20 000 ppm, 20 mg/l e 5 mg/l. Questi livelli possono essere superati solo se esistono motivi di carattere normativo o scientifico per effettuare delle prove a questi livelli di concentrazione (cfr. paragrafo 37 del capitolo B.2).

2. Qualora si abbiano poche o nessuna informazione sulla tossicità della sostanza in esame, occorre seguire uno studio di osservazione in cui gruppi di almeno tre animali per sesso sono esposti a concentrazioni bersaglio selezionate dal responsabile dello studio, di norma per 240 minuti.

3. Se nel corso della sessione di esposizione I è saggiata una concentrazione limite e si osserva una mortalità inferiore al 50 %, non occorre effettuare prove aggiuntive. Se, per motivi regolamentari o scientifici, occorre stabilire la relazione concentrazione/tempo/reazione per livelli più elevati rispetto alla concentrazione limite indicata, l'esposizione successiva è effettuata, ad esempio, al doppio della concentrazione limite (2L nella figura 1).

4. Se, alla concentrazione limite, viene osservata una tossicità, sono necessarie prove aggiuntive (studio principale). Queste esposizioni aggiuntive sono effettuate a concentrazioni inferiori (figura 1: sessioni di esposizione II, III o IV) o a concentrazioni superiori per periodi più brevi (figura 1: sessione di esposizione IV) adeguati e meno distanziati.

5. La prova (concentrazione iniziale e concentrazioni aggiuntive) è realizzata con 1 animale di ciascun sesso per punto concentrazione/tempo o con due animali del sesso più sensibile alla sostanza in esame per punto concentrazione/tempo. Il responsabile dello studio, in determinate circostanze, può decidere di utilizzare 2 ratti di ciascun sesso per punto concentrazione/tempo (o 4 animali del sesso più sensibile per punto concentrazione/tempo) (15). L'utilizzo di 2 animali per sesso, per punto di concentrazione e di tempo generalmente riduce le distorsioni e la variabilità delle stime, aumenta il tasso di precisione delle stime e migliora la copertura dell'intervallo di confidenza legato al presente protocollo. Ulteriori informazioni sono riportate nel documento di orientamento n. 39 (2).

6. Idealmente ciascuna sessione di esposizione è effettuata in una sola giornata. Ciò consente di ritardare l'esposizione successiva fino a quando non si abbia la ragionevole certezza che gli animali già sottoposti alla prova siano sopravvissuti e permette al responsabile dello studio di adattare la concentrazione e la durata per la successiva sessione di esposizione. È consigliabile iniziare ogni sessione di esposizione con il gruppo che sarà esposto più a lungo, ossia il gruppo destinato ad un'esposizione di 240 minuti, seguito dal gruppo di 120 minuti e via dicendo. Se, ad esempio, gli animali del gruppo di 240 minuti dopo 90 minuti iniziano a morire o mostrano segni evidenti di tossicità (ad esempio variazioni estreme nel pattern respiratorio come la respirazione difficoltosa), non avrebbe senso esporre un gruppo per 120 minuti perché la mortalità sarebbe probabilmente del 100 %. In tal caso il responsabile dello studio deve optare per durate di esposizione più brevi per la concentrazione in questione (ad esempio, 90, 65, 45, 33 e 25 minuti).

▼M4

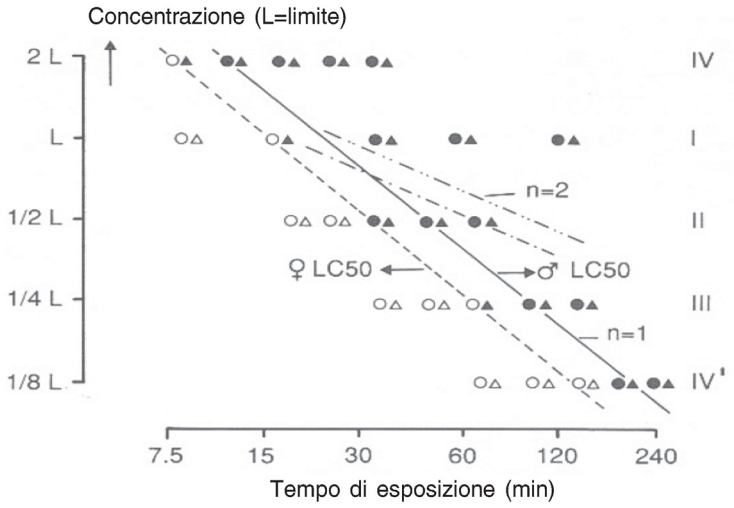
7. La concentrazione nella camera deve essere misurata spesso per determinare la concentrazione media ponderata per il tempo per ogni durata di esposizione. Laddove possibile, nell'analisi statistica occorre utilizzare l'orario della morte di ciascun animale (più che la durata di esposizione).

8. Occorre esaminare i risultati delle quattro prime sessioni di esposizione per individuare gli eventuali dati mancanti nella curva concentrazione-tempo (cfr. figura 1). Se mancano dei dati, si può realizzare un'esposizione supplementare (5ª concentrazione). La concentrazione e le durate di esposizione di questa 5ª esposizione sono scelte per colmare questa lacuna.

9. Tutte le sessioni di esposizione (ivi compresa la prima) sono utilizzate per calcolare il rapporto concentrazione-tempo-risposta mediante un'analisi statistica (16). Se possibile, per ciascun intervallo C × t si utilizzerà la concentrazione media ponderata in funzione del tempo e la durata di esposizione fino alla morte (se questa si verifica nel corso dell'esposizione).

Figura 1

Illustrazione ipotetica di un rapporto concentrazione-tempo-mortalità nei ratti



Simboli vuoti = animali sopravissuti. Simboli pieni = animali morti

Triangoli = femmine; Cerchi = maschi

Linea piena = valori di CL_{50} (da 7,5 a 240 min.) per i maschi n = 1

Linea tratteggiata = valori di CL_{50} (da 7,5 a 240 min.) per le femmine n = 1

Linee punteggiate = valori della CL_{50} ipotetica per i maschi e le femmine se n fosse stato pari a 2 (12).

Legenda

Concentrazione:

Tempo di esposizione:

▼M4

10. Qui di seguito è riportato un esempio della procedura per fasi:

Sessione di esposizione I — Prova alla concentrazione limite (cfr. figura 1)

— 1 animale/sesso per punto concentrazione/tempo, 10 animali in tutto [a]

— Concentrazione bersaglio [b] = concentrazione limite

— Esporre cinque gruppi di animali a questa concentrazione bersaglio per, rispettivamente, 15, 30, 60, 120 e 240 minuti.

↓

Sessione di esposizione II [c] — Studio principale

— 1 animale/sesso per punto concentrazione/tempo, 10 animali in tutto

— Esporre cinque gruppi di animali ad una concentrazione inferiore [d] (1/2L) per durate di esposizione leggermente più lunghe (spaziatura di √2; cfr. figura 1).

↓

Sessione di esposizione III — Studio principale

— 1 animale/sesso per punto concentrazione/tempo, 10 animali in tutto

— Esporre cinque gruppi di animali ad una concentrazione inferiore [d] (1/4L) per durate di esposizione leggermente più lunghe (spaziatura di √2; cfr. figura 1).

↓

Sessione di esposizione IV' — Studio principale

— 1 animale/sesso per punto concentrazione/tempo; 10 animali in tutto

— Esporre cinque gruppi di animali ad una concentrazione inferiore [d] (1/8L) per durate di esposizione leggermente più lunghe (spaziatura di √2; cfr. figura 1).

oppure

---

[a] Se non sono disponibili informazioni sulla sensibilità di ciascun sesso, si utilizzeranno ratti di entrambi i sessi, ossia 1 animale di ciascun sesso per concentrazione. In base alle informazioni disponibili o se nel corso della sessione di esposizione risulta che uno dei due sessi è più sensibile, per le prove successive si utilizzeranno 10 animali di questo sesso (2 animali per punto concentrazione/tempo) a ciascun livello di concentrazione.

[b] Quando si utilizza il regolamento (CE) n. 1272/2008, le concentrazioni limite per i gas, i vapori e gli aerosol sono rispettivamente di 20 000 ppm, 20 mg/l e 5 mg/l. Qualora si preveda una tossicità o se i risultati dello studio di osservazione lo consigliano, si deve optare per concentrazioni iniziali inferiori. Per esigenze normative o scientifiche, si possono utilizzare concentrazioni più elevate.

[c] Idealmente, l'esposizione al livello di concentrazione superiore deve essere ritardata fino a quando non si abbia la ragionevole certezza che gli animali già sottoposti alla prova siano sopravvissuti. Il responsabile dello studio può in tal caso adeguare la concentrazione «bersaglio» per la sessione di esposizione successiva.

[d] La dose minima (concentrazione × tempo) che provoca mortalità nel corso della prova alla concentrazione iniziale (prima sessione di esposizione) fungerà da riferimento per stabilire la combinazione successiva di concentrazione e durate di esposizione. In genere la concentrazione è dimezzata (1/2L) e gli animali sono esposti per periodi meno distanziati, distribuiti in una serie geometrica di un fattore 1,4 (√2; cfr. riferimento bibliografico 11) intorno al tempo corrispondente alla dose letale minima (tempo × concentrazione) osservato nel corso della prima esposizione. Nella figura 1, nel corso della sessione di esposizione I la mortalità è stata osservata per la prima volta dopo 15 minuti. Le durate nel corso della sessione II sono pertanto incentrate su 30 minuti, e sono di 15, 21, 30, 42 e 60 min. Dopo le prime due esposizioni, si raccomanda vivamente di tracciare i risultati in un grafico analogo a quello della figura 1, e di verificare se il rapporto tra concentrazione e tempo definisce un angolo di 45 gradi (n = 1) o se la curva del rapporto-concentrazione-tempo-risposta è meno ripida (n = 2, ad esempio) o più ripida (n = 0,8 ad esempio). In quest'ultimo caso, è vivamente consigliato di adeguare le concentrazioni e le durate successive.

▼M4

Sessione di esposizione IV — Studio principale

— 1 animale/sesso per punto concentrazione/tempo; 10 animali in tutto

— Esporre cinque gruppi animali ad una concentrazione superiore ([e]) (2L) per durate di esposizione leggermente più brevi (spaziatura di $\sqrt{2}$; cfr. figura 1).

Trattamento matematico dei risultati per il protocollo C × t

11. Una procedura C × t costituita da 4 o 5 concentrazioni di esposizione e 5 durate di esposizione genera 20 o 25 valori, rispettivamente. Con questi valori, la relazione C × t può essere calcolata con un'analisi statistica (16):

Equazione 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

in cui C = concentrazione; t = durata di esposizione, o

Equazione 2:

$$Risposta = f(C^n t)$$

in cui $n = b_1/b_2$.

Con l'equazione 1, il valore CL_{50} può essere calcolato per un determinato periodo di tempo (ad esempio 4 ore, 1 ora, 30 minuti, o qualsiasi altro periodo compreso nell'intervallo dei periodi testati) utilizzando P = 5 (50 % di risposta). La regola di Haber si applica solo quando n = 1. La CL_{01} può essere calcolata con P = 2,67.

([e]) A volte può essere necessario aumentare la concentrazione (2L) su una scala temporale diversa, con periodi di esposizione ancora meno distanziati secondo una progressione geometrica di fattore 1,4 ($\sqrt{2}$) incentrata sul tempo corrispondente al livello di dose letale minimo osservato al momento della prima esposizione. La durata minima di esposizione deve preferibilmente superare 5 minuti; la durata massima non deve superare 8 ore.

▼B

B.3. **TOSSICITÀ ACUTA PER VIA CUTANEA**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene applicata a livelli di dose graduati, un livello di dose per gruppo, sulla cute di vari gruppi di animali di saggio. Si procede poi all'osservazione degli effetti e degli eventi letali. Gli animali morti o sacrificati durante il saggio sono sottoposti a necroscopia e i sopravvissuti lo sono a conclusione del saggio.

Può essere necessario sottoporre a eutanasia gli animali che mostrano segni gravi e persistenti di sofferenza e di dolore; non bisogna eseguire la somministrazione di dosi delle sostanze in esame in una maniera che notoriamente provoca dolore e sofferenza marcate a motivo delle proprietà corrosive o gravemente irritanti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO ADOTTATO PER IL SAGGIO

1.6.1. **Preparazioni**

Per almeno cinque giorni prima dell'esperimento, gli animali sono tenuti nelle gabbie usate per il saggio nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento. Prima del saggio, gli animali che dovranno essere giovani adulti e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi sperimentali. Circa 24 ore prima del saggio, si effettua il taglio o la rasatura del pelo nella parte dorsale del corpo della cavia. Durante le operazioni di taglio o rasatura, si deve badare a non ledere la cute dell'animale per evitarne l'abrasione che potrebbe alterarne la permeabilità. Si dovrà preparare almeno il 10 % della superficie corporea per l'applicazione della sostanza in esame. Le sostanze solide, che potranno essere eventualmente ridotte in polvere, dovrebbero essere inumidite con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la cute. Se viene utilizzato un veicolo, si dovrà tener conto dell'influenza dello stesso sulla penetrazione cutanea della sostanza in esame. Le sostanze liquide generalmente vengono saggiate senza diluizione.

1.6.2. **Condizioni del saggio**

1.6.2.1. *Animali da esperimento*

Possono essere utilizzati ratti o conigli adulti. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrebbe essere giustificato. Dovrebbero essere utilizzati ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso, all'inizio della prova l'intervallo di variazione del peso degli animali utilizzati non dovrebbe essere superiore a ± 20 % del valore medio.

▼B

1.6.2.2. *Numero e sesso*

Per ciascun saggio vengono usati almeno 5 animali a ciascun livello di dosaggio. Essi dovrebbero essere tutti dello stesso sesso. Se si usano femmine, dovrebbero esse nullipare e non gravide. Nel caso siano disponibili informazioni che dimostrano che un sesso è nettamente più sensibile, si dovrebbero usare animali di questo sesso.

Nota: nei saggi di tossicità acuta con animali di ordine superiore ai roditori, si dovrà prendere in considerazione l'uso di un numero minore di animali. Le dosi devono essere accuratamente scelte e si deve fare ogni sforzo possibile per non superare dosi moderatamente tossiche. In tali prove si dovrebbe evitare la somministrazione di dosi letali della sostanza in esame.

1.6.2.3. *Livelli di dosaggio*

Questi dovranno essere in numero sufficiente, almeno 3, e adeguatamente intervallati per produrre uno spettro di effetti tossici e di tassi di mortalità. Nel decidere i dosaggi occorre tener presente qualsiasi effetto irritante o corrosivo. I dati dovrebbero essere sufficienti per ottenere una curva dose-risposta e, quando possibile, permettere una determinazione accettabile della DL_{50}.

1.6.2.4. *Saggio limite*

Si può eseguire un saggio limite ad un livello di dosaggio di almeno 2 000 mg/kg peso corporeo su un gruppo di 5 animali maschi e 5 femmine usando le procedure sopra descritte. Se si produce una mortalità dovuta al composto, può essere necessario considerare uno studio completo.

1.6.2.5. *Periodo di osservazione*

Il periodo di osservazione dovrebbe essere almeno di 14 giorni. Tuttavia tale durata non è tassativa. Essa dovrebbe dipendere dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità della loro insorgenza e dalla lunghezza del periodo di guarigione; se necessario, quindi, essa potrà essere prolungata. Il momento in cui compaiono e spariscono i sintomi di tossicità, la loro durata e il momento in cui interviene il decesso, sono importanti soprattutto nel caso in cui la sostanza tenda a causare mortalità ritardata.

1.6.3. **Procedimento**

Ogni gabbia deve contenere un solo animale. La sostanza in esame dovrà essere applicata uniformemente su una superficie pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie può essere inferiore, ma dovrà essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme.

Durante il periodo di esposizione di 24 ore, le sostanze in esame dovranno essere tenute a contatto diretto della cute mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrebbe essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e assicurare che gli animali non ingeriscano la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere usati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma l'immobilizzazione completa non è consigliabile.

▼B

Alla fine del periodo di esposizione si dovrà rimuovere la sostanza residua utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle.

Le osservazioni dovranno essere registrate sistematicamente non appena fatte, badando a tenere separati i dati per ciascun animale. Durante il primo giorno le osservazioni dovranno essere frequenti. Un attento esame clinico dovrà essere effettuato almeno una volta al giorno per 5 giorni per settimana. Le altre osservazioni dovrebbero essere effettuate quotidianamente, agendo appropriatamente per minimizzare la perdita di animali da studiare, ad esempio necroscopia o refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi.

Le osservazioni dovrebbero tener conto delle alterazioni riscontrate nel pelo, nella cute trattata, negli occhi e nelle membrane mucose e anche nel sistema respiratorio, circolatorio, nel sistema nervoso autonomo e centrale, nell'attività somatomotoria e nel comportamento dell'animale. Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui sopraggiunge il decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono alla fine del saggio sono sottoposti a necroscopia. Tutte le variazioni patologiche macroscopiche dovranno essere registrate. Ove del caso, dovrebbero essere prelevati tessuti per l'esame istopatologico.

Valutazione della tossicità nell'altro sesso

Dopo il completamento dello studio su un sesso, si somministra almeno un intervallo di dose ad un gruppo di 5 animali dell'altro sesso per controllare che gli animali di questo sesso non siano nettamente più sensibili alla sostanza in esame. In circostanze particolari può essere giustificato l'uso di un minor numero di animali. Nel caso in cui siano disponibili informazioni adeguate che dimostrano che gli animali del sesso controllato sono nettamente più sensibili, si può fare a meno di effettuare la prova su animali dell'altro sesso.

2. **DATI**

I risultati dovranno essere riassunti in forma tabellare indicante per ogni singolo gruppo di saggio il numero di animali presenti all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri segni di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necroscopia. Il peso di ciascun animale dovrà essere determinato e registrato poco prima dell'applicazione della sostanza, poi settimanalmente e al momento del decesso; le variazioni ponderali dovranno essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza sia superiore a un giorno. Gli animali che vengono sottoposti ad eutanasia in conseguenza di sofferenza e dolore dovuti al composto vengono registrati come morti in conseguenza del composto. La DL_{50} può essere determinata con un metodo riconosciuto.

La valutazione dei dati dovrebbe includere il rapporto, se esistente, tra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e gravità di tutte le alterazioni, incluse quelle comportamentali e cliniche, le lesioni macroscopiche, le variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

▼B

— specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.;

— condizioni sperimentali (inclusa la tecnica di pulizia della cute e il tipo di medicazione; occlusiva o non occlusiva);

— livelli di dosaggio (col veicolo, se usato, e concentrazione);

— sesso degli animali sottoposti a somministrazione;

— tabulato dei dati di risposta per dose e livello di dosaggio (cioè il numero di animali morti o sacrificati durante la prova; numero di animali che presentano sintomi di tossicità; numero di animali esposti);

— tempo intercorso tra la somministrazione della sostanza e la morte, ragioni e criteri usati per la eutanasia di animali;

— tutte le osservazioni;

— valore della DL_{50} per il sesso sottoposto ad uno studio completo, determinato dopo 14 giorni, specificando il metodo di determinazione;

— intervallo di confidenza statistica del 95 % per la DL_{50} (se può essere fornito);

— curva dose-mortalità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo consente);

— risultati necroscopici;

— qualsiasi altro reperto istopatologico;

— risultati di eventuali saggi sull'altro sesso;

— discussione dei risultati (occorre dedicare una particolare attenzione all'effetto che la eutanasia di animali durante la prova può avere sul valore calcolato della DL_{50});

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFIA**

Vedi introduzione generale, parte B (punto E).

▼B

B.4. **TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA**

1. **METODO**

Questo metodo corrisponde al TG 404 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai miglioramenti possibili in relazione al benessere degli animali e alla valutazione di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio. Il metodo comprende la raccomandazione di eseguire, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per la corrosione/irritazione, un'analisi dell'importanza delle prove *(weight-of-the-evidence analysis)* sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di svilupparli mediante l'applicazione di saggi sequenziali (1). La strategia di saggio raccomandata comprende l'esecuzione di saggi in vitro validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al presente metodo. Nel saggio iniziale *in vivo* si raccomanda inoltre di applicare, ove opportuno, all'animale i tre cerotti per il saggio da contatto uno dopo l'altro, anziché simultaneamente.

Nell'interesse sia dell'accuratezza scientifica, sia del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggi *in vivo* finché non siano stati valutati, in un'analisi dell'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione cutanea della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (2)(3), nonché i risultati di test *in vitro* o *ex vivo* validati ed accettati (4)(5)(5a). Questa analisi deve ridurre la necessità di eseguire test *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistono già prove sufficienti derivanti da altri studi in relazione a questi due fattori.

Nell'Allegato al presente metodo è inclusa e consigliata una strategia a tappe, che prevede l'esecuzione di saggi validati *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (6), ed è stata adottata come strategia raccomandata di test nel GHS *(Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances)* (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (7). Si raccomanda di adottare la strategia prima di passare ai saggi *in vivo*. Nel caso di nuove sostanze, si raccomanda di adottare un approccio graduale per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per ottenere i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio graduale.

Se non è possibile determinare la corrosività o il potere irritante usando un'analisi dell'importanza delle prove, coerente con la strategia di saggi sequenziali, va preso in considerazione un saggio *in vivo* (cfr. Allegato).

▼B

1.2 DEFINIZIONI

Irritazione cutanea: produzione di danni reversibili alla pelle in seguito all'applicazione di una sostanza in esame per un massimo di 4 ore.

Corrosione cutanea: produzione di danni irreversibili alla pelle; in particolare, necrosi visibile attraverso l'epidermide e all'interno del derma, in seguito all'applicazione della sostanza in esame per un massimo di quattro ore. Le reazioni corrosive sono caratterizzate da ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, alla fine dell'osservazione, il giorno 14, da alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie effettuare eventualmente un esame istopatologico.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose sulla pelle della cavia; le zone di pelle non trattate dell'animale servono da controllo. A intervalli specificati si valuta e si attribuisce un punteggio al grado di irritazione/corrosione, che va ulteriormente descritto per fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere di sopprimere gli animali moribondi o che soffrono gravemente (8).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1 **Preparazione per il saggio *in vivo***

1.4.1.1 *Selezione delle specie*

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino; usare giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altre specie.

1.4.1.2 *Preparazione degli animali*

All'incirca 24 ore prima del saggio occorre rasare il pelo nella zona dorsale del tronco degli animali evitando di scorticare la pelle. Usare solo animali la cui pelle è sana e intatta.

Alcuni ceppi di coniglio presentano zone di pelo più denso che sono più evidenti in alcuni periodi dell'anno. Tali aree di crescita densa del pelo non vanno usate come punti per il saggio.

1.4.1.3 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (± °3 C) per i conigli. L'umidità relativa deve raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, ma occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

▼B

1.4.2 **Procedura**

1.4.2.1 *Applicazione della sostanza in esame*

La sostanza in esame va applicata su una zona ridotta (circa 6 cm^2) di pelle e coperta con una garza fissata con un cerotto non irritante. Nei casi in cui non è possibile l'applicazione diretta (ad es. liquidi e alcune paste), la sostanza in esame va prima applicata sulla garza, che poi è a sua volta applicata sulla pelle. La garza va mantenuta a contatto con la pelle, ma allentata, mediante una fasciatura semiocclusiva, per tutta la durata del periodo di esposizione. Se la sostanza in esame è applicata sulla garza, essa va appoggiata sulla pelle in modo che la sostanza sia bene a contatto e si distribuisca uniformemente. Occorre impedire che l'animale abbia accesso alla garza e ingerisca o inali la sostanza in esame.

Le sostanze sperimentali liquide si usano generalmente non diluite. Per l'esame dei solidi (che possono essere ridotti in polvere, se ritenuto necessario) la sostanza in esame va inumidita con la minor quantità d'acqua (o, ove necessario, di un altro eccipiente adeguato) sufficiente ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se si impiegano eccipienti diversi dall'acqua, la potenziale influenza dell'eccipiente sull'irritazione della pelle da parte della sostanza in esame deve essere minima o nulla.

Al termine del periodo di esposizione, che è normalmente di 4 ore, la sostanza in esame residua va rimossa, ove possibile, usando acqua o un solvente adeguato senza alterare la risposta da essa provocata e l'integrità dell'epidermide.

1.4.2.2 *Livello di dosi*

Sul punto prescelto per il saggio va applicata una dose di 0,5 ml di liquido o 0,5 g di solido o pasta.

1.4.2.3 *Saggio iniziale (Saggio di irritazione/corrosione cutanea in vivo su un solo animale)*

Si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio *in vivo* usando un solo animale, soprattutto quando si sospetta che la sostanza sia potenzialmente corrosiva, in conformità alla strategia dei saggi sequenziali (cfr. Allegato 1).

Quando una sostanza è stata giudicata corrosiva sulla base di un'analisi dell'importanza delle prove, non è necessario eseguire ulteriori saggi su animali. Per la maggior parte delle sostanze sospettate di essere corrosive, non è normalmente necessario eseguire ulteriori saggi *in vivo*. Tuttavia, nei casi in cui si ritiene giustificato ottenere altri dati, in quanto le prove sono insufficienti, è possibile effettuare saggi limitati su animali secondo l'approccio seguente: all'animale si applicano un massimo di tre cerotti con garza per il saggio da contatto, in sequenza. Il primo cerotto è tolto dopo tre minuti. Se non si osservano reazioni cutanee gravi, si applica un secondo cerotto, che è rimosso dopo un'ora. Se le osservazioni in questa fase indicano che è possibile estendere l'esposizione a quattro ore, senza causare sofferenze, si applica un terzo cerotto, che è rimosso dopo quattro ore, e si valuta la reazione.

Se dopo una qualsiasi delle tre esposizioni in sequenza si osserva un effetto corrosivo, il saggio va immediatamente interrotto. Se dopo la rimozione dell'ultimo cerotto non si osserva alcun effetto corrosivo, si mantiene l'animale sotto osservazione per 14 giorni, a meno che la corrosione non si manifesti più precocemente.

▼B

Nei casi in cui non si prevede che la sostanza in esame produca corrosione, ma che possa essere irritante, applicare un unico cerotto a un solo animale per quattro ore.

1.4.2.4 *Saggio di conferma (saggio di irritazione cutanea in vivo con ulteriori animali)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su due altri animali al massimo, ciascuno con un cerotto, per un periodo di esposizione di quattro ore. Se nel saggio iniziale si osserva un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente due altri animali. Nel caso eccezionale in cui non sia eseguito il saggio iniziale, è possibile trattare due o tre animali con un solo cerotto, che è poi asportato dopo quattro ore. Quando si usano due animali, se entrambi evidenziano la stessa reazione, non sono necessari altri saggi, altrimenti si sottopone al saggio anche il terzo animale. È possibile che siano necessari altri animali per valutare le reazioni dubbie.

1.4.2.5 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi. Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati per un massimo di 14 giorni dopo la rimozione dei cerotti. In caso di reversibilità prima dei 14 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.6 *Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni cutanee*

Esaminare tutti gli animali per vedere se presentano segni di eritema e di edema e valutare le reazioni a 60 minuti e successivamente a 24, 48 e 72 ore dopo la rimozione del cerotto. Per il saggio iniziale su un solo animale, esaminare subito la zona prescelta per il saggio dopo la rimozione del cerotto. Le reazioni cutanee sono classificate e registrate in base ai gradi indicati nella tabella allegata. Se la pelle presenta una lesione che non può essere identificata come irritazione o corrosione a 72 ore, può essere necessario proseguire le osservazioni fino al giorno 14, per determinare la reversibilità degli effetti. Oltre alle osservazioni dell'irritazione, descrivere e documentare tutti gli effetti tossici locali, come la perdita del grasso cutaneo, ed eventuali effetti sistemici negativi (ad es. effetti sui segni clinici di tossicità e sul peso corporeo). Per chiarire le reazioni dubbie, valutare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

La classificazione delle reazioni cutanee è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono il saggio e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio usato (cfr. tabella più avanti). Potrebbe essere utile una guida illustrata per la classificazione dell'irritazione cutanea e di altre lesioni (9).

2. **DATI**

2.1 PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio vanno riassunti sotto forma di tabella nella relazione finale sul saggio e devono coprire tutte le voci elencate al punto 3.1.

▼B

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare il grado di irritazione cutanea insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. Le reazioni individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I risultati individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e devono essere valutati insieme a tutte le altre osservazioni emerse dallo studio.

Nella valutazione delle reazioni irritanti è necessario considerare la reversibilità delle lesioni cutanee. Quando reazioni quali alopecia (zona limitata), ipercheratosi, iperplasia e desquamazione persistono fino alla fine del periodo di osservazione di 14 giorni, la sostanza in esame va considerata irritante.

3. **RAPPORTO**

3.1 RAPPORTO SUL SAGGIO

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Giustificazione del saggio *in vivo*: analisi dell'importanza delle prove di dati pre-esistenti, compresi i risultati della strategia dei saggi sequenziali:

— descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggi precedenti;

— dati ricavati in ciascuna fase della strategia dei saggi;

— descrizione dei saggi in vitro eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;

— analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*.

Sostanza in esame:

— dati di identificazione (ad es. numero CAS, origine, purezza, impurità note, numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti.

Eccipiente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;

— giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Cavie:

— specie/ceppo usato, motivazione per l'uso di animali diversi dal coniglio albino;

— numero di animali di ciascun sesso;

— peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;

— età all'inizio dello studio;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.

▼B

Condizioni del saggio:

— tecnica di preparazione del punto di applicazione del cerotto;

— dettagli relativi al materiale del cerotto e alla tecnica di applicazione del cerotto;

— dettagli relativi a preparazione, applicazione e rimozione della sostanza in esame.

Risultati:

— tabulazione dei punteggi delle reazioni di irritazione/corrosione per ciascun animale in tutti i momenti di misurazione;

— descrizione di tutte le lesioni osservate;

— descrizione della natura e del grado di irritazione o corrosione osservate e degli eventuali reperti istopatologici;

— descrizione di altri effetti negativi locali (ad es. perdita del grasso cutaneo) e sistemici oltre all'irritazione e alla corrosione cutanea.

Discussione dei risultati

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23,410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.

(5a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996. (http://-www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998. (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Available from OECD Secretariat upon request].

▼B

Tabella I

CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI CUTANEE

Eritema e formazione di escara

Assenza di eritema	0
Eritema molto lieve (appena percettibile)	1
Eritema ben definito	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso vivo) fino alla formazione di escara che impedisce la classificazione dell'eritema	4

Massimo possibile: 4

Formazione di edema

Assenza di edema	0
Edema molto lieve (appena percettibile)	1
Edema lieve (bordi dell'area ben definiti dal gonfiore)	2
Edema moderato (area sollevata di circa 1 mm)	3
Edema grave (area sollevata di oltre 1 mm ed estesa oltre la zona di esposizione)	4

Massimo possibile: 4

Per chiarire le reazioni dubbie è possibile eseguire un esame istopatologico.

▼B

Allegato

Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee

CONSIDERAZIONI GENERALI

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività cutanea di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi in vivo. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione cutanea di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi in vivo, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda l'uso di un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione cutanea delle sostanze e determinare se occorre eseguire altri studi, diversi da quelli cutanei in vivo, per caratterizzare meglio tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne il potenziale di corrosività/irritazione cutanea. La strategia dei saggi descritta nel presente allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1), ed è stata successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28ª riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

Questa strategia dei saggi sequenziali non è parte integrante del metodo di prova B.4., ma esprime l'approccio raccomandato per determinare le caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi in vivo sull'irritazione/corrosione cutanea. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio in vivo e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un approccio per valutare i dati esistenti sulle caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. Essa raccomanda inoltre l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* di irritazione/corrosione cutanea in circostanze specifiche.

DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI VALUTAZIONE E SAGGI

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), occorre valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi cutanei in vivo. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove vanno valutati tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e occorre giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, vanno evitati gli studi in vivo delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

▼B

Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1). Considerare innanzi tutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali, ad es. da studi di tossicità da esposizione cutanea singola o ripetuta) in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sulla pelle. Non occorre sottoporre a saggi in vivo le sostanze notoriamente irritanti o corrosive, nonché quelle che hanno dimostrato inequivocabilmente di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2). Si devono considerare i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione cutanea, si può presumere che la sostanza in esame produrrà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione cutanea usare approcci SAR validati ed accettati.

Proprietà fisico-chimiche e reattività chimica (Fase 3). Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es. $\leq 2{,}0$ o $\geq 11{,}5$, possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per l'identificazione di una sostanza come corrosiva per la pelle, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (3)(4). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per la pelle, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. fasi 5 e 6).

Tossicità cutanea (Fase 4). Se una sostanza chimica è risultata molto tossica per via cutanea, non è probabilmente praticabile uno studio di irritazione/corrosione cutanea in vivo, poiché la quantità di sostanza in esame normalmente applicata potrebbe superare la dose altamente tossica e, di conseguenza, provocare la morte o grave sofferenza degli animali. Inoltre, se sono già stati eseguiti studi di tossicità cutanea su conigli albini fino al livello limite di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo o superiori, e non è stata osservata irritazione o corrosione cutanea, diventano superflui ulteriori saggi per l'irritazione/corrosione cutanea. Quando si valuta la tossicità cutanea acuta in studi eseguiti in precedenza occorre tenere presenti numerose considerazioni. Per esempio, le informazioni riferite sulle lesioni cutanee possono essere incomplete. È possibile che i saggi e le osservazioni siano stati eseguiti su una specie diversa dal coniglio, e la sensibilità della reazione delle varie specie può essere molto diversa. Inoltre, è possibile che la forma della sostanza in esame applicata agli animali non fosse adeguata per la valutazione dell'irritazione/corrosione cutanea (ad es. diluizione delle sostanze per i saggi della tossicità cutanea) (5). Tuttavia, nel caso di studi di tossicità cutanea ben concepiti e ben condotti sui conigli, i risultati negativi possono essere considerati una prova sufficiente che la sostanza non è corrosiva o irritante.

Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6). Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (6)(7) concepito per la valutazione di questi effetti specifici. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche in vivo.

▼B

Saggio in vivo nei conigli (Fasi 7 e 8). Qualora in base all'analisi dell'importanza delle prove si arrivasse alla decisione di eseguire un saggio in vivo, esso deve cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva per la pelle, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio iniziale non rivela un effetto corrosivo, la reazione irritante o negativa va confermata usando al massimo due altri animali per un periodo di esposizione di quattro ore. Se il saggio iniziale rivela un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente i due animali aggiuntivi.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/tests/background/htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/-Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31,411-436.

(6) Metodo di prova B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.

▼B

Figura

STRATEGIA DI TEST E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive* ↓		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage* ↓		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 405 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai possibili miglioramenti, mediante la valutazione di tutte le informazioni disponibili circa la sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio e tener conto del benessere degli animali. Questo metodo include la raccomandazione, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per l'irritazione/corrosione oculare acuta, di una analisi accurata dei dati disponibili e pertinenti *(weight-of-the-evidence analysis)* (1) sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di ottenerli mediante l'applicazione di saggi sequenziali (2)(3). La strategia di saggio raccomandata comprende l'esecuzione di saggio in vitro validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al metodo. Inoltre, si raccomanda l'uso di un saggio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* per prevedere la corrosione oculare prima di considerare un saggio oculare *in vivo*.

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggi *in vivo* finché non siano stati valutati, considerando l'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione oculare della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (4)(5), nonché i risultati di saggi in vitro o ex vivo validati ed accettati per la corrosione e l'irritazione cutanea (6)(6a). Gli studi possono essere stati condotti prima di un'analisi dell'importanza delle prove, o in conseguenza di essa.

Per alcune sostanze, un'analisi di questo tipo può indicare la necessità di studi *in vivo* del potenziale di corrosione/irritazione oculare. In tutti questi casi, prima di considerare l'uso del saggio oculare *in vivo*, va preferibilmente condotto uno studio sugli effetti cutanei *in vivo* della sostanza, e valutate in base al metodo B.4 (7). L'applicazione di un'analisi dell'importanza delle prove e la strategia dei saggi sequenziali dovrebbe ridurre la necessità di eseguire saggi *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistano già prove sufficienti derivanti da altri studi. Qualora non sia possibile determinare il potenziale di corrosione o irritazione oculare usando la strategia dei saggi sequenziali, anche dopo l'esecuzione di uno studio *in vivo* della corrosione e dell'irritazione della cute, si può effettuare un saggio *in vivo* della corrosione/irritazione oculare.

▼B

Nell'Allegato al presente metodo di prova è inclusa la strategia dei saggi sequenziali da preferirsi, che prevede l'esecuzione di saggi validati in vitro o ex vivo per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (8), ed è stata adottata come strategia raccomandata di saggio nel GHS *(Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances)* (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (9). Si raccomanda di seguire questa strategia prima di passare al saggio *in vivo*. Per le nuove sostanze, si raccomanda di adottare una strategia a «tappesaggio» (stepwise), per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione oculare e cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per recuperare i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio «per gradi.»

1.2 DEFINIZIONI

Irritazione oculare: produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.

Corrosione oculare: produzione di lesioni del tessuto oculare o di un grave deterioramento fisico della vista, in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, non completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose su uno degli occhi dell'animale sperimentale; l'occhio non trattato serve da controllo. Il grado di irritazione/corrosione è valutato dando un punteggio alle lesioni di congiuntiva, cornea e iride, a intervalli di tempo specifici. Sono descritti anche altri effetti sull'occhio ed effetti negativi sistemici, con l'obiettivo di fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere l'eutanasia di animali moribondi o che soffrono gravemente (10).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1 **Preparazione per il saggio *in vivo***

1.4.1.1 *Selezione delle specie*

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino, del quale vanno utilizzati giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altri ceppi o specie.

1.4.1.2 *Preparazione degli animali*

Entro 24 ore dall'inizio del saggio è necessario esaminare entrambi gli occhi di ciascun animale sperimentale provvisoriamente selezionato per il saggio. Non vanno utilizzati animali che presentino irritazione oculare, difetti degli occhi o preesistenti lesioni corneali.

▼B

1.4.1.3 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (± 3 °C) per i conigli. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

1.4.2 **Procedura**

1.4.2.1 *Applicazione della sostanza in esame*

La sostanza in esame va posta nel sacco congiuntivale di un occhio di ciascun animale, dopo aver allontanato delicatamente la palpebra inferiore dal bulbo. Le palpebre vanno poi tenute unite con delicatezza per circa un secondo, per evitare la fuoriuscita del materiale. L'altro occhio, che non viene trattato, serve da controllo.

1.4.2.2 *Irrigazione*

Gli occhi degli animali sperimentali non vanno lavati per almeno 24 ore dopo l'instillazione della sostanza in esame, tranne nel caso di saggio di sostanze solide (cfr. punto 1.4.2.3.2), e nel caso di effetti corrosivi o irritanti immediati. Dopo 24 ore è possibile effettuare un lavaggio, se lo si considera necessario.

Non si raccomanda l'uso di un gruppo satellite di animali per studiare l'influenza del lavaggio oculare, a meno che ciò non risulti scientificamente giustificato. Qualora sia necessario un gruppo satellite, vanno usati due conigli. Le condizioni del lavaggio vanno documentate accuratamente: momento del lavaggio, composizione e temperatura della soluzione di lavaggio, durata, volume e velocità di applicazione.

1.4.2.3 *Livello di dosi*

1.4.2.3.1 *Saggio di liquidi*

Per saggiare i liquidi usare una dose di 0,1 ml. Non usare spray per instillare la sostanza direttamente nell'occhio; lo spray liquido va spruzzato e raccolto in un contenitore prima di instillarne 0,1 ml nell'occhio.

1.4.2.3.2 *Saggio di solidi*

Nel saggio di sostanze solide, paste e sostanze particellari, la quantità impiegata deve avere un volume di 0,1 ml o un peso non superiore a 100 mg. Il materiale in esame va ridotto in polvere fine. Prima della misurazione del volume, il materiale solido va delicatamente compattato, ad esempio picchiettando sul contenitore per la misurazione. Se la sostanza in esame solida non è stata rimossa dall'occhio dell'animale da meccanismi fisiologici, al primo tempo di osservazione un'ora dopo il trattamento, si può sciacquare l'occhio con soluzione salina o acqua distillata.

▼B

1.4.2.3.3 *Saggio di aerosol*

Si raccomanda di raccogliere tutti gli spray e gli aerosol prima dell'instillazione nell'occhio. L'unica eccezione riguarda le sostanze in contenitori pressurizzati per aerosol, che non possono essere raccolte a causa della vaporizzazione. In questi casi l'occhio va tenuto aperto e la sostanza va somministrata nell'occhio con un unico spruzzo di circa un secondo, da una distanza di 10 cm, direttamente davanti all'occhio. La distanza può variare a seconda della pressione dello spray e del suo contenuto. Evitare di danneggiare l'occhio con la pressione dello spray. In alcuni casi può essere necessario valutare il potenziale di danno «meccanico» all'occhio dovuto alla forza dello spray.

È possibile ottenere una stima della dose di un aerosol simulando il saggio come segue: spruzzare la sostanza attraverso un'apertura delle dimensioni dell'occhio di un coniglio posta esattamente di fronte ad un foglio di carta. L'aumento di peso della carta viene usato quindi per approssimare la quantità spruzzata nell'occhio. Per le sostanze volatili, la dose può essere stimata pesando un contenitore ricevente prima e dopo la rimozione del materiale in esame.

1.4.2.4 *Saggio iniziale (saggio di irritazione/corrosione oculare in vivo su un solo animale)*

Come descritto nella strategia dei saggi sequenziali (cfr. Allegato 1), si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio *in vivo* usando un solo animale.

Se con la procedura descritta, i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva o gravemente irritante per l'occhio, non eseguire altri saggi di irritazione oculare.

1.4.2.5 *Anestetici locali*

È possibile applicare anestetici locali, valutandone la necessità caso per caso. Se l'analisi dell'importanza delle prove indica che la sostanza può provocare dolore, e se il saggio iniziale dimostra che si verificherà una reazione dolorosa, prima dell'instillazione della sostanza in esame si può applicare un anestetico locale. Il tipo, la concentrazione e la dose dell'anestetico locale vanno attentamente selezionati in modo da assicurare che il suo uso non modifichi la reazione alla sostanza in esame. Anche l'occhio di controllo va anestetizzato analogamente.

1.4.2.6 *Saggio di conferma (saggio di irritazione oculare in vivo con animali supplementari)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su un massimo di altri due animali. Se nel saggio iniziale è stato osservato un effetto fortemente irritante che indica un possibile effetto grave (irreversibile) si raccomanda di eseguire il saggio di conferma in maniera sequenziale su un solo animale per volta, anziché esporre contemporaneamente i due animali. Se il secondo animale rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, interrompere il saggio. È possibile che siano necessari altri animali per confermare le reazioni irritanti deboli o moderate.

▼B

1.4.2.7 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente l'entità e la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi (9). Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati di norma per 21 giorni successivamente alla somministrazione della sostanza in esame. In caso di reversibilità prima dei 21 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.7.1 *Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni oculari*

Gli occhi vanno esaminati a 1, 24, 48 e 72 ore dopo l'applicazione della sostanza in esame. Gli animali devono essere sottoposti a saggio per il tempo minimo necessario per ottenere informazioni definitive. Gli animali che presentano grave dolore o sofferenza vanno soppressi al più presto con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Sopprimere con metodi non cruenti gli animali che, dopo l'instillazione, presentano le seguenti lesioni oculari: perforazione corneale o ulcerazione corneale di rilievo, compreso stafiloma; sangue nella camera anteriore dell'occhio; opacità corneale di grado 4 che persista per 48 ore; assenza di riflesso pupillare alla luce (risposta dell'iride di grado 2) che persista per 72 ore; ulcerazione della membrana congiuntivale; necrosi della congiuntiva o della membrana nittitante; distacco epidermico. Tali lesioni sono infatti generalmente irreversibili.

Gli animali che non sviluppano lesioni oculari possono essere soppressi non prima di 3 giorni dopo l'instillazione. Gli animali con lesioni lievi o moderate vanno tenuti sotto osservazione fino alla scomparsa delle lesioni, oppure per 21 giorni, momento in cui lo studio si conclude. Effettuare le osservazioni nei giorni 7,14 e 21, con l'obiettivo di determinare lo stato delle lesioni e la loro reversibilità o irreversibilità.

In occasione di ciascun esame, registrare i gradi della reazione oculare (congiuntiva, cornea e iride) (Tabella I). Annotare anche qualsiasi altra lesione dell'occhio (ad es. panno corneale, macchie) e qualsiasi effetto sistemico negativo.

L'esame delle reazioni può essere facilitato usando una lente binoculare, una lampada manuale a fessura, un biomicroscopio o altro dispositivo idoneo. Dopo aver registrato le osservazioni a 24 ore, è possibile esaminare ulteriormente gli occhi con l'ausilio di fluoresceina.

La classificazione delle reazioni oculari è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio utilizzato.

2. **DATI**

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare i punteggi dell'irritazione oculare insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. I punteggi individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I punteggi individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e hanno significato solo se corredati da una descrizione e una valutazione complete di tutte le osservazioni.

▼B

3. **RAPPORTO**

3.1 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Motivazione per il saggio *in vivo*: analisi dei dati relativi a saggi precedenti, compresi i risultati della strategia dei saggi sequenziali

— descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggi precedenti;

— dati ricavati in ciascuna fase della strategia di saggio;

— descrizione dei saggi in vitro eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;

— descrizione dello studio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* eseguito, con i risultati ottenuti;

— analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*

Sostanza in esame:

— dati di identificazione (ad es. numero CAS, origine, purezza, impurità note, numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, reattività con l'acqua);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

— se si usa un anestetico locale, identificazione, purezza, tipo, dose e potenziale interazione con la sostanza in esame.

Eccipiente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;

— giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Animali sperimentali:

— specie/ceppo usato, motivazione dell'uso di animali diversi dal coniglio albino;

— età di ciascun animale all'inizio dello studio;

— numero di animali di ciascun sesso nei gruppi sperimentali e di controllo (ove necessario);

— peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.

Risultati:

— descrizione del metodo usato per assegnare un punteggio all'irritazione in ciascun momento di osservazione (ad es. lampada manuale a fessura, biomicroscopio, fluoresceina);

▼B

— tabella dei dati relativi alla reazione irritante/corrosiva per ciascun animale e in ciascun momento di osservazione fino alla fine del saggio

— descrizione del grado e della natura dell'irritazione o della corrosione osservata;

— descrizione di qualsiasi altra lesione osservata nell'occhio (ad es. vascolarizzazione, formazione di panno oculare, aderenze, macchie);

— descrizione degli eventuali effetti negativi non oculari locali e sistemici e degli eventuali reperti istopatologici.

Discussione dei risultati.

3.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'estrapolazione dei risultati degli studi sull'irritazione oculare negli animali da laboratorio agli esseri umani ha un valore solo limitato. In molti casi, il coniglio albino è più sensibile dell'uomo alle sostanze irritanti o corrosive per l'occhio.

È necessario interpretare con attenzione i dati per escludere l'irritazione dovuta a infezione secondaria.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.

(6a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.

(7) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://-www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabella I

CLASSIFICAZIONE DELLE LESIONI OCULARI

Cornea

Opacità: grado di densità (le misure vanno prese dalle zone più dense) (*)

Assenza di ulcerazione e opacità	0
Zone di opacità sparse o diffuse (diverse dal lieve appannamento della normale lucentezza); dettagli dell'iride visibili chiaramente	1
Zone traslucide facilmente individuabili; dettagli dell'iride lievemente offuscati	2
Zona madreperlacea; nessun dettaglio visibile dell'iride; dimensioni della pupilla appena distinguibili	3
Cornea opaca; iride non distinguibile attraverso l'opacità	4

Massimo possibile: 4

NOTE

(*) Indicare l'area di opacità corneale

Iride

Normale	0
Rughe notevolmente approfondite, congestione, edema, moderata iperemia circumcorneale; oppure iniezione; iride reattiva alla luce (una reazione lenta è considerata positiva)	1
Emorragia, distruzione macroscopica, oppure assenza di reazione alla luce	2

Massimo possibile: 2

Congiuntive

Rossore (relativo alla congiuntiva palpebrale e bulbare; escluse cornea e iride)

Normale	0
Alcuni vasi sanguigni iperemici (iniettati)	1
Colore cremisi diffuso; singoli vasi non facilmente distinguibili	2
Rosso acceso diffuso	3

Massimo possibile: 3

Chemosi

Edema (relativo alle palpebre e/o alle membrane nittitanti)

Normale	0
Edema appena superiore alla norma	1
Edema evidente, con parziale eversione delle palpebre	2
Edema, con palpebre semichiuse	3
Edema, con palpebre più che semichiuse	4

Massimo possibile: 4

▼B

Allegato

Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione oculari

CONSIDERAZIONI

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi *in vivo*. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione oculare di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e l'uso di una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi *in vivo*, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda di svolgere un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione oculare delle sostanze e determinare la necessità di altri studi, diversi da quelli *in vivo* sugli occhi, per meglio caratterizzare tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di applicare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne la corrosività/irritazione oculare. La strategia dei saggi descritta nel presente Allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1) e successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28ª riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

Questa strategia di saggio non è parte integrante del metodo di prova B.5, ma esprime l'approccio raccomandato per la determinazione delle proprietà di irritazione/corrosione oculare. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi *in vivo* sull'irritazione/-corrosione oculare. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio *in vivo* e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un metodo di analisi dell'importanza delle prove per la valutazione dei dati esistenti sulle proprietà di irritazione/corrosione oculare delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. La strategia prevede dapprima l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* e successivamente di studi di irritazione/corrosione cutanea in base al metodo di prova B.4 in circostanze specifiche (3)(4).

DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI SAGGIO «PER GRADI»

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi oculari *in vivo*. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove valutare tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, evitare gli studi *in vivo* delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

▼B

Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1). Considerare innanzitutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali in studi sugli occhi), in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sugli occhi. Successivamente valutare i dati disponibili di studi su soggetti umani e/o animali sulla corrosione/irritazione cutanea. Non instillare negli occhi degli animali sostanze notoriamente corrosive o gravemente irritanti per l'occhio né sostanze che mostrano effetti corrosivi o irritanti sulla pelle; tali sostanze vanno considerate corrosive e/o irritanti anche per gli occhi. Non saggiare *in vivo* sugli occhi sostanze che in precedenti studi oculari hanno presentato prove sufficienti di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2). Prendere in considerazione i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione oculare, si può presumere che la sostanza in esame provocherà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione sia per gli effetti oculari che per quelli cutanei usare approcci SAR validati ed accettati.

Proprietà fisicochimiche e reattività chimica (Fase 3). Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es. $\leq 2{,}0$ o $\geq 11{,}5$, possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per identificare una sostanza come corrosiva o irritante per gli occhi, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (5)(6). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per l'occhio, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. punto Fasi 5 e 6).

Considerazione di altre informazioni esistenti (Fase 4). Valutare in questa fase tutte le informazioni disponibili sulla tossicità sistemica per via cutanea. Considerare anche la tossicità cutanea acuta della sostanza in esame. Se essa si è dimostrata molto tossica per via cutanea, può non essere necessario saggiarla sull'occhio. Sebbene non vi sia necessariamente un rapporto fra la tossicità cutanea acuta e l'irritazione/corrosione oculare, si può presumere che se una sostanza è molto tossica per via cutanea, presenterà anche elevata tossicità quando viene instillata nell'occhio. Questi dati possono essere valutati anche fra le fasi 2 e 3.

Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6). Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (7)(8) che è stato validato ed accettato per la valutazione specifica della corrosività/irritazione oculare o cutanea. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche *in vivo*. Qualora non siano disponibili saggi *in vitro*/*ex vivo* validati ed accettati, si salteranno le Fasi 5 e 6 e si procederà direttamente alla Fase 7.

Valutazione del potere irritante o della corrosività cutanea in vivo della sostanza (Fase 7). Quando le prove esistenti non sono sufficienti ad effettuare un'analisi dell'importanza delle prove conclusiva della potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza, sulla base dei dati degli studi sopra elencati, occorre valutare per prima cosa il potenziale di irritazione/corrosione cutanea *in vivo*, usando il metodo di prova B.4 (4) e il suo Allegato (9). Qualora si dimostri che la sostanza provoca corrosione o grave irritazione cutanea, essa va considerata un irritante oculare corrosivo, a meno che altre informazioni non vadano a sostegno di una conclusione alternativa. Pertanto, non è necessario eseguire un saggio oculare *in vivo*. Se la sostanza non è corrosiva o gravemente irritante per la pelle, va eseguito un saggio oculare *in vivo*.

▼B

Saggio in vivo nei conigli (Fasi 8 e 9). Gli studi oculari *in vivo* devono cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di questo saggio indicano che la sostanza è gravemente irritante o corrosiva per gli occhi, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio non rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, si esegue un saggio di conferma con altri due animali.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In *Vitro,* 2, 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, pp. 483-524.

(8) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.

(9) Allegato al metodo di prova B.4: Una strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee.

▼B

Figura

STRATEGIA DI SAGGIO E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

	Attività	Reperto	Conclusione
1	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti sugli occhi	Danni gravi agli occhi	Endpoint apicale; considerare corrosivo per gli occhi. Non occorrono saggi.
		Irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerare irritante per gli occhi. Non occorrono saggi.
		Non corrosivo/non irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerato non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorrono saggi.
	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti corrosivi per la pelle	Corrosivo per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggi.
	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino gravi effetti irritanti per la pelle	Gravemente irritante per la pelle	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono saggi.
	↓		
	Nessuna informazione disponibile, oppure le informazioni disponibili non sono conclusive		
	↓		
2	Eseguire SAR per la corrosione/ irritazione oculare	Prevedere danni gravi agli occhi	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggi.
		Prevedere irritazione degli occhi	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono saggi.
	Eseguire SAR per la corrosione della pelle	Prevedere corrosività per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggi.
	↓		
	Non è possibile fare previsioni, oppure le previsioni non sono conclusive o sono negative		
	↓		
3	Misurare il pH (capacità tampone, se pertinente)	pH ≤ 2 o ≥ 11,5 (con elevata capacità tampone, se pertinente)	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggi.
	↓		
	2 < pH < 11,5, or pH ≤ 2 o ≥ 11,5 con capacità tampone scarsa/nulla, se pertinente		
	↓		
4	Valutare tossicità sistemica per via cutanea	Molto tossico a concentrazioni che andrebbero saggiate nell'occhio.	La sostanza sarebbe troppo tossica per i saggi. Non occorrono saggi.
	↓		
	Tali informazioni non sono disponibili, oppure la sostanza non è molto tossica		
	↓		

▼B

5	Eseguire saggio *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione oculare validato ed accettato	Reazione corrosiva	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono altri saggi.
	↓		
	La sostanza non è corrosiva, o non sono ancora disponibili metodi di saggio in vitro *o* ex vivo *per la corrosione validati*		
	↓		
6	Eseguire saggio *in vitro* o *ex vivo* per l'irritazione oculare validato ed accettato	Reazione irritante	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono altri saggi.
	↓		
	La sostanza non è un irritante o non sono ancora disponibili metodi di saggio in vitro *o* ex vivo *per l'irritazione oculare validati*		
	↓		
7	Valutare sperimentalmente il potenziale di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* (cfr. Metodo di prova B.4 compreso il suo Allegato)	Reazione corrosiva o gravemente irritante	Presumere corrosività per gli occhi, Non occorrono altri saggi.
	↓		
	La sostanza non è corrosiva né gravemente irritante per la pelle		
	↓		
8	Eseguire saggio oculare iniziale *in vivo* sul coniglio usando un solo animale	Danno grave agli occhi	Considerare corrosivo per gli occhi. Non occorrono altri saggi.
	↓		
	Nessun danno grave o nessuna risposta		
	↓		
9	Eseguire saggio di conferma usando uno o due altri animali	Corrosivo o irritante	Considerare corrosivo o irritante per gli occhi. Non occorrono altri saggi.
		Non corrosivo né irritante	Considerare non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorrono altri saggi.

▼B

B.6 **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Note:

La sensibilità dei saggi e la loro efficacia nell'individuazione di potenziali sensibilizzatori della cute umana costituiscono parametri importanti in un sistema di classificazione della tossicità per la tutela della salute pubblica.

Non esiste un unico metodo sperimentale atto a identificare correttamente tutte le sostanze dotate di un potenziale sensibilizzante per la cute umana e quindi sistematicamente applicabile.

Nella scelta del metodo occorre tener conto di fattori quali le caratteristiche fisiche di una sostanza, compresa la sua capacità di penetrazione cutanea.

Sono stati elaborati due tipi di saggio su porcellini d'India: il saggio con utilizzo di adiuvanti, nel quale uno stato allergico viene potenziato sciogliendo o sospendendo la sostanza in esame in adiuvante completo di Freund (ACF), e il saggio senza utilizzo di adiuvante.

I saggi con utilizzo di adiuvante offrono generalmente un più elevato grado di precisione nell'individuare un potenziale di sensibilizzazione cutanea nell'uomo rispetto ai metodi che non prevedono l'uso dell'adiuvante completo di Freund. Essi sono pertanto preferibili.

Il «Guinea-Pig Maximisation Test» (GPMT) è un test con utilizzo di adiuvante ampiamente usato. Malgrado esistano diversi altri metodi per identificare il potenziale di sensibilizzazione cutanea di una sostanza, il GPMT è considerato il metodo con adiuvante d'elezione.

Per molte classi di sostanze chimiche, i saggi senza utilizzo di adiuvante (fra cui il più diffuso è quello di Buehler) sono considerati meno sensibili.

In alcuni casi il saggio di Buehler, che prevede un'applicazione topica della sostanza, può risultare preferibile all'iniezione intradermica utilizzata nel Guinea-Pig Maximisation Test. Qualora si opti per il saggio di Buehler, si dovrà fornire una giustificazione scientifica.

Il Guinea-Pig Maximisation Test (GPMT) e il saggio di Buehler sono descritti nel presente metodo. È possibile il ricorso ad altri metodi, purché siano debitamente convalidati e venga fornita una giustificazione scientifica.

In caso di risultato positivo di un saggio di screening riconosciuto, la sostanza in esame può essere considerata un potenziale sensibilizzante e non è necessario condurre un ulteriore test GPMT. Tuttavia in caso di risultato negativo del saggio di screening è necessario condurre un test GPMT attenendosi alla procedura descritta nel presente metodo di saggio.

Vedi anche introduzione generale, parte B.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Sensibilizzazione cutanea: (dermatite allergica da contatto) è una reazione cutanea a una sostanza mediata da fattori immunologici. Nell'uomo la reazione può essere caratterizzata da prurito, eritema, edema, papule, vescicole, bolle o da una combinazione di queste manifestazioni. In altre specie le reazioni possono differire e limitarsi alla comparsa di eritemi e di edemi.

Esposizione di induzione: esposizione sperimentale di un soggetto alla sostanza in esame al fine di indurre uno stato di ipersensibilità.

Periodo di induzione: periodo della durata minima di una settimana, successivo all'esposizione di induzione, entro il quale può manifestarsi uno stato di ipersensibilità.

Esposizione di provocazione: in un soggetto già trattato, esposizione sperimentale alla sostanza in esame, effettuata successivamente al periodo di induzione al fine di accertare se il soggetto sviluppa una reazione di ipersensibilità.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

La sensibilità e l'attendibilità della tecnica sperimentale utilizzata devono essere verificate ogni sei mesi utilizzando sostanze notoriamente dotate di proprietà di sensibilizzazione cutanea di grado leggero-medio.

In un saggio eseguito correttamente, per sensibilizzanti di tipo leggero-medio si dovrebbe avere una risposta pari ad almeno il 30 % con il metodo con adiuvanti e ad almeno il 15 % con il metodo senza adiuvanti.

Si farà preferibilmente ricorso alle seguenti sostanze:

Numero CAS-	Numero EINECS-	Denominazione EINECS	Denominazione corrente
101-86-0	202-983-3	α-esilcinnamaldeide	α-esilcinnamaldeide
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-tiolo (mercapto-benzothiaziolo)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaina	norcaina

Qualora le circostanze lo giustifichino, potranno essere utilizzate altre sostanze di controllo conformi ai criteri suelencati.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

In un primo tempo gli animali vengono esposti alla sostanza da saggiare con iniezioni intradermiche e/o applicazione epidermica (esposizione di induzione). Dopo un periodo di riposo di 10-14 giorni (periodo di induzione), in cui si può sviluppare una risposta immunitaria, essi vengono esposti alla dose di provocazione. L'estensione e la gravità della reazione cutanea all'esposizione di provocazione vengono confrontate con la reazione sviluppata dagli animali di controllo trattati con un placebo nella fase di induzione e sottoposti all'esposizione di provocazione.

1.5. DESCRIZIONE DEI METODI DI SAGGIO

Se lo si ritiene necessario, si procederà alla rimozione della sostanza da saggiare utilizzando acqua o un solvente appropriato, in modo da non alterare la reazione in corso, né intaccare l'integrità dell'epidermide.

▼B

1.5.1. *Guinea-Pig Maximistlion Test (GMPT)*

1.5.1.1. Preparazioni

Porcellini d'India albini, giovani e sani, vengono acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali vengono suddivisi in modo casuale ed assegnati al gruppo da trattare o al gruppo di controllo. In funzione del metodo di saggio utilizzato, il pelo verrà tagliato, rasato o rimosso con una sostanza depilatoria, avendo cura di non danneggiare la cute. Gli animali vengono pesati all'inizio e alla fine del saggio.

1.5.1.2. Condizioni sperimentali

1.5.1.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzano porcellini d'India albini di ceppi comunemente usati in laboratorio.

1.5.1.2.2. Numero e sesso

Si utilizzano animali di sesso maschile e/o femminile. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide.

Il gruppo sottoposto a trattamento deve essere composto da almeno 10 animali, il gruppo di controllo da un minimo di 5. Qualora il primo gruppo comprenda meno di 20 esemplari ed il secondo meno di 10 e non sia possibile concludere che la sostanza in esame è un sensibilizzante, si consiglia di proseguire lo studio fino a disporre di almeno 20 animali trattati e 10 di controllo.

1.5.1.2.3. Livelli di dosaggio

La concentrazione della sostanza in esame utilizzata per ogni esposizione di induzione deve essere ben tollerata a livello sistemico e corrispondere alla dose massima suscettibile di produrre un'irritazione cutanea di grado leggero-medio. La concentrazione utilizzata per l'esposizione di provocazione deve corrispondere alla dose massima che non cagioni irritazione. Se necessario, la concentrazione appropriata può essere determinata con uno studio pilota condotto su due o tre animali. A questo scopo è preferibile utilizzare animali trattati con l'adiuvante completo di Freund.

1.5.1.3. Procedimento

1.5.1.3.1. Induzione

Giorno 0 — gruppo trattato

Nella regione della spalla, debitamente depilata, si praticano tre serie di due iniezioni intradermiche da 0,1 ml ciascuna. Le due iniezioni di ciascuna serie devono essere praticate l'una a sinistra e l'altra a destra della linea mediana.

Iniezione 1: miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica

Iniezione 2: la sostanza in esame in un veicolo adatto alla concentrazione selezionata

Iniezione 3: la sostanza in esame alla concentrazione desiderata, formulata in una miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica.

Nell'iniezione 3, le sostanze idrosolubili vengono disciolte nella fase acquosa prima di essere miscelate con l'ACF. Le sostanze liposolubili o insolubili vengono messe in sospensione nell'ACF prima di essere combinate con la fase acquosa. La concentrazione finale della sostanza in esame deve essere uguale a quella utilizzata nell'iniezione 2.

▼B

Le iniezioni 1 e 2 vengono praticate l'una accanto all'altra e quanto più possibile in prossimità della testa, mentre la 3 è praticata verso la parte caudale della zone d'esame.

Giorno 0 — gruppo di controllo

Tre serie di due iniezioni intradermiche, ciascuna del volume di 0,1 ml, sono praticate negli stessi punti scelti per gli animali trattati.

Iniezione 1: miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica

Iniezione 2: il veicolo non diluito

Iniezione 3: formulazione 50 % p/v del veicolo in una miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica.

Giorno 5-7 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Circa 24 ore prima dell'applicazione topica di induzione, se la sostanza non è un irritante cutaneo, l'area di prova, debitamente tosata e/o rasata, viene trattata con 0,5 ml di laurilsoliato di sodio al 10 % in vaselina, al fine di provocare un'irritazione locale.

Giorno 6-8 — gruppo trattato

L'area di prova viene nuovamente depilata. Una carta da filtro (2 × 4 cm), impregnata della sostanza in esame incorporata in un veicolo adatto, viene applicata sull'area di prova e tenuta in contatto con la cute per 48 ore mediante una medicazione occlusiva. La scelta del veicolo deve essere motivata. Le sostanze solide vengono ridotte in polvere e incorporate in un veicolo adatto. I liquidi, se del caso, possono essere applicati direttamente.

Giorno 6-8 — gruppo di controllo

L'area di prova viene nuovamente depilata. Il solo veicolo viene applicato con le stesse modalità sull'area di prova e tenuto a contatto per 48 ore mediante una medicazione occlusiva.

1.5.1.3.2. Provocazione (challenge)

Giorno 20-22 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Si rimuove il pelo dai fianchi degli animali trattati e degli animali di controllo. Su un fianco si applica una garza o una compressa impregnata della sostanza in esame e, se opportuno, sull'altro si applica una garza o una compressa impregnata del solo veicolo. Le compresse vengono tenute a contatto con la cute per 24 ore mediante una medicazione occlusiva.

1.5.1.3.3. Osservazione e valutazione: gruppo trattato e gruppo di controllo

— circa 21 ore dopo la rimozione della compressa, la zona sottoposta a «challenge» viene pulita e tosata e/o rasata e depilata, se necessario;

— circa 3 ore più tardi (approssimativamente 48 ore dall'inizio dell'applicazione di provocazione) la reazione cutanea viene esaminata e classificata in base alla scala di valutazione riportata in appendice;

— circa 24 ore dopo detto esame si procede a una seconda osservazione (72 ore) e a una nuova classificazione delle reazioni cutanee.

È consigliabile procedere ad una lettura cieca nei due gruppi di animali.

Qualora sia necessario chiarire i risultati ottenuti nel primo «challenge», una seconda esposizione di provocazione, ove del caso con un nuovo gruppo di controllo, potrà essere effettuata a circa una settimana di distanza dalla prima. Il nuovo «challenge» potrà essere realizzato anche sul gruppo di controllo iniziale.

▼B

Tutte le reazioni cutanee e qualsiasi risultato insolito, comprese le reazioni sistemiche, derivanti dall'esposizione di induzione e di provocazione, dovranno essere osservate e classificate in base alla scala di valutazione di Magnusson/Kligman (vedi appendice). Per chiarire eventuali reazioni dubbie si potrà far ricorso ad altre tecniche, quali l'esame istopatologico o la misurazione dello spessore delle pieghe cutanee.

1.5.2. *Saggio di Buehler*

1.5.2.1. Preparazioni

Porcellini d'India albini, giovani e sani, vengono acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali vengono suddivisi in modo casuale ed assegnati al gruppo da trattare o al gruppo di controllo. In funzione del metodo di saggio utilizzato, il pelo verrà tagliato, rasato o rimosso con una sostanza depilatoria, avendo cura di non danneggiare la cute. Gli animali vengono pesati all' inizio e alla fine del saggio.

1.5.2.2. Condizioni sperimentali

1.5.2.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzano porcellini d'India albini di ceppi comunemente usati in laboratorio.

1.5.2.2.2. Numero e sesso

Si utilizzano animali di sesso maschile e/o femminile. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide.

Il gruppo sottoposto a trattamento deve essere composto da almeno 20 animali, il gruppo di controllo da un minimo di 10.

1.5.2.2.3. Livelli di dosaggio

La concentrazione della sostanza in esame utilizzata per ogni esposizione di induzione deve corrispondere alla dose massima suscettibile di produrre un'irritazione cutanea moderata e non eccessiva. La concentrazione utilizzata per l'esposizione di provocazione deve corrispondere alla dose massima che non cagioni irritazione. Se necessario, la concentrazione appropriata può essere determinata con uno studio pilota condotto su due o tre animali.

Nel caso di sostanze idrosolubili, l'acqua o una soluzione diluita non irritante di surfactante rappresentano il veicolo più appropriato. Per le altre sostanze si preferiranno una miscela di etanolo all'80 % ed acqua per la fase di induzione e dell'acetone per la fase di provocazione.

1.5.2.3. Procedimento

1.5.2.3.1. Induzione

Giorno 0 — gruppo trattato

Gli animali vengono tosati su un fianco. La compressa utilizzata per il saggio viene impregnata della sostanza in esame incorporata in un veicolo idoneo (la scelta del veicolo deve essere motivata; se del caso, le sostanze liquide possono essere applicate non diluite).

La compressa viene applicata sull'area di prova e tenuta a contatto con la pelle per sei ore mediante un cerotto occlusivo e una fasciatura adeguata.

▼B

La medicazione deve essere occlusiva. Si potrà ricorrere a un tampone d'ovatta, rotondo o quadrato e di circa 4-6 cm^2. Per garantire l'occlusione, è opportuno limitare la libertà di movimento degli animali con un sistema adeguato. Se si utilizza una fasciatura, possono essere necessarie esposizioni supplementari.

Giorno 0 — gruppo di controllo

Gli animali vengono tosati su un fianco. Il solo veicolo viene applicato con modalità analoghe a quelle utilizzate per il gruppo trattato. La compressa viene tenuta a contatto con la pelle per sei ore mediante un cerotto occlusivo e una fasciatura adeguata. Se si dimostra che non è necessario disporre di un gruppo di controllo cui sia stato somministrato un placebo, si potrà utilizzare un gruppo di controllo non sottoposto a tale trattamento.

Giorni 6-8 e 13-15 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Si esegue la stessa applicazione del giorno 0 sulla medesima area di prova (rasata, se necessario) sulla stesso fianco il giorno 6-8 e nuovamente il giorno 13-15.

1.5.2.3.2. Provocazione (challenge)

Giorno 27-29 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Il fianco non trattato degli animali trattati e degli animali di controllo viene tosato. Si procede quindi all'applicazione di un cerotto occlusivo o di una compressa contenente un'adeguata quantità della sostanza in esame, alla massima concentrazione non irritante, sulla parte posteriore del fianco non trattato in entrambi i gruppi di animali.

Se necessario, si applica inoltre un cerotto occlusivo o una compressa contenente il solo veicolo sulla parte anteriore del fianco non trattato di entrambi i gruppi di animali. Il cerotto o la compressa vengono tenuti a contatto con la pelle per 6 ore mediante un'adeguata medicazione.

1.5.2.3.3. Osservazione e valutazione

— Circa 21 ore dopo la rimozione del cerotto, la zona sottoposta a «challenge» viene depilata;

— circa tre ore più tardi (approssimativamente 30 ore dopo l'applicazione di provocazione) le reazioni cutanee vengono esaminate e classificate in base alla scala di valutazione riportata in appendice;

— circa 24 ore dopo detto esame (approssimativamente 54 ore dopo l'applicazione di provocazione) si procede a una seconda osservazione e a una nuova classificazione delle reazioni cutanee.

È consigliabile procedere ad una lettura cieca nei due gruppi di animali.

Qualora sia necessario chiarire ulteriormente i risultati ottenuti nel primo «challenge», una seconda esposizione di provocazione, ove del caso con un nuovo gruppo di controllo, potrà essere effettuata a circa una settimana di distanza dalla prima. Il nuovo «challenge» potrà essere realizzato anche sul gruppo di controllo iniziale.

▼B

Tutte le reazioni cutanee e qualsiasi risultato insolito, comprese le reazioni sistemiche, derivanti dall'esposizione di induzione e di provocazione, dovranno essere osservate e classificate in base alla scala di valutazione di Magnusson/Kligman (vedi appendice). Per chiarire eventuali reazioni dubbie si potrà far ricorso ad altre tecniche, quali l'esame istopatologico o la misurazione dello spessore delle pieghe cutanee.

2. **DATI (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)**

I dati saranno riassunti in forma tabulare, indicando, per ogni animale, le reazioni cutanee rilevate nel corso di ogni osservazione.

3. **RELAZIONE (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)**

Se il saggio sul porcellino d'India è preceduto da una prova preliminare, si avrà cura di fornirne la descrizione o il riferimento [per es. Local Lymph Node Assay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST)], compreso il procedimento particolareggiato, insieme ai risultati ottenuti con le sostanze da saggiare e le sostanze di riferimento.

Relazione sul saggio (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento

— ceppo di porcellino d'India utilizzato;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di alloggiamento, dieta, ecc;

— peso di ogni singola cavia all'inizio dell'esperimento.

Condizioni sperimentali:

— tecnica di preparazione dell'area di applicazione della compressa;

— materiali utilizzati e tecnica di preparazione e di applicazione della compressa;

— risultato dello studio pilota e conclusioni relative alle concentrazioni di induzione e di provocazione da utilizzare nel saggio;

— modalità di preparazione, applicazione e rimozione della sostanza in esame;

— motivazione della scelta del veicolo;

— concentratzioni del veicolo e della sostanza utilizzate per le esposizioni di induzione e di provocazione, nonché quantità totale di sostanza applicata per l'induzione e la provocazione.

Risultati:

— un riepilogo dei risultati dell'ultimo controllo di sensibilità e attendibilità (vedi 1.3), comprese le informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo utilizzato;

▼B

— tutte le osservazioni effettuate su ogni singolo animale, compreso il sistema di classificazione;

— la descrizione della natura e dell'entità degli effetti osservati;

— tutti i reperti dell'esame istopatologico.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 406.

▼B

Appendice

TABELLA:

scala di Magnusson/Kligman per la classificazione delle reazioni al saggio di provocazione cutanea

0 = assenza di modificazioni visibili

1 = eritema localizzato o a distribuzione irregolare

2 = eritema modesto e confluente

3 = eritema intenso associato a tumefazione

▼M4

B.7. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA ORALE NEI RODITORI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 407 (2008). La prima linea guida n. 407 è stata adottata nel 1981. Nel 1995 è stata adottata una versione rivista per ottenere informazioni aggiuntive dagli animali utilizzati nello studio, in particolare in materia di neurotossicità e immunotossicità.

2. Nel 1998 l'OCSE ha avviato un'attività prioritaria relativa alla revisione delle linee guida esistenti e all'elaborazione di nuove linee guida per lo screening e le prove dei potenziali interferenti endocrini (8). Uno degli obiettivi era aggiornare la linea guida dell'OCSE n. 407 «Tossicità a dose ripetuta (28 giorni) per via orale nei roditori» introducendo dei parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze in esame. Questo protocollo è stato sottoposto a un programma internazionale mirante a valutare la pertinenza e la praticabilità dei parametri addizionali, la prestazione di questi parametri per le sostanze chimiche con attività (anti)estrogenica, (anti)androgenica e (anti)tiroidea, la loro riproducibilità intra e inter-laboratori e la loro interferenza con i parametri richiesti dalla versione precedente della linea guida n. 407. I numerosi dati ottenuti sono stati raccolti e valutati attentamente in una relazione esaustiva dell'OCSE (9). Il presente metodo di prova B.7 (equivalente alla linea guida n. 407) è frutto dell'esperienza e dei risultati ottenuti nel corso del programma internazionale di prova. Consente di contestualizzare alcuni effetti endocrino-mediati con altri effetti tossicologici.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. Nella valutazione e nell'esame delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale utilizzando dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta. Il presente metodo di prova mira a studiare gli effetti su una gamma molto ampia di potenziali bersagli di tossicità. Fornisce informazioni sui potenziali rischi per la salute che un'esposizione ripetuta può comportare in un arco di tempo relativamente limitato, tra cui gli effetti sul sistema nervoso, immunologico ed endocrino. In relazione a questi endpoint specifici, il metodo deve consentire di individuare le sostanze chimiche potenzialmente neurotossiche che potrebbero giustificare studi più approfonditi di questo aspetto, e le sostanze chimiche che interferiscono con la fisiologia della tiroide. Questo metodo può inoltre fornire dati sulle sostanze chimiche che incidono sugli organi riproduttivi maschili e/o femminili dei giovani animali adulti, evidenziando anche eventuali effetti immunologici.

4. I risultati del metodo di prova B.7 devono essere utilizzati per individuare i pericoli e valutare i rischi. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (11). Il metodo prevede uno studio di base della tossicità a dosi ripetute che può essere utilizzato per le sostanze chimiche per le quali uno studio di 90 giorni non si giustifica (ad esempio quando il volume di produzione non supera determinate quantità) o prima di uno studio a lungo termine. Il periodo di esposizione deve essere di 28 giorni.

▼M4

5. Il programma internazionale realizzato per la convalida di parametri in grado di individuare l'attività endocrina di una sostanza in esame ha evidenziato che la qualità dei dati ottenuti con questo metodo di prova dipende in ampia misura dall'esperienza del laboratorio che effettua le prove. Ciò vale soprattutto per la determinazione istopatologica di cambiamenti ciclici negli organi riproduttori femminili e la determinazione del peso dei piccoli organi ormono-dipendenti che sono difficili da dissecare. È stato messo a punto un documento di orientamento sull'istopatologia (19), che è disponibile sul sito dell'OCSE nella rubrica relativa alle linee guida per le prove sulle sostanze chimiche. Il documento è destinato ad aiutare i patologi nelle loro analisi e a migliorare la sensibilità delle prove. Nel metodo di prova sono stati integrati svariati parametri indicativi di una tossicità per il sistema endocrino. Gli endpoint per i quali non sono disponibili dati sufficienti a dimostrane l'utilità o che, nell'ambito del programma di convalida, hanno dimostrato una scarsa capacità di individuare gli interferenti endocrini sono proposti come endpoint opzionali (cfr. appendice 2).

6. Sulla base dei dati generati nel corso del processo di validazione, occorre sottolineare che la sensibilità di questo saggio non è sufficiente per individuare tutte le sostanze caratterizzate da un'attività (anti)androgenica o (anti)estrogenica (9). Il presente metodo di prova deve essere eseguito in una fase della vita estremamente sensibile alle interferenze endocrine. Tuttavia questo metodo ha permesso, nel corso del processo di convalida, di individuare delle sostanze con un forte o un debole impatto sulla funzione tiroidea e delle sostanze che agiscono fortemente o in misura ridotta sul sistema endocrino mediante recettori dell'estrogeno o dell'androgeno; nella maggior parte dei casi, tuttavia, non ha consentito di individuare le sostanze con effetti endocrini che incidono in misura limitata su questi recettori. Questo metodo non può pertanto essere descritto come prova di screening dell'attività endocrina.

7. Di conseguenza l'assenza di effetti legati a questi meccanismi di azione non può essere considerata una prova dell'assenza di effetti sul sistema endocrino. Per quanto riguarda gli effetti endocrini-mediati, la caratterizzazione delle sostanze non deve basarsi unicamente sui risultati del presente metodo di prova ma deve essere utilizzata nell'ambito di un approccio fondato sull'«onere della prova» che integri tutti i dati esistenti su una sostanza chimica per caratterizzarne la potenziale attività endocrina. Per questa ragione, le decisioni di tipo regolamentare relative all'attività endocrina delle sostanze chimiche (caratterizzazione dei composti) devono avvalersi di un approccio di ampio respiro, e non fondarsi solo sui risultati di questo metodo di prova.

8. Naturalmente tutte le procedure che prevedono l'utilizzo di animali rispetteranno le norme locali in materia di cura degli animali. Le descrizioni delle cure e dei trattamenti riportate qui di seguito corrispondono a norme di prestazione minime che, se del caso, sono sostituite dalla regolamentazione locale, qualora questa sia più rigorosa. Ulteriori indicazioni sul trattamento umano degli animali sono fornite dall'OCSE (14).

9. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. Ogni giorno, per un periodo di 28 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o oggetto di eutanasia durante la prova vengono sottoposti a autopsia. Al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a autopsia. Uno studio a 28 giorni fornisce informazioni sugli

▼M4

effetti di un'esposizione ripetuta per via orale e può dimostrare la necessità di condurre ulteriori studi a più lungo termine. Può inoltre fornire informazioni sulla selezione delle concentrazioni in vista di studi a più lungo termine. I dati tratti dal metodo di prova devono permettere di caratterizzare la tossicità della sostanza in esame, avere un'indicazione sul rapporto dosaggio-risposta e determinare il NOAEL (*no-observed-adverse effects* — livello fino al quale non si osservano effetti dannosi).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

11. Il ratto è la specie preferita, ma sono ammesse anche altre specie di roditori. Se i parametri specificati nel metodo di prova B.7 sono studiati in un'altra specie di roditori occorre fornire una giustificazione dettagliata. Benché dal punto di vista biologico sia plausibile che altre specie rispondano ai prodotti tossici in modo simile ai ratti, l'utilizzo di specie più piccole può causare una maggiore variabilità dei risultati vista la difficoltà tecnica a sezionare organi di dimensioni inferiori. Nel programma internazionale di convalida per l'individuazione degli interferenti endocrini, il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. La somministrazione deve iniziare il più presto possibile dopo lo svezzamento e comunque prima che gli animali abbiano raggiunto le nove settimane di vita. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Se uno studio di tossicità orale a dose ripetuta costituisce una tappa preliminare di uno studio a lungo termine, si utilizzano di preferenza animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine in entrambi gli studi.

Stabulazione e alimentazione

12. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere almeno del 30 % e preferibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio, ma l'obiettivo da raggiungere è un'umidità del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali.

13. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

14. Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali devono essere identificati in modo univoco e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio, in modo da consentirne l'adattamento alle condizioni di laboratorio.

Preparazione delle dosi

15. La sostanza di prova viene somministrata per via intragastrica, oppure con la dieta o l'acqua. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisiche/chimiche/tossico-cinetiche della sostanza in esame.

▼M4

16. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Si raccomanda di prendere in considerazione, in primis e ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta l'uso di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. È necessario determinare la stabilità della sostanza di prova nel veicolo.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

17. Per ciascun livello di dosaggio dovranno essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Se si prevedono sacrifici intermedi, il numero deve essere aumentato del numero di animali che si prevede di sottoporre a eutanasia prima del completamento dello studio. Si può considerare di includere un gruppo satellite supplementare di dieci animali (5 per sesso) nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato con la dose più elevata al fine di monitorare la reversibilità, la persistenza, l'insorgenza ritardata di effetti tossici, per almeno 14 giorni dopo il trattamento.

Dosaggio

18. In genere si devono utilizzare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo; tuttavia, se la valutazione di altri dati porta a prevedere l'assenza di effetti a una dose ripetuta di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, può essere eseguito un saggio limite. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati si può effettuare uno studio preliminare di tipo «range finding». Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari del gruppo di trattamento. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

19. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Deve inoltre essere selezionata una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte dosi-correlate e il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL). In genere, per determinare i livelli decrescenti di dosaggio si consiglia un intervallo con un fattore compreso tra 2 e 4 e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che avere un intervallo eccessivamente lungo (ad esempio superiore a un fattore 10) fra un dosaggio e l'altro.

20. Nel caso di tossicità generale osservata (ad esempio riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint neurologici, endocrini o legati al sistema immunitario devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

21. Se una prova, effettuata secondo le procedure descritte per il presente studio, con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, ad una concentrazione equivalente (in funzione del peso corporeo), non produce effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può considerare che non è necessario eseguire uno studio completo utilizzando tre livelli di dose. Si effettua il saggio limite, tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

▼M4

Somministrazione delle dosi

22. La sostanza in esame è somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di 28 giorni. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta sola dipende dalla taglia dell'animale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose per le quali si possono prevedere fino a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

23. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata per via intragastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e all'occorrenza modificata per mantenere costante il livello di dose rispetto al peso dell'animale. Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare a dose ripetuta, la dieta degli animali deve essere identica nei due studi.

Osservazioni

24. Il periodo di osservazione ha una durata di 28 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato al monitoraggio di follow up devono essere esaminati per almeno ulteriori 14 giorni senza alcun trattamento, al fine di individuare l'insorgenza tardiva, la persistenza o la scomparsa degli effetti tossici.

25. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Si registrano le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità.

26. Una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e, successivamente, almeno una volta la settimana tutti gli animali vengono sottoposti ad osservazioni cliniche particolareggiate. Queste osservazioni devono essere eseguite fuori dalle gabbie, collocando gli animali in un recinto standard, di preferenza sempre alla stessa ora. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio di prova. Si avrà cura di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali; le osservazioni devono essere effettuate da persone che non sono a conoscenza del trattamento somministrato. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività autonomica (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipie (ad esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in cerchio) o comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, marcia a ritroso) (2).

27. Nella quarta settimana di esposizione si procede alla valutazione della reattività sensoriale a diversi tipi di stimolo (2) (per esempio uditivi, visivi e propriocettivi) (3) (4) (5), della forza prensile (6) e dell'attività motoria (7). Ulteriori indicazioni sulle procedure utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate procedure alternative non indicate nella bibliografia.

▼M4

28. Le osservazioni funzionali previste per la quarta settimana di esposizione possono essere evitate nel caso di uno studio preliminare ad un successivo studio subcronico (90 giorni). In questa eventualità, le osservazioni funzionali devono essere incluse nello studio complementare. D'altro canto, le informazioni ricavate dalle osservazioni funzionali nel corso dello studio a dose ripetuta possono essere utili nella determinazione dei livelli di dosaggio per un successivo studio subcronico.

29. Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con l'esecuzione degli esami funzionali.

30. Nel corso dell'autopsia, si può (eventualmente) determinare il ciclo estrale per tutte le femmine mediante un Paptest. Queste osservazioni forniscono informazioni sullo stadio del ciclo estrale al momento dell'eutanasia e agevoleranno la valutazione istologica dei tessuti sensibili agli estrogeni [cfr. Linee guida sull'istopatologia (19)].

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

31. Tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta la settimana e il consumo di cibo deve essere determinato almeno una volta la settimana. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, anche il consumo di acqua va misurato almeno una volta la settimana.

Ematologia

32. Al termine del periodo di prova, occorre procedere agli esami ematologici seguenti: ematocrito, concentrazioni di emoglobina, conteggio degli eritrociti, reticulociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di piastrine e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Se la sostanza in esame o i suoi metaboliti putativi hanno o possono avere proprietà ossidanti occorre effettuare altre analisi, relative tra l'altro alla concentrazione di metaemoglobine o ai corpi di Heinz.

33. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito immediatamente prima o durante l'eutanasia degli animali e conservati in condizioni adeguate. Gli animali devono essere a digiuno la notte prima dell'eutanasia ([1]).

Biochimica clinica

34. Gli esami biochimico-clinici finalizzati allo studio dei principali effetti tossici sui tessuti e, in particolare, sui reni e sul fegato devono essere effettuati su campioni di sangue prelevati da tutti gli animali immediatamente prima o durante la loro soppressione (eccetto gli animali trovati moribondi e/o soppressi nel corso dello studio). Le analisi sul plasma o sul siero comprenderanno il sodio, il potassio, il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali e l'albumina, almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi, la fosfatasi alcalina, la gamma-glutamil transpeptidasi e la glutammato-deidrogenasi). Le determinazioni di altri enzimi (di origine epatica o di altro tipo) e della bilirubina possono talvolta fornire indicazioni utili.

35. A titolo facoltativo, nel corso dell'ultima settimana dello studio, si possono effettuare le seguenti analisi delle urine su campioni raccolti in momenti specifici: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

([1]) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. D'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza in esame. Se si opta per il digiuno notturno, gli esami biochimico-clinici dovranno essere effettuati dopo le osservazioni funzionali della quarta settimana.

▼M4

36. È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sul plasma o sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni dovranno essere eseguite qualora si abbia motivo di ritenere o di sospettare che le proprietà della sostanza in esame possano alterare i profili metabolici riguardanti il calcio, il fosfato, i trigliceridi, gli ormoni specifici e la colinesterasi. Queste analisi vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

37. Anche se la valutazione internazionale degli endpoint legati al sistema endocrino non è riuscita a stabilire in modo chiaro il vantaggio dell'analisi degli ormoni tirodei (T3, T4) e della TSH, potrebbe essere utile conservare dei campioni di plasma o di siero per misurare la T3, la T4 e la TSH (opzionale) se vi sono indicazioni di un effetto sull'asse ipofiso-tiroideo. Per lo stoccaggio questi campioni possono essere congelati a - 20°. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento dell'eutanasia, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali,

— metodi di eutanasia, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali,

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

L'identificazione definitiva delle sostanze chimiche che agiscono sul sistema tiroideo è più affidabile se si fonda sull'analisi istopatologica più che sui livelli ormonali.

38. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. Si raccomanda di tenere conto dei tassi di T3, T4 e TSH provocati da alterazioni dell'istopatologia della tiroide. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati. Pertanto non è sempre possibile fornire criteri di prestazione fondati su dati storici omogenei. In alternativa, i laboratori devono fare il possibile per mantenere i coefficienti di variazione al di sotto di 25 per la T3 e la T4 e di 35 per la TSH. Tutte le concentrazioni devono essere annotate in ng/ml.

39. Se i dati di riferimento storici sono inadeguati, occorre tenere conto delle variabili ematologiche e di biochimica clinica prima di iniziare i dosaggi, di preferenza su un gruppo di animali diverso dal gruppo in esame.

PATOLOGIA

Autopsia macroscopica

40. Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti ad un'autopsia macroscopica completa e dettagliata che comprenda un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali, i testicoli, gli epididimi, l'insieme composto dalla prostata e le vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, il timo, la milza, il cervello e il cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati prima del completamento dello studio) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati immediatamente dopo l'ablazione, per evitare l'essiccamento. Occorre prelevare con cautela l'insieme della prostata in modo da evitare di perforare le vescicole seminali piene di liquido. In alternativa si può liberare la vescicola seminale e la prostata dai tessuti aderenti e pesarli previa fissazione.

▼M4

41. Eventualmente, per evitare il disseccamento, subito dopo la dissezione si possono pesare due altri organi: le due ovaie (peso a umido) e l'utero, ivi compreso il collo dell'utero [gli orientamenti sull'ablazione e la preparazione dei tessuti uterini ai fini del loro peso sono contenuti nella linea guida dell'OCSE n. 440 (18)].

42. Il peso della tiroide (facoltativo) può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica.

43. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per l'esame istopatologico che si intende effettuare successivamente (cfr. paragrafo 47): tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e ponte), midollo spinale, occhi, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni (conservati con dilatazione mediante fissativo e poi immersione), gonadi (testicoli e ovaie), organi sessuali accessori (utero e collo dell'utero, epididimi, prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione), vagina, vescica e linfonodi [oltre al linfonodo più vicino un altro linfonodo, in funzione dell'esperienza del laboratorio (15)], nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, muscolo e osso dello scheletro con il midollo osseo (una sezione/o un preparato fresco di midollo osseo aspirato). Si raccomanda di fissare i testicoli mediante immersione in un fissativo di Bouin o di Davidson modificato (16) (17). La tunica albuginea deve essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

44. I tessuti elencati qui di seguito possono apportare informazioni utili sugli effetti endocrini: gonadi (ovaie e testicoli), organi sessuali accessori (utero, collo dell'utero, epididimi, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione, prostata dorso laterale e ventrale), vagina, ipofisi, ghiandola mammaria maschile, tiroide e ghiandola surrenale. Non ci sono sufficienti riscontri di alterazioni nelle ghiandole mammarie maschili, ma questo parametro può essere molto sensibile alle sostanze con attività estrogenica. L'osservazione degli organi/tessuti non ripresi nel paragrafo 43 è facoltativa (cfr. appendice 2).

45. Il documento di orientamento sull'istopatologia (19) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

46. Nel corso del programma internazionale di prove, è stato rilevato che gli effetti endocrini poco evidenti, dovuti a sostanze chimiche in grado di squilibrare leggermente l'omeostasi degli ormoni sessuali, possono essere individuati dalla loro capacità di interferire sulla sincronizzazione del ciclo estrale in vari tessuti più che da evidenti alterazioni istopatologiche degli organi sessuali femminili. Sebbene non vi siano prove inconfutabili in tal senso, si raccomanda di tenere conto, nell'interpretazione dell'esame istologico delle ovaie, di una possibile asincronia del ciclo estrale (cellule follicolari, tecali e della granulosa). Se si esamina la fase del ciclo mediante un Paptest, si può tenere conto anche di questo dato come elemento di confronto aggiuntivo.

▼M4

Esame istopatologico

47. Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata vanno sottoposti a un esame istopatologico completo. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

48. Si procederà all'esame di tutte le lesioni macroscopiche.

49. Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

DATI E RELAZIONE

Dati

50. Devono essere riportati i dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo di trattamento il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante la prova o sottoposti a eutanasia per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che manifestano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati con indicazione del momento dell'insorgenza, della durata e della gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali che manifesta ciascun tipo di lesione.

51. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. I confronti degli effetti osservati nell'ambito di un intervallo di dosaggio deve rendere inutile l'utilizzo di prove t multiple. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

52. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

Relazione sulla prova

53. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

— specie/ceppo impiegati,

— numero, età e sesso degli animali,

— provenienza, stabulazione, dieta ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio della prova,

— qualora non siano stati utilizzati ratti, occorre spiegarne il motivo.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi,

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, sulla concentrazione utilizzata, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato,

▼M4

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame,

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno),

— informazioni dettagliate sulla qualità degli alimenti e dell'acqua.

Endpoint facoltativi esaminati:

— elenco degli endpoint facoltativi esaminati.

Risultati:

— peso corporeo/variazioni del peso corporeo,

— assunzione di cibo, ed eventualmente di acqua,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità,

— natura, gravità e durata degli effetti clinici (sia reversibili che non reversibili),

— valutazione dell'attività sensoriale, della forza prensile e dell'attività motoria,

— test ematologici con i relativi valori basali,

— test biochimici clinici con i relativi valori basali,

— peso corporeo al momento dell'eutanasia e dati sul peso degli organi,

— referti autoptici,

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici,

— dati sull'assorbimento, se disponibili,

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

▼M4

Appendice 1

DEFINIZIONI

Androgenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad esempio il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad esempio il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad esempio estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es T_3.) in un mammifero.

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza somministrata. La dose è espressa col peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale testato per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Tossicità evidente: termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

NOAEL è l'abbreviazione di *no-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad esempio estradiolo 17ß) in un mammifero.

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

Attività tiroidea: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es T_3.) in un mammifero.

Validazione è un processo scientifico destinato a caratterizzare le prescrizioni e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un obiettivo specifico.

▼M4

Appendice 2

Endpoint raccomandati nel metodo di prova B.7 per l'individuazione degli interferenti endocrini

Endpoint obbligatori	Endpoint facoltativi
Peso	
— Testicoli — Epididimi — Ghiandole surrenali — Prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione	— Ovaie — Utero, ivi compreso il collo dell'utero — Tiroide
Esame istopatologico	
— Gonadi: — Testicoli e — Ovaie — Organi sessuali accessori: — Epididimi, — Prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione — Utero, ivi compreso il collo dell'utero — Ghiandole surrenali — Tiroide — Vagina	— Paptest — Ghiandole mammarie maschili — Ipofisi
Dosaggi ormonali	
	— Livelli di T3 e T4 circolanti — Livelli di TSH circolante

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (Parigi, 1992) Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to.Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1 003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OCSE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCSE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCSE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCSE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.htm l

(12) OCSE (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCSE. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCSE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pagg. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OCSE (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals Nº 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OCSE (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 28 GIORNI

SINTESI

Il presente metodo di prova rivisto B.8 è stato concepito per caratterizzare pienamente la tossicità per inalazione della sostanza in esame a seguito di un'esposizione ripetuta per un periodo di tempo limitato (28 giorni) e fornire dati per valutazioni quantitative dei rischi legati all'inalazione. Dei gruppi di roditori, composti da almeno 5 maschi e 5 femmine, sono esposti per 6 ore al giorno per 28 giorni a: a) la sostanza in esame a tre o più livelli di concentrazione; b) all'aria filtrata (controllo negativo); e/o c) al veicolo (gruppi di controllo del veicolo). Di norma gli animali sono esposti alla sostanza in esame per 5 giorni ma è possibile anche esporli 7 giorni su 7. Vengono sempre testati sia maschi che femmine, ma possono essere esposti a livelli di concentrazione diversi se uno dei due sessi è notoriamente più sensibile ad una determinata sostanza. Per caratterizzare in modo più adeguato la tossicità della sostanza in esame, il presente metodo consente al responsabile dello studio di includere dei gruppi satellite (reversibilità), lavaggio bronchioalveolare, esami neurologici e ulteriori valutazioni istopatologiche o di patologia clinica.

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 412 (2009). La prima linea guida dell'OCSE sulla tossicità acuta per inalazione n. 412 è stata adottata nel 1981 (1). Questo metodo di prova B.8 (che corrisponde alla linea guida n. 412 rivista) è stato aggiornato per tenere conto dei progressi scientifici e rispondere alle esigenze normative attuali e future.

2. Il presente metodo consente di caratterizzare gli effetti avversi risultanti da un'esposizione quotidiana ripetuta, per inalazione, ad una sostanza per 28 giorni. I dati tratti da uno studio sulla tossicità subacuta per inalazione (a 28 giorni) possono essere utilizzati per le stime quantitative dei rischi [se lo studio non è seguito da una prova di tossicità subcronica per inalazione a 90 giorni (capitolo B.29 del presente allegato)]. Questi dati possono fornire informazioni che consentono di determinare le concentrazioni per studi a più lungo termine come lo studio sulla tossicità subcronica per inalazione a 90 giorni. Il presente metodo di prova non è destinato specificatamente ai test sui nanomateriali. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono riportate alla fine del capitolo e nel documento di orientamento n. 39 (2).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

3. Il laboratorio incaricato della prova deve tenere conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di svolgere lo studio, in modo da migliorare la qualità dello studio e ridurre al minimo l'utilizzo di animali. Tre le informazioni utili per la scelta delle concentrazioni adeguate saranno considerate l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo; l'impiego o gli impieghi previsti per l'esposizione umana, dati (Q)SAR disponibili e dati tossicologici in merito a sostanze chimiche di struttura affine; e dati tratti da prove sulla tossicità acuta per inalazione. Se si prevedono o si constatano effetti neurotossici nel corso dello studio, il responsabile dello studio può decidere di includere le valutazioni ritenute necessarie come una serie di osservazioni funzionali (*functional observational battery* — fob) e la misurazione dell'attività motoria. Lo svolgimento di questi esami aggiuntivi non interferisce con l'impostazione di base dello studio, anche se la durata delle esposizioni può essere fondamentale in relazione ad alcuni esami specifici.

▼M4

4. Le diluzioni di sostanze corrosive o irritanti possono essere saggiate a concentrazioni che non consentono di conseguire il grado di tossicità auspicato [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Nell'esposizione degli animali a questa sostanze, le concentrazioni auspicate devono essere sufficientemente basse da non provocare dolore e stress intensi, pur essendo sufficienti a prolungare la curva concentrazione-risposta fino a dei livelli corrispondenti all'obiettivo scientifico e regolamentare della prova. La scelta di queste concentrazioni deve avvenire caso per caso, di preferenza in base ad uno studio di tipo «range finding» adeguatamente impostato che fornisca informazioni sull'endpoint, l'eventuale soglia di irritazione e il momento dell'insorgenza (cfr. punti da 11 a 13). Occorre fornire la giustificazione della scelta delle concentrazioni.

5. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia. Gli animali moribondi sono considerati alla stregua degli animali che muoiono nel corso della prova. I criteri da applicare per decidere in merito all'eutanasia degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno documento d'orientamento dell'OCSE, che contiene anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (3).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

6. Si devono utilizzare roditori adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La specie preferita è il ratto. In caso di utilizzo di un'altra specie è necessario motivarne la scelta.

Preparazione degli animali

7. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Il giorno della randomizzazione gli animali selezionati devono essere giovani adulti di età compresa tra 7 e 9 settimane. Il loro peso corporeo non deve superare di ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova, affinché si adattino alle condizioni di laboratorio.

Condizioni di allevamento degli animali

8. Gli animali devono essere identificati individualmente, possibilmente mediante dispositivi subcutanei al fine di agevolarne l'osservazione e evitare qualsiasi confusione. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ± 3 °C. L'umidità relativa va idealmente mantenuta tra 30 e 70 %, anche se ciò potrebbe non essere possibile quando si utilizza l'acqua come veicolo. Prima e dopo l'esposizione, gli animali sono generalmente tenuti in gabbia, suddivisi per sesso e concentrazione, ma il numero di animali per gabbia non deve interferire con un'agevole osservazione di ogni singolo animale e deve ridurre al minimo le perdite dovute a cannibalismo e combattimenti. Se l'esposizione avviene «a naso solo», potrebbe essere necessario abituarli ai dispositivi di contenzione, che non devono provocare agli animali eccessivi stress fisici, termici o dinamici. La contenzione può incidere sugli endpoint fisiologici, come la temperatura corporea (ipertermia) e/o il volume respiratorio al minuto. Se si dispone di dati generici che dimostrano che nessuna di queste alterazioni avviene a un livello apprezzabile, il periodo di adattamento ai dispositivi di contenzione non è necessario. Gli animali esposti «a corpo intero» ad un aerosol devono essere stabulati separatamente per la durata dell'esposizione per evitare che filtrino l'aerosol attraverso il pelo degli altri animali presenti nella gabbia. Salvo nei periodi di esposizione, gli animali possono essere nutriti in base a diete convenzionali e certificate da laboratorio, accompagnate da acqua potabile a volontà. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità.

▼M4

Camere di inalazione

9. La scelta della camera di inalazione dipende dalla natura della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Il metodo preferito di esposizione è quello per via nasale (con cui s'intende l'esposizione unicamente della testa, del naso o del muso). Di norma si predilige l'esposizione per via nasale per gli studi di aerosol liquidi o solidi e di vapori che si possono condensare sotto forma di aerosol. L'esposizione «a corpo intero» può essere più indicata per conseguire obiettivi di studio particolari, ma tale scelta deve essere giustificata nella relazione sullo studio. Per garantire la stabilità atmosferica di una camera di esposizione «a corpo intero», il volume complessivo degli animali sottoposti alla prova non deve superare il 5 % del volume della camera. Il documento di orientamento n. 39 (2) descrive i principi delle tecniche di esposizione «a naso solo»e «a corpo intero», nonché i relativi vantaggi e svantaggi.

STUDI DI TOSSICITÀ

Concentrazioni limite

10. A differenza degli studi di tossicità acuta, per gli studi di tossicità subacuta per inalazione a 28 giorni non è definita la concentrazione massima. La concentrazione massima testata deve tenere conto di: 1) la concentrazione massima raggiungibile; 2) il livello di esposizione umana corrispondente al «peggiore dei casi»; 3) la necessità di mantenere un'adeguata alimentazione di ossigeno; e/o 4) il benessere degli animali. In assenza di limiti basati sui dati, si possono utilizzare i valori limite del regolamento (CE) n. 1272/2008 (13) (ossia una concentrazione massima di 5 mg/l per gli aerosol, di 20 mg/l per i vapori e 20 000 ppm per i gas); cfr. documento di orientamento n. 39 (2). Qualora sia necessario superare questi valori limite, per le prove con gas o sostanze fortemente volatili (ad esempio i refrigeranti), occorre giustificare questo superamento. La concentrazione limite deve provocare una chiara tossicità, senza causare stress eccessivo per gli animali né incidere sulla loro longevità (3).

Studio per la determinazione dell'intervallo di dosi (*range finding*)

11. Prima di iniziare lo studio principale, occorre generalmente effettuare uno studio preliminare di tipo range finding. Uno studio di questo tipo è più completo di uno studio di osservazione perché non si limita alla scelta delle concentrazioni. Le conoscenze acquisite grazie a questo tipo di studio possono determinare il buon esito dello studio principale. Uno studio per determinare l'adeguato intervallo di dosi può, ad esempio, fornire informazioni tecniche sul metodo di analisi, la granulometria delle particelle, la scoperta di meccanismi di tossicità, i dati istopatologici e di patologia clinica e le stime circa le concentrazioni NOAEL e MTC (concentrazione massima tollerata) nello studio principale. Il responsabile dello studio può decidere di utilizzare uno studio di tipo range finding per individuare: la soglia di irritazione dell'apparato respiratorio (ad esempio mediante istopatologia dell'apparato respiratorio, test sulla funzionalità polmonare e lavaggi broncoalveolari), la concentrazione massima tollerata dagli animali senza che risentano uno stress eccessivo e i parametri che consentono di caratterizzare al meglio la tossicità della sostanza in esame.

12. Uno studio per la determinazione degli intervalli di dose può comportare uno o più livelli di concentrazione. Per ogni livello di concentrazione sono esposti al massimo tre maschi e tre femmine. Lo studio in questione deve durare da un minimo di 5 giorni ad un massimo di 14 giorni. Nella relazione sullo studio è opportuno illustrare la ragione della scelta delle concentrazioni per lo studio principale, il cui scopo è dimostrare una relazione concentrazione-risposta sulla base dell'endpoint ritenuto a priori più sensibile La concentrazione inferiore deve essere del tipo NOAEL mentre la concentrazione più elevata deve comportare una chiara tossicità, senza causare stress eccessivo per gli animali né incidere sulla loro longevità (3).

▼M4

13. Nello studio di tipo range finding, al momento della scelta dei livelli di concentrazione, occorre tener conto di tutte le informazioni disponibili, anche quelle relative alle relazioni struttura-attività e i dati concernenti sostanze chimiche analoghe (cfr. paragrafo 3). Lo studio di determinazione dell'intervallo di dosi può confermare o invalidare la scelta degli endpoint più sensibili secondo criteri meccanicistici, come l'inibizione della colinesterasi dovuta a organofosfati, la formazione di metaemoglobine da parte di agenti eritrotossici, gli ormoni tiroidei (T_3 e T_4) nel caso degli agenti i tireotossici, le proteine, la LDH, la presenza di neutrofili nei lavaggi broncoalveolari nel caso di particelle inoffensive scarsamente solubili o di aerosol irritanti per i polmoni.

Studio principale

14. Uno studio principale di tossicità subcronica di norma comprende tre livelli di concentrazione e un controllo negativo (aria) e/o un controllo del veicolo, se necessario (cfr. paragrafo 17). Per scegliere i livelli di esposizione adeguati, occorre avvalersi di tutte le informazioni disponibili, ivi compresi i risultati degli studi sistemici di tossicità, il metabolismo e la cinetica (occorre fare il possibile per evitare i livelli di concentrazione elevati caratterizzati da processi cinetici di saturazione). Ogni gruppo comprende almeno 10 roditori (5 maschi e 5 femmine) che sono esposti alla sostanza in esame per 6 ore al giorno, 5 giorni la settimana per 4 settimane (per una durata totale dello studio di 28 giorni). Gli animali possono anche essere esposti per 7 giorni la settimana (ad esempio nel caso di prove su prodotti farmaceutici inalati). Se uno dei due sessi è notoriamente più sensibile alla sostanza in esame, i livelli di concentrazione possono differire secondo il sesso al fine di ottimizzare la concentrazione-risposta come indicato al paragrafo 15. Se per l'esposizione solo per via nasale s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è possibile adeguare la durata massima d'esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. La scelta di una durata di esposizione inferiore a 6 ore o superiore (ad esempio 22 ore al giorno) deve essere debitamente motivata. [cfr. il documento di orientamento n. 39 (2)]. Durante il periodo di esposizione l'alimentazione va sospesa, a meno che l'esposizione quotidiana sia superiore a 6 ore. Nel corso dell'esposizione «a corpo intero» si può continuare a somministrare acqua.

15. Le concentrazioni bersaglio selezionate devono consentire di individuare l'organo o gli organi bersaglio e evidenziare una concentrazione-risposta chiara.

— Il livello di concentrazione elevato deve ridurre gli effetti tossici senza provocare segni persistenti o la morte che impedirebbero una valutazione significativa dei risultati

— Il o i livelli di concentrazione medi devono essere intervallati in modo da produrre una graduazione degli effetti tossici tra la bassa e l'alta concentrazione

— Il livello di dose inferiore non deve produrre effetti tossici o al massimo produrre effetti poco rilevanti.

Studio satellite (studio di reversibilità)

16. Uno studio di reversibilità può essere utilizzato per evidenziare il carattere reversibile, persistente o ritardato della tossicità, per un periodo post-trattamento di una durata adeguata, e comunque di almeno 14 giorni. I gruppi satellite sono costituiti da cinque maschi e cinque femmine esposti contemporaneamente agli animali in esame nell'ambito dello studio principale. Questi gruppi devono essere esposti alla concentrazione più elevata della sostanza in esame. Sarebbe opportuno utilizzare anche un gruppo di controllo (aria) e/o un gruppo di controllo del mezzo (cfr. paragrafo 17).

▼M4

Animali di controllo

17. Gli animali del controllo negativo (aria) devono essere trattati come gli animali del gruppo soggetto alla prova, ad eccezione del fatto che sono esposti ad aria filtrata e non alla sostanza in esame. Quando per produrre l'atmosfera di prova si utilizza acqua o un'altra sostanza, occorre integrare nello studio un gruppo di controllo del veicolo al posto del gruppo di controllo negativo (aria). Laddove possibile è opportuno utilizzare l'acqua come veicolo. In tal caso, gli animali del gruppo di controllo devono essere esposti all'aria caratterizzata dalla stessa umidità relativa dell'aria del gruppo in esame. La selezione di un veicolo adeguato deve basarsi su dati dello studio preliminare o storici adeguati. Qualora non si disponga di informazioni sufficienti sulla tossicità di un veicolo, il responsabile dello studio può utilizzare un gruppo di controllo negativo (aria) e un gruppo di controllo del veicolo, anche se questa opzione è vivamente sconsigliata. Se i dati storici indicano che un veicolo non è tossico, non occorre ricorrere a un gruppo di controllo negativo (aria) ma basta utilizzare un gruppo di controllo del veicolo. Se uno studio preliminare effettuato su una sostanza in esame incorporata in un veicolo non rileva nessuna tossicità, significa che il veicolo non è tossico alla concentrazione in questione e che si deve utilizzare questo gruppo di controllo del veicolo.

CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Somministrazione delle concentrazioni

18. Gli animali sono esposti alla sostanza in esame sotto forma di gas, vapore, aerosol o una loro miscela. Lo stato fisico da testare dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, dalla concentrazione prescelta e/o dalla forma fisica nella quale è più probabile che essa si presenti nel corso della manipolazione e dell'utilizzo. Le sostanze igroscopiche e reattive dal punto di vista chimico devono essere testate in atmosfera secca. Occorre prestare attenzione al fine di evitare concentrazioni esplosive. Per ridurre la granulometria, il materiale particolato può essere sottoposto a processi meccanici. Ulteriori informazioni sono riportate nel documento di orientamento n. 39 (2).

Distribuzione granulometrica

19. La granulometria deve essere effettuata per tutti gli aerosol e i vapori che potrebbero condensarsi e formare aerosol. Per consentire l'esposizione di tutte le zone pertinenti delle vie respiratorie, si raccomanda di utilizzare degli aerosol con diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) da 1 a 3 μm con una deviazione standard geometrica (σ_g) compresa tra 1,5 e 3,0 (4). Occorre fare quanto possibile per rispettare queste condizioni, ma qualora non ci si riuscisse è necessario presentare il parere di un esperto. Ad esempio le particelle dei fumi metallici possono essere più piccole dello standard indicato, mentre le particelle caricate e le fibre possono superare questo standard.

Preparazione della sostanza in esame in un veicolo

20. Idealmente la sostanza deve essere testata senza un veicolo. Qualora sia necessario utilizzare un veicolo per ottenere la concentrazione e la granulometria adeguate della sostanza in esame, è preferibile utilizzare l'acqua. Quando una sostanza è disciolta in un veicolo, occorre verificarne la stabilità.

MONITORAGGIO DELLE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Flusso d'aria nella camera di esposizione

21. Durante ogni esposizione è necessario regolare attentamente, monitorare in continuo e registrare almeno una volta l'ora il flusso d'aria nella camera. Il monitoraggio in tempo reale della concentrazione (o stabilità temporale) dell'atmosfera di prova costituisce una misura integrale di tutti i parametri dinamici e un modo indiretto di controllare tutti i parametri dinamici di inalazione. Se la concentrazione è monitorata in tempo reale, la frequenza

▼M4

di misurazione dei flussi d'aria può essere diminuita ad un'unica misurazione per giorno di esposizione. Si farà il possibile, nelle camere d'esposizione «a naso solo», per evitare la reinalazione. La concentrazione di ossigeno deve essere pari ad almeno il 19 % e la concentrazione di biossido di carbonio non deve superare l'1 %. Qualora si ritenga di non poter rispettare queste concentrazioni, è necessario misurare le concentrazioni di ossigeno e di anidride carbonica. Se le misurazioni effettuate il primo giorno di esposizione dimostrano che i livelli di questi gas sono corretti, non occorrono altre misurazioni.

Temperatura e umidità relativa della camera

22. La temperatura della camera deve essere mantenuta a 22 °C ± 3 °C. Sia nel caso delle esposizioni «a naso solo» che per le esposizioni «a corpo intero», l'umidità relativa nella zona in cui respira l'animale è costantemente monitorata e registrata ogni ora nel corso di ciascuna esposizione, se possibile. L'umidità relativa deve preferibilmente essere mantenuta tra 30 e 70 % ma può accadere che questi valori non siano raggiungibili (ad esempio, nel caso delle miscele acquose) o che l'umidità non possa essere misurata per via delle interferenze della sostanza con il presente metodo di prova.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione nominale

23. Laddove possibile, si deve calcolare e registrare la concentrazione nominale nella camera di esposizione. La concentrazione nominale è data dalla massa della sostanza in esame generata divisa per il volume di aria che è passato nel sistema della camera di inalazione. La concentrazione nominale non serve a caratterizzare l'esposizione degli animali, ma un confronto tra la concentrazione nominale e la concentrazione reale dà un'indicazione dell'efficienza di produzione del sistema di prova e può essere utile per individuare eventuali problemi di produzione.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione reale

24. La concentrazione reale è la concentrazione della sostanza in esame prelevata nella zona della camera di inalazione in cui gli animali respirano. Le concentrazioni reali possono essere determinate con metodi specifici (ad esempio campionamento diretto, metodi di adsorbimento o di reazione chimica, e successiva caratterizzazione analitica) o con metodi non specifici, come l'analisi gravimetrica mediante filtrazione. Il ricorso all'analisi gravimetrica è ammissibile solo per gli aerosol di polveri che contengono un unico componente o per gli aerosol di liquidi poco volatili e deve fondarsi su opportune caratterizzazioni specifiche della sostanza in esame effettuate prima dello studio in corso. È possibile ricorrere all'analisi gravimetrica per determinare la concentrazione di un aerosol che contiene varie componenti in polvere, ma occorrono dati analitici che dimostrino che la composizione del materiale in sospensione nell'aria è analoga a quella del materiale di partenza. In assenza di questi dati, può essere necessario rianalizzare periodicamente la sostanza in esame (idealmente in sospensione nell'aria) durante lo studio. Per gli agenti aerosolizzati che possono evaporare o sublimarsi, occorre dimostrare che tutte le fasi sono state raccolte con il metodo prescelto.

25. Nel corso dell'intero studio, è opportuno utilizzare, se possibile, un unico lotto della sostanza in esame e il campione va conservato in condizioni che ne mantengano la purezza, l'omogeneità e la stabilità. Prima di iniziare lo studio, occorre caratterizzare la sostanza in esame, valutandone anche la purezza e, se tecnicamente fattibile, l'identità e le quantità dei contaminanti e delle impurità individuati. A tal fine occorre conoscere quanto meno i dati seguenti: tempo di ritenzione e relativa area del picco, peso molecolare risultante dalla spettroscopia di massa o dalla gascromatografia, oppure altre stime. Il laboratorio che effettua la prova non è responsabile dell'identità del campione in esame, tuttavia per precauzione il laboratorio potrebbe confermare almeno una parte delle caratteristiche fornite dallo sponsor (colore, natura fisica ecc.).

▼M4

26. L'atmosfera di esposizione deve essere mantenuta costante nei limiti del possibile. Per verificare la stabilità delle condizioni di esposizione si può utilizzare un dispositivo di monitoraggio in tempo reale, come un fotometro per aerosol o un analizzatore di idrocarburi totali per i vapori. La concentrazione reale della camera deve essere misurata almeno 3 volte nel corso di ogni giorno di esposizione per ciascun livello di esposizione. Se ciò non è possibile, per via di limitazioni inerenti al flusso d'aria o delle basse concentrazioni, è possibile prelevare un campione per periodo di esposizione. Idealmente si deve prelevare questo campione per l'intero periodo di esposizione. La concentrazione dei singoli campioni prelevati nella camera non deve deviare dalla concentrazione media della camera più del ± 10 %, nel caso di gas e vapori, o ± 20 % nel caso degli aerosol liquidi o solidi. Occorre calcolare e prender nota del tempo necessario affinché la camera di esposizione raggiunga l'equilibrio (t_{95}). La durata di un'esposizione copre il tempo di produzione della sostanza in esame, ivi compreso il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio delle concentrazioni nella camera (t_{95}) e il loro declino. Il documento di orientamento n. 39 (2) contiene indicazioni per la stima di t_{95}.

27. Per miscele molto complesse costituite da gas/vapori e aerosol (ad esempio, atmosfere di combustione e sostanze chimiche generate per propulsione da appositi prodotti/dispositivi finali), ogni fase può comportarsi diversamente nella camera di inalazione. Per ciascuna fase (gas/vapore e aerosol) occorre pertanto scegliere almeno una sostanza indicatrice (analita), normalmente il principio attivo principale della miscela. Quando la sostanza chimica in esame è una miscela, nella relazione dovrà essere indicata la concentrazione analitica per l'intera miscela e non solo quella del principio attivo o della sostanza indicatrice (analita). Informazioni aggiuntive sulle concentrazioni reali sono reperibili nel documento d'orientamento n. 39 (2).

Sostanza chimica in esame: Distribuzione granulometrica

28. La distribuzione granulometrica degli aerosol deve essere determinata almeno una volta la settimana per ciascuna concentrazione, utilizzando un impattore a cascata o un altro strumento, come uno spettrometro APS (*Aerodynamic Particle Sizer*). Se i risultati ottenuti con l'impattore a cascata e con l'altro strumento risultano equivalenti, quest'ultimo può essere utilizzato nel corso dell'intero studio.

29. Per confermare l'efficienza di estrazione dello strumento principale, occorre utilizzare parallelamente un secondo strumento, come un filtro gravimetrico o un impinger/gorgogliatore. La concentrazione massica ottenuta dall'analisi granulometrica deve avvicinarsi, con scarti ragionevoli, a quella ottenuta con l'analisi su filtri [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Se questa equivalenza può essere dimostrata a tutte le concentrazioni saggiate nella fase iniziale dello studio, non è necessario effettuare ulteriori misurazioni di conferma. Per il benessere degli animali occorre ridurre il più possibile i dati incerti che potrebbero comportare la necessità di ripetere uno studio.

30. È necessario effettuare un'analisi granulometrica nel caso di vapori che rischiano di condensarsi e formare aerosol o se si rilevano particelle in un'atmosfera di vapori che si presume possano formare fasi miste.

OSSERVAZIONI

31. Prima e dopo il periodo di esposizione è necessario eseguire frequenti esami clinici degli animali. Osservazioni più frequenti possono essere utili in funzione della risposta degli animali nel corso dell'esposizione. Quando l'osservazione degli animali è ostacolata dai tubi di contenzione, dalla scarsa illuminazione nella camere «a corpo intero» o da atmosfere opache, gli animali vanno attentamente osservati dopo l'esposizione. Le osservazioni fatte prima dell'esposizione del giorno successivo possono rilevare l'eventuale reversibilità o esacerbazione degli effetti tossici.

▼M4

32. Tutte le osservazioni vanno registrate e riportate singolarmente per ciascun animale. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

33. Si osserveranno eventuali alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. La misura della temperatura rettale può corroborare una bradipnea riflessa o un'ipo/ipertermia causate dall'esposizione o dalla reclusione. Lo studio può prevedere ulteriori valutazioni riguardanti: cinetica, biomonitoraggio, funzione polmonare, ritenzione di materiali scarsamente solubili che si accumulano nel tessuto polmonare e variazioni comportamentali.

PESO CORPOREO

34. Il peso di ogni singolo animale deve essere registrato immediatamente prima dell'esposizione (giorno 0), e due volte la settimana successivamente (ad esempio: il venerdì e il lunedì per verificare il recupero dopo un fine settimana senza esposizione, o a intervalli di tempo che consentano di valutare la tossicità sistemica) e al momento della morte o dell'eutanasia. In assenza di effetti nel corso delle prime 2 settimane, il peso corporeo può essere misurato ogni settimana fino al termine dello studio. Gli animali del gruppo satellite (studio di reversibilità) devono continuare ad essere pesati a cadenza settimanale per l'intero periodo di recupero. Al termine dello studio, tutti gli animali devono essere pesati prima dell'eutanasia per non falsare il calcolo del rapporto tra il peso degli organi e il peso corporeo.

CONSUMO DI ALIMENTI E DI ACQUA

35. Si deve procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare, anche il consumo di acqua può essere misurato.

PATOLOGIA CLINICA

36. Tutti gli animali, ivi compresi quelli dei gruppi di controllo e dei gruppi satelliti, una volta sacrificati devono essere sottoposti a esami clinici. L'intervallo di tempo tra la fine dell'esposizione e il prelievo di sangue deve essere annotato, soprattutto quando la ricostituzione dell'endpoint è rapida. Alla fine dell'esposizione, si raccomanda il campionamento per i parametri caratterizzati da una breve emivita del plasma (COHb, CHE e MetHb).

37. Nella tabella 1 sono elencati i parametri di patologia clinica generalmente necessari per gli esami tossicologici. L'esame delle urine non è sempre richiesto, ma può essere effettuato se ritenuto utile in funzione della tossicità prevista o osservata. Per caratterizzare meglio la tossicità della sostanza in esame, il responsabile dello studio può decidere di valutare ulteriori parametri (ad esempio attività colinesterasica, lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina o corpi di Heinz, creatinina chinasi, rapporto mieloide/eritroide, troponina, emogas, lattato deidrogenasi, sorbitolo deidrogenasi, glutammato-deidrogenasi e gamma-glutamil transpeptidasi).

▼M4

Tabella 1

Parametri standard di patologia clinica

Ematologia	
Conteggio eritrocitario	Conta totale dei globuli bianchi
Ematocrito	Conta differenziale dei globuli bianchi
Concentrazione dell'emoglobina	Conta delle piastrine
Tenore globulare medio in emoglobina	Coagulabilità (scegliere un parametro):
Volume medio corpuscolare	— Tempo di protrombina
Concentrazione di emoglobina corpuscolare media	— Tempo di coagulazione
Reticolociti	— Tempo di tromboplastina parziale attivata

Chimica clinica	
Glucosio (*)	Alanina-aminotransferasi
Colesterolo totale	Aspartato amminotransferasi
Trigliceridi	Fosfatasi alcalina
Azoto ureico ematico	Potassio
Bilirubina totale	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteina totale	Fosforo
Albumina	Cloruro
Globulina	

Esame delle urine (facoltativo)	
Aspetto (colore e torbidità)	Proteina totale
Volume	Glucosio
Densità relativa o osmolalità	Sangue/cellule ematiche
pH	

(*) Il responsabile dello studio deciderà se per gli animali è necessario un periodo di digiuno, in quanto un lungo periodo di digiuno può portare a misurazioni del glucosio parzialmente errate negli animali esposti rispetto agli animali del gruppo di controllo. Se si ricorre al digiuno, occorre che il periodo sia adeguato in funzione della specie utilizzata; per il ratto può essere di 16 ore (digiuno notturno). La determinazione della glicemia a digiuno può essere effettuata dopo il digiuno notturno, nel corso dell'ultima settimana di esposizione, o dopo la notte di digiuno notturno precedente l'autopsia (in tal caso insieme a tutti gli altri parametri di patologia clinica).

38. Qualora esista la prova che le vie respiratorie inferiori (gli alveoli) sono il principale sito di deposito e ritenzione, si può ricorrere al lavaggio broncoalveolare (BAL) come tecnica migliore per analizzare quantitativamente i parametri del rapporto dose-effetto, incentrandosi soprattutto sull'alveolite, l'infiammazione polmonare e la fosfolipidosi. Questo esame consente di analizzare adeguatamente l'evoluzione del rapporto dose-effetto e del decorso temporale di una lesione alveolare. Il fluido del lavaggio può essere analizzato basandosi sul numero totale e differenziale di leucociti, proteine totali e lattato deidrogenasi. Altri parametri da considerare sono quelli indicativi di lesione lisosomiale, fosfolipidosi, fibrosi, e infiammazione irritativa o allergica che può comprendere la determinazione di citochine o di chemiochine proinfiammatorie. Le misure legate al BAL spesso integrano i risultati degli esami istopatologici senza tuttavia sostituirli. Il documento di orientamento n. 39 (2) contiene le indicazioni su come effettuare il lavaggio dei polmoni.

▼M4

PATOLOGIA MACROSCOPICA E PESO DEGLI ORGANI

39. Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso della prova e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti al dissanguamento totale (se fattibile) e autopsia macroscopica. Occorre annotare il tempo trascorso tra la fine dell'ultima esposizione di ogni animale e il loro sacrificio. Se non è possibile eseguire l'autopsia subito dopo il rilevamento del decesso, l'animale deve essere refrigerato (non congelato) ad una temperatura sufficientemente bassa da ridurre al minimo l'autolisi. L'autopsia deve essere eseguita non appena possibile, di norma entro un giorno o due dal decesso. Per ogni animale si annoteranno tutte le alterazioni patologiche macroscopiche, prestando particolare attenzione a quelle delle vie respiratorie.

40. Nella tabella 2 sono elencati gli organi e i tessuti che devono essere conservati in un ambiente adeguato nel corso dell'autopsia macroscopica ai fini dell'esame istopatologico. La conservazione degli organi e dei tessuti [tra parentesi quadre] e di qualsiasi altro organo o tessuto sono a discrezione del responsabile dello studio. Gli organi indicati in **grassetto** devono essere espiantati e pesati allo stato umido, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. La tiroide e gli epididimi devono essere pesati solo se necessario in quanto la loro asportazione può ostacolare la valutazione istopatologica. Gli organi e i tessuti sono fissati mediante formalina tamponata al 10 % o un altro fissativo adeguato, non appena finita l'autopsia e non meno di 24-48 ore prima dell'ablazione, in funzione del fissativo utilizzato.

Tabella 2

Organi e tessuti preservati nel corso dell'autopsia macroscopica

Ghiandole surrenali	Vescicole seminali
Midollo osseo (e/o aspirato fresco di midollo)	Midollo spinale (cervicale, mediotoracico e lombare)
Cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	**Milza**
[Occhi (retina, nervo ottico) e palpebre]	Stomaco
Cuore	**Testicoli**
Reni	**Timo**
Laringe (3 livelli, 1 livello per comprendere la base dell'epiglottide)	Tiroide
Fegato	Trachea almeno a 2 livelli, ivi comprese 1 sezione longitudinale attraverso la carena e 1 sezione trasversale)
Polmone (tutti i lobi ad un livello, compresi i bronchi principali)	[Vescica]
Linfonodi della regione ilare del polmone, soprattutto per il particolato di sostanze chimiche poco solubile. Per esami più approfonditi e/o studi incentrati sull'aspetto immunologico, si possono esaminare anche altri linfonodi, ad esempio quelli delle regioni mediastinale, cervicale/submandibolare e/o auricolare.	Utero
	Tutte le lesioni macroscopiche
Tessuti nasofaringei (almeno 4 livelli; 1 livello per comprendere il dotto nasofaringeo e il tessuto associato al naso — *Nasal Associated Lymphoid Tissue* — NALT)	
Esofago	
[Bulbo olfattivo]	
Ovaie	

▼M4

41. I polmoni devono essere asportati intatti, pesati e trattati con un fissativo idoneo ad una pressione di 20-30 cm di acqua per garantire che la struttura dei polmoni venga preservata (5). Le sezioni sono prelevate per tutti i lobi ad un livello, ivi inclusi i bronchi principali, ma se si effettua un lavaggio polmonare, il lobo che non è stato lavato è sezionato su tre livelli (non sezioni in serie)

42. Si devono esaminare almeno 4 livelli di tessuti rinofaringei, uno dei quali deve comportare il canale rinofaringeo (5) (6) (7) (8) (9) per permettere un esame adeguato dell'epitelio squamoso, transizionale (respiratorio non ciliato), respiratorio (respiratorio ciliato) e olfattivo, nonché del tessuto linfatico (NALT) (10) (11). Occorre inoltre esaminare tre livelli della laringe, tra cui uno che comprenda la base dell'epiglottide (12). Occorre esaminare almeno due livelli della trachea, ivi compresa una sezione longitudinale lungo la carena della biforcazione dei bronchi extrapolmonari e una sezione trasversale.

ESAME ISTOPATOLOGICO

43. Una valutazione istopatologica di tutti gli organi e i tessuti di cui alla tabella 2 è necessaria per i gruppi di controllo e i gruppi trattati con la concentrazione più elevata, e per tutti gli animali che muoiono o subiscono l'eutanasia nel corso dello studio. Occorre prestare particolare attenzione all'apparato respiratorio, agli organi bersaglio e alle lesioni macroscopiche. Gli organi e tessuti sui quali si riscontrano delle lesioni nel gruppo trattato con la concentrazione più elevata devono essere esaminati in tutti i gruppi. Il responsabile dello studio può decidere di effettuare valutazioni istopatologiche anche per altri gruppi al fine di dimostrare una chiara risposta alle concentrazioni Quando si utilizza un gruppo satellite (reversibilità), la valutazione istopatologica va eseguita su tutti i tessuti e gli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati. Se nel gruppo trattato con la concentrazione più elevata si registra un numero eccessivo di morti premature o altri tipi di problemi che possono compromettere il significato dei dati, occorre effettuare una valutazione istopatologica del livello di concentrazione immediatamente inferiore. Si deve cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati degli esami microscopici.

DATI E RELAZIONE

Dati

44. Per i singoli animali occorre fornire i dati riguardanti il peso corporeo, il consumo di cibo, la patologia clinica, la patologia macroscopica, il peso degli organi e l'istopatologia. I dati di osservazione clinica devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di prova, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni specifici di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e la reversibilità, e i risultati dell'autopsia. Tutti i risultati, quantitativi e descrittivi, devono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico generalmente riconosciuto. I metodi statistici devono essere stabiliti nella fase di concezione dello studio.

Relazione sulla prova

45. La relazione deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Animali sperimentali e condizioni di allevamento:

— descrizione delle condizioni di stabulazione, tra cui: numero (o modifica del numero) di animali per gabbia, materiale utilizzato per la lettiera, temperatura ambiente e umidità relativa, fotoperiodo e dieta,

▼M4

— specie/ceppo utilizzati e giustificazione dell'impiego di specie diverse dal ratto; Possono essere forniti dati di origine e storici se riguardano animali esposti a condizioni di esposizione, di stabulazione e di digiuno simili,

— numero, età e sesso degli animali,

— metodo di randomizzazione,

— descrizione dell'eventuale condizionamento prima della prova, in particolare per quanto concerne dieta, quarantena e terapie.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione),

— dati di identificazione e numero CAS (*Chemical Abstract Services*), se noto.

Veicolo:

— motivazione dell'utilizzo di un veicolo e giustificazione per la scelta del veicolo (se diverso dall'acqua),

— dati storici o paralleli che dimostrano che il veicolo non interferisce con i risultati dello studio.

Camera di inalazione:

— descrizione dettagliata della camera di inalazione, comprendente il volume e un diagramma,

— provenienza e descrizione delle apparecchiature utilizzate per l'esposizione degli animali e per la generazione dell'atmosfera,

— apparecchi di misurazione della temperatura, dell'umidità, della granulometria e della concentrazione reale,

— fonte dell'aria e sistema di climatizzazione utilizzato,

— metodi utilizzati per calibrare l'apparecchiatura al fine di garantire l'omogeneità dell'atmosfera di prova,

— differenza di pressione (positiva o negativa),

— bocchette di esposizione per camera («a naso solo»); ubicazione degli animali nella camera («a corpo intero»),

— stabilità dell'atmosfera di prova,

— ubicazione dei sensori termometrici e igrometrici e dei punti di campionamento dell'atmosfera della prova nella camera,

— trattamento dell'aria fornita/estratta,

— portate dell'aria, portata dell'aria in ogni punto di esposizione («a naso solo») o rapporto tra il volume occupato dagli animali e il volume della camera («a corpo intero»),

— tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera (t_{95}),

— numero di sostituzioni del volume per ora,

— dispositivi di misurazione (se applicabile).

Dati sull'esposizione:

— giustificazione della scelta della concentrazione bersaglio dello studio principale,

▼M4

— concentrazioni nominali (ottenute dividendo la massa della sostanza in esame immessa nella camera d'inalazione per il volume dell'aria fatta circolare nella camera),

— concentrazioni reali ottenute nella zona in cui respirano gli animali; per le miscele in esame che producono forme fisiche eterogenee (gas, vapori, aerosol), si può analizzare separatamente ciascuna di esse,

— riportare le concentrazioni atmosferiche in unità di massa (ad esempio, mg/l, mg/m^3 ecc.), più che in unità di volume (ad esempio, ppm, ppb ecc.),

— distribuzione della dimensione delle particelle, diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (σ_g), con relativi metodi di calcolo. Occorre indicare anche le singole analisi granulometriche.

Condizioni sperimentali:

— indicazioni sulla preparazione della sostanza chimica in esame, precisando i dettagli delle procedure impiegate per ridurre la granulometria dei solidi o per preparare soluzioni della sostanza in esame,

— una descrizione (di preferenza corredata di uno schema) dell'apparecchiatura utilizzata per generare l'atmosfera sperimentale e per esporvi gli animali,

— ragguagli sull'apparecchiatura utilizzata per monitorare la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera (ad esempio sviluppo di una curva di calibrazione),

— informazioni sull'apparecchiatura utilizzata per raccogliere campioni per la determinazione della concentrazione e della distribuzione della dimensione delle particelle nella camera,

— dettagli sul metodo d'analisi chimica impiegato e sulla convalida di tale metodo (specificando l'efficienza di recupero della sostanza in esame dal mezzo campionato),

— metodo di randomizzazione per l'assegnazione degli animali nei gruppi sperimentali e di controllo,

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua),

— giustificazione della scelta delle concentrazioni sperimentali.

Risultati:

— tabella con la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera,

— tabella con le concentrazioni nominali e reali nella camera,

— tabella con i dati granulometrici, ivi compresi i dati analitici sul campionamento, sulla distribuzione granulometrica e i calcoli del DAMM e della σ_g,

— tabella con i dati di risposta e livello di concentrazione per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa, natura, gravità, inizio e durata degli effetti),

▼M4

— tabella con il peso dei singoli animali,

— tabella con il consumo di cibo,

— tabella con i dati clinico-patologici,

— reperti necroscopici ed reperti istopatologici per ciascun animale, se disponibili,

— tabella con altri eventuali parametri misurati.

Discussione e interpretazione dei risultati:

— occorre dare particolare importanza alla descrizione dei metodi impiegati per soddisfare i criteri del presente metodo di prova, ad esempio per quanto concerne la concentrazione limite o la granulometria,

— occorre esaminare la respirabilità delle particelle alla luce dei risultati complessivi, in special modo se i criteri granulometrici non sono stati soddisfatti,

— si deve tenere conto, nella valutazione globale dello studio, della coerenza dei metodi utilizzati per determinare le concentrazioni nominali e reali e considerare il rapporto tra di esse,

— si deve esaminare la causa probabile di decesso e il meccanismo d'azione prevalente (sistemico o locale),

— occorre fornire delle spiegazioni qualora sia stato necessario sottoporre ad eutanasia animali che manifestavano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente, in base ai criteri illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE citato in bibliografia al punto (3),

— occorre individuare gli organi bersaglio,

— occorre definire il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL) e la dose minima con effetto avverso osservabile (LOAEL).

BIBLIOGRAFIA:

(1) OCSE (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OCSE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pagg. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼B

B.9. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA CUTANEA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata ogni giorno sulla pelle di alcuni gruppi di animali da esperimento, in dosi graduate, un livello di dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante il periodo di applicazione, gli animali vengono osservati quotidianamente per rilevare i sintomi di tossicità. Si sottopongono a necroscopia gli animali morti durante la prova e al termine del saggio vengono sottoposti a necroscopia gli animali sopravvissuti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.6.1. **Preparazioni**

Per un periodo di almeno 5 giorni prima della prova gli animali sono mantenuti nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione del saggio. Prima del saggio gli animali, che dovranno essere giovani e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi previsti per il trattamento e per il controllo. Poco prima dell'esperimento si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può procedere alla rasatura, ma essa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'esperimento. Di norma è necessario ripetere il taglio o la rasatura a intervalli di circa una settimana. Durante il taglio o la rasatura si dovrà badare a non ledere la cute dell'animale. Per l'applicazione della sostanza in esame, si dovrebbe preparare almeno il 10 % della superficie corporea. Nel determinare l'entità dell'area da preparare e le dimensioni della copertura è opportuno tenere presente il peso dell'animale. Le sostanze solide, che possono essere ridotte in polvere se appropriato, dovranno essere inumidite sufficientemente con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. In generale le sostanze liquide sono saggiate in forma non diluita. Dal punto di vista ottimale, applicazioni quotidiane vengono effettuate sulla base di 5-7 giorni per settimana.

1.6.2. **Condizioni per il saggio**

1.6.2.1. *Animali per l'esperimento*

Possono essere utilizzati ratti adulti, conigli o porcellini d'India. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrà essere giustificato.

▼B

All'inizio dello studio l'intervallo di variazione di peso degli animali non dovrebbe superare ± 20 % del valore medio

1.6.2.2. *Numero e sesso*

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile) con cute sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Qualora siano stati programmati sacrifici intermedi di alcuni animali, il numero degli animali dovrà essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un altro gruppo (gruppo satellite) di 10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello massimo di dosaggio per 28 giorni e tenuto in osservazione per 14 giorni dopo il trattamento per rilevare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici. Inoltre si utilizzerà in tale caso pure un gruppo satellite di 10 animali di controllo (5 animali per sesso).

1.6.2.3. *Livelli di dosaggio*

Sono richiesti almeno 3 livelli di dosaggio, almeno 6 ore al giorno, con un gruppo di controllo oppure, nel caso venga usato un veicolo, con un gruppo di controllo del veicolo. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere effettuata ogni giorno alla stessa ora e modificata ad intervalli (settimanali e bisettimanali) al fine di mantenere un livello di dosaggio costante in funzione del peso dell'animale. Gli animali del gruppo di controllo dovranno essere trattati in modo identico agli animali del saggio, ad eccezione che per l'applicazione delle sostanze da saggiare. Se, per facilitare il dosaggio, viene utilizzato un veicolo, al gruppo di controllo dovrà essere somministrato il veicolo allo stesso modo che ai gruppi trattati e nella stessa quantità somministrata al gruppo con il dosaggio più elevato. Il livello di dosaggio più elevato della sostanza in esame dovrebbe causare effetti tossici ma senza causare mortalità oppure causando una mortalità molto limitata. Il livello di dosaggio più basso non dovrebbe provocare alcun sintomo di tossicità. Nei casi in cui vi sia una stima utilizzabile dell'esposizione umana, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superarla. Dal punto di vista ottimale, il livello intermedio dovrebbe provocare effetti tossici osservabili minimi. Nei casi in cui siano usati più livelli di dosaggio intermedi, essi dovrebbero essere intervallati al fine di causare una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi a livello di dosaggio basso e medio e di controllo, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa per consentire una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame dovesse causare una grave irritazione della cute, sarà opportuno ridurne le concentrazioni, e ciò può causare una diminuzione oppure l'assenza degli altri effetti tossici al livello di dosaggio più elevato. Inoltre, se la cute à stata gravemente danneggiata, può essere necessario interrompere il saggio e iniziarne uno nuovo a concentrazioni più basse.

1.6.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio preliminare, effettuato con un livello di dosaggio di 1 000 mg/kg di peso corporeo, oppure con una dose superiore in relazione all'eventuale esposizione umana, se nota, non causi effetti tossici, ulteriori saggi possono essere considerati non necessari.

1.6.2.5. *Periodo di osservazione*

Gli animali da esperimento dovrebbero essere esaminati quotidianamente al fine di rilevare i segni della tossicità. Il momento del decesso e quello in cui appaiono e scompaiono i sintomi di tossicità dovrebbero essere registrati.

▼B

1.6.3. **Procedimento**

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. Da un punto di vista ottimale, la sostanza in esame viene applicata agli animali 7 giorni la settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni eventuale gruppo satellite previsto per proseguire le osservazioni dovrebbero essere tenuti per altri 14 giorni, senza subire trattamenti, al fine di rilevare l'eventuale guarigione o la persistenza degli effetti tossici, La durata dell'esposizione dovrebbe essere almeno di 6 ore/-giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma la maggior parte dell'area trattata dovrebbe essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme.

Durante il periodo di esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto della cute mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrà essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e affinché gli animali non possano ingerire la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere utilizzati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma non è consigliabile l'immobilizzazione completa dell'animale. Come alternativa si può usare un «dispositivo protettivo a collare».

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza residua dovrà essere rimossa utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle.

Tutti gli animali dovranno essere esaminati quotidianamente e dovranno essere registrati i segni di tossicità, inclusi il momento dell'insorgenza, il loro grado e durata. Le osservazioni dovrebbero includere le alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose, e anche dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrà essere effettuata ogni settimana. Si raccomanda, inoltre, che il consumo sia anche misurato ogni settimana. L'esame periodico degli animali è necessario per impedire la perdita degli animali dello studio, dovuta a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine del saggio, tutti gli animali sopravvissuti, ad eccezione del gruppo satellite, sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi e gli animali in condizioni di grave sofferenza o dolore dovranno essere rimossi appena notati, soppressi umanamente e sottoposti a necroscopia.

Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

i) ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione di emoglobina, la conta degli eritrociti, la conta totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

ii) biochimica clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale nel siero: alanina aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-piruvico transaminasi), aspartato aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-ossalacetico transaminasi), azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine seriche totali.

Altre determinazioni, che possono risultare necessarie per un'adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

▼B

Per estendere l'indagine degli effetti osservati, se necessario, si possono utilizzare ulteriori esami biochimico-clinici.

1.6.4. **Necroscopia**

Tutti gli animali dello studio dovranno essere sottoposti a necroscopia completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti, cioè la cute normale e trattata, il fegato, i reni, la milza, i testicoli, le ghiandole surrenali, il cuore e gli organi bersaglio (cioè gli organi che presentano lesioni macroscopiche o variazioni di dimensioni) dovranno essere conservati in un mezzo adatto per l'eventuale futuro esame istopatologico.

1.6.5. **Esame istopatologico**

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo ad alto dosaggio e del gruppo di controllo opportunamente preservati dovranno essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano lesioni attribuibili alla sostanza in esame somministrata al dosaggio più elevato dovranno essere esaminati anche per i gruppi a dosaggio inferiore. Gli animali dell'eventuale gruppo satellite dovranno essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. **DATI**

I risultati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo trattato, il numero di animali all'inizio del saggio e il numero di animali che mostra ciascun tipo di lesione.

Tutti i risultati osservati dovranno essere valutati con un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— dati sugli animali (specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.);

— condizioni di prova (incluso il tipo di medicazione: occlusiva o non occlusiva);

— livello di dosaggio (incluso il veicolo, se usato) e concentrazioni;

— livello senza effetti, dove possibile;

— effetti tossici per sesso e dosaggio;

— il momento del decesso durante il saggio, oppure se gli animali sono sopravvissuti sino al termine;

— effetti tossici o altri effetti;

— momento dell'osservazione di ciascun sintomo anomalo e suo successivo decorso;

— dati relativi al consumo di alimenti e al peso corporeo;

— esami ematologici effettuati e loro risultati;

▼B

— esami biochimico-clinici effettuati e loro risultati;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati, ove possibile;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFIA**

Vedi introduzione generale, parte B (punto E)

▼B

B.10. MUTAGENICITÀ — TEST IN VITRO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA NEI MAMMIFERI

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 473, In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

Il saggio in vitro di aberrazione cromosomica è destinato ad identificare gli agenti che causano aberrazioni cromosomiche strutturali in una coltura di cellule di mammifero (1) (2) (3). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni cromatidiche, benché si verifichino anche aberrazioni cromosomiche. Un aumento della poliploidia può indicare che una sostanza chimica ha la capacità di indurre aberrazioni numeriche. Questo metodo tuttavia non è inteso a misurare le aberrazioni numeriche e non viene usato di norma per tale scopo. Le mutazioni cromosomiche e i fenomeni ad esse correlati sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni cromosomiche e fenomeni ad esse correlati, che causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori dei tumori nelle cellule somatiche, sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane come in quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio.

Nei test in vitro sulle aberrazioni cromosomiche si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate, ceppi cellulari o colture cellulari primarie. Le cellule sono scelte in funzione della capacità di crescita in coltura, della stabilità del cariotipo, del numero e della diversità dei cromosomi e della frequenza di aberrazioni cromosomiche spontanee.

I test in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Tale sistema di attivazione metabolica non può simulare perfettamente le condizioni *in vivo* nel mammifero. Si evitino accuratamente condizioni che porterebbero a risultati positivi che non riflettono una mutagenicità intrinseca ma che possono avere origine da cambiamenti di pH o dell'osmolalità o da livelli elevati di citotossicità (4) (5).

Questi test sono utilizzati per individuare potenziali mutageni e cancerogeni per i mammiferi. Molti composti che risultano positivi al test sono cancerogeni per i mammiferi; tuttavia la correlazione tra il test e la cancerogenicità non è assoluta: dipende dalla classe chimica e vi sono sempre più elementi che inducono a ritenere che esistono cancerogeni non rivelati da questi test, perché sembrano agire attraverso meccanismi diversi dal danno diretto al DNA.

Cfr. anche Introduzione generale parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Aberrazione cromatidica: danno cromosomico strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione cromosomica: alterazione cromosomica strutturale, che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

▼B

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16, ... cromatidi.

Gap: lesione acromatica, di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Coefficiente mitotico: numero delle cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule della popolazione: costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caraneristico della specie.

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè 3n, 4n ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con delezioni, perdita di segmenti, scambi intercromosomici e intracromosomici.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

L'azione della sostanza in esame è saggiata sulle colture cellulari, con e senza attivazione metabolica. Dopo l'esposizione alla sostanza in esame, le colture cellulari sono trattate, a determinati intervalli, con un inibitore della metafase (per esempio Colcemid® o colchicina), raccolte, sottoposte a un processo di colorazione e le cellule in metafase sono esaminate al microscopio per determinare la presenza di aberrazioni cromosomiche.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Cellule*

Si possono usare varie linee cellulari, ceppi o colture cellulari primarie, fra cui cellule umane (per esempio fibroblasti del criceto cinese, linfociti del sangue periferico umano o di altri mammiferi).

1.4.1.2. *Terreni e condizioni di coltura*

Si usino terreni di coltura e condizioni di incubazione (recipienti per coltura, concentraazione di CO_2, temperatura e umidità) adeguati alle colture. Si controlli periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari stabilizzate e nei ceppi; non si usino ceppi contaminati. Dovrebbero essere note la durata normale del ciclo cellulare e le condizioni di coltura utilizzate.

1.4.1.3. *Preparazione delle colture*

Linee cellulari stabilizzate e ceppi: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da impedire che le colture raggiungano la confluenza prima della raccolta, e incubate a 37 ºC.

▼B

Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (per esempio eparina) o linfociti isolati, prelevati da soggetti sani, sono posti in un terreno di coltura contenente un mitogeno (per esempio fitoemoagglutinina) e incubati a 37 ºC.

1.4.1.4. *Attivazione metabolica*

Le cellule dovrebbero essere esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattori (S9) ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici, per esempio: Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), o con un combinazione di fenobarbitone e/3-naftoflavone (10) (11) (12).

La frazione post-mitocondriale viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1 e 10 % v/v nel terreno di coltura. Le condizioni del sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare varie concentrazioni della frazione post-mitocondriale.

Vari nuovi procedimenti, tra cui la creazione di linee cellulari modificate mediante ingegneria genetica che esprimono enzimi attivatori specifici, possono fornire il potenziale di attivazione endogena. La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (per esempio in funzione dell'importanza dell'isoenzima del citocromo P450 nel metabolismo della sostanza in esame).

1.4.1.5. *Sostanza in esame/Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9, L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Nell'esame di sostanze instabili in acqua, si usi un solvente organico anidro. L'acqua può essere rimossa mediante un setaccio molecolare.

1.4.2.2. *Concentrazioni di esposizione*

Fra i criteri da considerare nel determinare la concentrazione massima si citano la citotossicità, la solubilità nel sistema di prova e le variazioni di pH o di osmolalità.

La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un'indicatore adeguato dell'integrità e della moltiplicazione cellulare, come il grado di confluenza, il conteggio delle cellule vitali o il coefficiente mitotico. Può essere utile determinare la citotossicità e la solubilità in un esperimento preliminare.

▼B

Si usino almeno tre concentrazioni analizzagli. In caso di sostanze citotossiche, le concentrazioni devono andare dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica; le concentrazioni devono cioè essere di norma separate al massimo da un fattore compreso tra 2 e $_{v}$ 10. Al momento della raccolta la concentrazione più elevata deve presentare una riduzione significativa (superiore al 50 %) del grado di confluenza, del numero delle cellule o del coefficiente mitotico. Il coefficiente mitotico è solo una misura indiretta di effetti citotossici/-citostatici e dipende dal tempo trascorso dopo il trattamento. È tuttavia accettabile per colture in sospensione, per le quali altre misure della tossicità possono essere complesse e poco pratiche. Dati relativi alla cinetica cellulare, per esempio il tempo medio di moltiplicazione, possono fornire informazioni supplementari. Il tempo medio di moltiplicazione tuttavia è una media generale, che non sempre rivela l'esistenza di sottopopolazioni con ritardi di crescita, e anche piccoli aumenti di esso possono essere associati ad un ritardo sostanziale del tempo di comparsa delle aberrazioni.

Per sostanze a basso grado di citotossicità la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 5 ul/ml, 5 mg/ml o 0,01 M (si scelga il valore più basso).

Per sostanze difficilmente solubili e non tossiche a concentrazioni inferiori al limite di solubilità, la dose massima dovrebbe essere una concentrazione superiore al limite di solubilità nel terreno di coltura, al termine del trattamento. In alcuni casi (per esempio quando si verifica tossicità solo a concentrazioni superiori alla concentrazione minima insolubile) è opportuno eseguire prove a più di una concentrazione, con precipitazione visibile. Può essere utile valutare la solubilità all'inizio e al termine del trattamento, perché questa può variare nel corso dell'esposizione durante il saggio, per la presenza di cellule, S9, siero ecc. L'insolubilità può essere rilevata ad occhio nudo. Il precipitato non deve interferire con la valutazione.

1.4.2.3. *Controlli negativi e positivi*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica. Quando si usa l'attivazione metabolica, la sostanza usata per i controlli positivi deve esigere attivazione per dare una risposta mutagenica.

Come controllo positivo si utilizzi un clastogeno noto, a livelli ai quali ci si attende un aumento riproducibile e individuabile rispetto ai valori normali, che dimostri la sensibilità del test.

La concentrazione del controllo positivo deve essere tale che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. Esempi di sostanze di controllo positive:

Condizione di attivazione metabolica	Sostanza	N. CAS	N. Einecs
Assenza di attivazione metabolica esogena	Metansolfonato di metile	66-27-3	200-625-0
	Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7

▼B

Condizione di attivazione metabolica	Sostanza	N. CAS	N. Einecs
	Etilnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	212-072-2
	4-Nitrochinolina-N-ossido	56-57-5	200-281-1
Presenza di attivazione metabolica esogena	Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfammide Ciclofosfammide monoidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Si possono usare altre adeguate sostanze per i controlli positivi. Si usino, se disponibili, sostanze di una classe chimica correlata.

Si effettuino anche controlli negativi, con solvente o mezzo disperdente usati da soli sul terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento, per ogni fase di raccolta. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che dati precedenti provino che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.4.3. **Procedura**

1.4.3.1. *Trattamento con la sostanza in esame*

Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica. 11 trattamento dei linfociti deve iniziare circa 48 ore dopo la stimolazione mitogenica.

1.4.3.2. Dovrebbero essere usate di norma colture in doppio per ogni concentrazione, anche per le colture di controllo con solo solvente. Se esistono precedenti dati che provano che le variazioni tra colture in doppio sono minime (13) (14), si può accettare l'uso di una sola coltura per concentrazione.

1 test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti di coltura ermetici (15) (16)

1.4.3.3. *Raccolta delle colture*

Nel primo esperimento si espongano le cellule alla sostanza in esame, sia con che senza attivazione metabolica, per 3-6 ore e si proceda al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento (12). Se i risultati sono negativi, sia con che senza attivazione, si esegua un ulteriore esperimento senza attivazione, con trattamento continuo fino al campionamento, dopo un periodo equivalente a circa una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare normale. Alcune sostanze chimiche possono essere individuate più facilmente con tempi di trattamento/campionamento superiori a una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare. I risultati negativi nei testi con attivazione metabolica devono essere confermati caso per caso. Se non si ritiene necessaria la conferma dei risultati negativi, se ne fornisca la motivazione.

▼B

1.4.3.4. *Preparazione dei cromosomi*

Le colture cellulari sono trattate con Colcemid[8] o colchicina, di norma per un periodo variabile da una a tre ore prima della raccolta. Ogni coltura cellulare viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi. La preparazione dei cromosomi comprende il trattamento ipotonico delle cellule, il fissaggio e la colorazione.

1.4.3.5. *Analisi*

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati individualmente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di fissaggio provocano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule classificate devono contenere un numero di centromeri pari al numero modale ± 2 per tutti i tipi di cellule. Per ogni concentrazione e per ogni controllo si devono valutare almeno 200 cellule in metafase ben distribuite e adeguatamente suddivise, se possibile tra le prove in doppio. Tale numero può essere ridotto quando si osserva un gran numero di aberrazioni.

Anche se il test è destinato a rivelare aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare eventuali casi di poliploidia e di endoriduplicazione.

2. **RISULTATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

L'unità sperimentale è la cellula; pertanto si deve valutare la percentuale di cellule che presentano una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Per le colture sperimentali e per le colture di controllo si indichino i vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, con numero e frequenza. I gap vanno registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non vanno inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni.

Si riportino anche le misure di citotossicità condotte in parallelo per tutte le colture trattate e i controlli negativi nei principali test di aberrazione.

1 dati saranno presentati separatamente per le singole colture e riassunti in tabelle.

Non è necessario verificare le risposte positive inequivocabili. I risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente modificando le condizioni di esperimento. La necessità di confermare i risultati negativi è stata discussa al punto 1.4.3.3. Nei test successivi si dovrebbero modificare i parametri di studio, per estendere la gamma delle condizioni valutate. Fra i parametri di studio modificabili si citano l'intervallo fra i livelli di concentrazione e le condizioni di attivazione metabolica.

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla concentrazione o un aumento riproducibile del numero di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche. Si consideri in primo luogo la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (3) (13). ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

▼B

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza in esame è in grado di inibire processi miratici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi. Un aumento del numero di cellule con cromosomi endoriduplicati può indicare che la sostanza in esame è in grado di inibire il ciclo cellulare (17) (18).

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati palesemente positivi o negativi, ma in alcuni casi i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. 1 risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di aberrazione cromosomica in vitro indicano che la sostanza in esame induce aberrazioni cromosomiche strutturali in colture di cellule somatiche di mammifero. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di test, la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche in colture di cellule somatiche di mammifero.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente,

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota.

Cellule:

— tipo e origine delle cellule,

— caratteristiche del cariotipo e idoneità del tipo di cellula usato,

— assenza di micoplasma, se del caso,

— informazioni sulla durata del ciclo cellulare,

— sesso dei donatori di sangue, sangue intero o linfociti isolati, mitogeno usato,

— eventuale numero di passaggi in coltura, se del caso,

— metodi usati per la conservazione della coltura cellulare, se del caso,

— numero modale dei cromosomi.

Condizioni di esperimento:

— natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione delle cellule,

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, per esempio dati sulla citotossicità e sui limiti di solubilità, se disponibili,

— composizione del terreno di coltura, concentrazione di CO_2 se del caso,

▼B

— concentrazione della sostanza in esame.

— volume del mezzo disperdente e della sostanza in esame aggiunti,

— temperatura di incubazione,

— tempo di incubazione,

— durata del trattamento,

— densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso,

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità.

— controlli positivi e negativi,

— metodi di preparazione dei vetrini,

— criteri di conteggio delle aberrazioni,

— numero di metafasi analizzate,

— metodi di misura della tossicità,

— criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— indizi di tossicità, per esempio grado di confluenza, dati sul ciclo cellulare, conta delle cellule, coefficiente mitotico,

— segni di precipitazione,

— dati sul pH e sull'osmolalità del terreno di trattamento, se determinati,

— definizione delle aberrazioni, compresi i salti,

— numero di cellule con aberrazioni cromosomiche e tipi di aberrazioni, indicati separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo,

— eventuali cambiamenti di ploidia,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— eventuali analisi statistiche,

— dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi paralleli,

— precedenti dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con variazioni, medie e deviazioni standard.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection,* Voi. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) lshidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Ham ster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress* in *Mutation* Research, Voi. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Camion, C, Blooin, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M, Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs. Moke. Mutagen 10* (suppl. 10), pp. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., lshidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 25.7 pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, 1. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation *Res.,* 268, pp. 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for thè Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res.. 113, pp. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tares, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, J. Induction of Chro mosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitro-samine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, Mutation Res., 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chro-mosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.,* 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxi-city Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polvchlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, E. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds). In Vitro Metabolic Activation in *Mutagenesis* Testing, Elsevier. North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L, Kirkland, D. J., Morita. T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromo-somal Aberrations, Mutation Res., 312, pp. 241-261.

(13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analy sis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation *of Mu-tagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., (ed) Cambridge Univer-sity Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res., 312, pp. 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Vola-tile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), Genotoxic *Effects* o/*Airborne* Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P. 0., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental* Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Res., 119, pp. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, j. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer* Res., 43, pp. 1362-1364...

▼B

B.11. MUTAGENICITA — TEST *IN VIVO* DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUL MIDOLLO OSSEO DI MAMMIFERI

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

I testi di aberrazione cromosomica *in vivo* nei mammiferi sono destinati ad individuare aberrazioni cromosomiche strutturali indotte dalla sostanza in esame nelle cellule del midollo osseo di animali, di solito roditori (1) (2) (3) (4). Le aberrazioni cromosomiche strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. Un aumento della poliploidia può significare che una sostanza chimica è in grado di indurre aberrazioni numeriche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni cromatidiche, ma si verificano anche aberrazioni cromosomiche. Le mutazioni cromosomiche e i fenomeni ad esse correlati sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni cromosomiche e fenomeni ad esse correlati, che causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori di tumori, sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane e di quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio.

Per i test si usano solitamente roditori. Il midollo osseo è il tessuto bersaglio, in quanto è altamente vascolarizzato e contiene una popolazione di cellule a ciclo rapido, che possono essere agevolmente isolate e trattate. Altre specie e altri tessuti bersaglio non sono oggetto della presente metodica.

Il test di aberrazione cromosomica è particolarmente idoneo a valutare il rischio mutagenico, in quanto per mette di considerare fattori del metabolismo *in vivo*, aspetti farmacocinetici e processi di riparazione del DNA, che peraltro possono variare in funzione della specie e del tipo di tessuto. Un test *in vivo* è utile anche per verificare l'effetto mutageno rivelato da un test in vitro.

Se è evidente che la sostanza in esame, o un metabolita reattivo, non raggiungono il tessuto bersaglio, il test non è idoneo.

Cfr. anche Introduzione generale parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Aberrazione cromatica: danno strutturale dei cromosomi che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione cromosomica: alterazione cromosomica strutturale, che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16, ... cromatidi.

Gap: lesione acromatica, di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Coefficiente mitotico: numero delle cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule della popolazione: costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caraneristico della specie.

▼B

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè 3n, 4n, ecc).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con perdita di segmenti, riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Gli animali sono esposti alle sostanze in esame per una via adeguata e vengono quindi sacrificati a tempo debito, dopo somministrazione di un inibitore della metafase (per esempio colchicina o Colcemid[05]). Sono poi approntate e sottoposte a un processo di colorazione le preparazioni cromosomiche delle cellule di midollo osseo, e se ne analizzano le cellule in metafase per determinare le aberrazioni cromosomiche.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Scelta delle specie animali*

Ratti, topi e criceti cinesi sono gli animali più comunemente usati, ma si può usare qualsiasi specie adeguata di mammifero. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare il ±20 % del peso medio per sesso.

1.4.1.2. *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani sono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4. *Preparazione delle dosi*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento degli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

11 solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilita. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

▼B

1.4.2.2. *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/-mezzo disperdente), trattati in parallelo per ciascun sesso. Gli animali dei gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame,

I controlli positivi dovrebbero indurre aberrazioni strutturali *in vivo* a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. E ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame ed e sufficiente un solo prelievo per campione. È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	N. CAS	N. Einecs
Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
Etilnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfammide Ciclofosfammide monoidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenmelammina	51-18-3	200-083-5

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dati precedenti dimostrino che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con aberrazioni cromosomiche sono accettabili. Se per i controlli negativi si procede ad un solo campionamento, il momento più adeguato è quello del primo prelievo. Si ricorra anche a controlli negativi non trattati, salvo che dati precedenti dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Numero e sesso degli animali**

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 animali analizzabili per sesso. Se al momento della sperimentazione sono disponibili dati relativi a sperimentazioni sulla stessa specie, con la medesima via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare i test su un solo sesso. Qualora l'esposizione umana alle sostanze chimiche sia specifica per un sesso, come per esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, i test devono essere eseguiti su animali di tale sesso.

1.5.2. **Protocollo di trattamento**

Le sostanze in esame sono somministrate di preferenza in un'unica dose. Possono essere somministrate anche in dosi frazionate, per esempio in due dosi nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo, per agevolare la somministrazione, trattandosi di dosi di volume elevato. Se si usa una posologia diversa, se ne fornisca la motivazione scientifica.

▼B

Dopo il trattamento si proceda al prelievo dei campioni in due momenti diversi dello stesso giorno. Per i roditori il primo prelievo dopo il trattamento è effettuato quando sia trascorso un periodo equivalente ad una volta e mezza la durata del ciclo cellulare (che è di norma di 12-18 ore). Poiché il tempo necessario affinché la sostanza in esame sia assorbita e metabolizzata e produca effetti sulla cinetica del ciclo cellulare può influire sul momento ottimale per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche, si raccomanda di prelevare un altro campione 24 ore dopo. Se il protocollo di trattamento è più lungo di un giorno, si proceda ad un unico campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente ad una volta e mezza la durata normale del ciclo cellulare dopo l'ultima somministrazione.

Prima di sacrificare gli animali si inietti per via interperitoneale una dose adeguata di un inibitore della meta-fase (per esempio Colcemid® o colchicina). Gi animali saranno quindi sacrificati dopo un adeguato lasso di tempo: 3-5 ore circa per i topi, 4-5 ore circa per i criceti cinesi. Si prelevino quindi le necessarie cellule del midollo osseo e si rilevino le aberrazioni cromosomiche.

1.5.3. **Dosi**

Se si procede a uno studio per individuare l'intervallo di dosi, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie, ceppo e sesso, con il medesimo protocollo usato nel test principale (5). In caso di tossicità si usino per la prima fase di campionamento tre dosi diverse, che vadano dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Sostanze con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo (per esempio una riduzione del coefficiente mitotico superiore al 50 %).

1.5.4. **Saggio con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2 000 mg per kg di peso corporeo in dose unica o in due dosi nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Per studi di maggiore durata la dose limite è pari a 2 000 mg/kg di peso corporeo al giorno, da somministrare per 14 giorni al massimo; è pari a 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno per un trattamento più lungo. Sulla base della esposizione umana prevista per la sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5. **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in un'unica volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

▼B

1.5.6. **Preparazione dei cromosomi**

Non appena l'animale è stato sacrificato, si prelevi il midollo osseo, lo si esponga ad una soluzione ipotonica e lo si fissi. Le cellule siano poi poste su vetrini e sottoposte a un processo di colorazione.

1.5.7. **Analisi**

Si determini il coefficiente mitotico come misura della citotossicità in almeno 1 000 cellule per animale, in tutti gli animali trattati (compresi i controlli positivi) e nei controlli negativi, non trattati.

Per ogni animale si analizzino almeno 100 cellule. Tale numero può essere ridotto qualora si rilevi un alto numero di aberrazioni. Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la rottura di un parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule trattate devono contenere un numero di centromeri pari a $2n \pm 2$.

2. **RISULTATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati relativi ai singoli animali vanno presentati in forma di tabelle. L'unità sperimentale è l'animale. Per ciascun animale si indichi il numero di cellule analizzate e si valuti il numero di aberrazioni per cellula e la percentuale di cellule con una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Per i gruppi di trattamento e di controllo si elenchino i vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, il loro numero e la loro frequenza. I gap devono essere registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati relativi ai due sessi possono essere combinati nell'analisi statistica.

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento del numero relativo di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche, correlato alla dose somministrata, o un palese aumento del numero di cellule con aberrazioni nei campioni, prelevati alla stessa fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose della sostanza in esame. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (6), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni sperimentali modificate.

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza in esame è in grado di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi. Un aumento del numero di cellule che presentano endoriduplicazione può significare che la sostanza in esame è in grado di inibire il ciclo cellulare (7) (8).

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

▼B

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di aberrazione cromosomica *in vivo* indicano che una sostanza induce aberrazioni cromosomiche nel midollo osseo della specie usata per i test. Risultati negativi indicano che nelle condizioni di test la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche nel midollo osseo della specie usata per i test.

Si vaglino le probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti entrino in circolo o specificamente raggiungano il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente,

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo usato,

— numero, età e sesso degli animali,

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc,

— peso dei singoli animali all'inizio degli esperimenti, con range, valore medio e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni di esperimento:

— controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente),

— risultati dello studio per individuare l'intervallo di dosi, se effettuato.,

— criteri di selezione delle dosi,

— illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame,

— illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame,

— metodi di misura della tossicità,

— criteri di selezione della via di somministrazione,

— metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto bersaglio, se del caso,

— conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso,

— dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua,

— descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e di campionamento,

▼B

— natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata del trattamento,

— metodi di preparazione dei vetrini,

— criteri di conteggio delle aberrazioni,

— numero di cellule analizzate per animale,

— criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— segni di tossicità,

— coefficiente mitotico,

— tipo e numero delle aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale,

— numero totale delle aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard,

— numero di cellule che presentano aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard,

— eventuali cambiamenti del numero cromosomico,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— eventuali analisi statistiche,

— dati sui controlli negativi paralleli,

— dati sui controlli negativi precedenti, con range, medie e deviazioni standard,

— dati sui controlli positivi paralleli.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* S. Venitt and J. M. Parry (eds.). 1RL Press, Oxford, Washington D. C., 275-306.

(2) Preston, R. J,, Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H,, McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation* Res., 189, 157-165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part 1 revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R, Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation R*es., 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D.]., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*. *7,* pp. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res*. 119, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, pp. 1363-1364.

▼B

B.12. MUTAGENICITÀ — TEST *IN VIVO* SUI MICRONUCLEI NEGLI ERITROCITI DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

Il test *in vivo* sui micronuclei dei mammiferi è usato per individuare i danni indotti dalla sostanza in esame ai cromosomi o all'apparato mitotico degli eritroblasti; si effettua analizzando gli eritrociti provenienti dal midollo osseo e/o dalle cellule del sangue periferico di animali, di norma roditori.

È destinato a identificare sostanze che provocano danni citogenetici, che si manifestano nella formazione di micronuclei contenenti frammenti di cromosomi o cromosomi interi.

Quando da un eritroblasto del midollo osseo si sviluppa un eritrocita policromatico, il nucleo principale viene espulso; i micronuclei formatisi possono rimanere nel citoplasma che non contiene più il nucleo principale, cosa che rende più agevole la visualizzazione dei micronuclei. L'aumento della frequenza di eritrociti policromatici contenenti micronuclei negli animali trattati è un'indicazione di danno cromosomico indotto.

In questo test si usa solitamente il midollo osseo di roditori: il midollo osseo è il tessuto in cui sono prodotti gli eritrociti policromatici. Il conteggio degli eritrociti immaturi (policromatici) contenenti micronuclei nel sangue periferico è ugualmente accettabile nelle specie in cui è stata provata l'incapacità della milza di svolgere la funzione emocatecretica sugli eritrociti contenenti micronuclei o che sia risultata particolarmente sensibile per l'individuazione di agenti che provocano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche. Per distinguere i micronuclei si possono usare vari criteri, tra cui la presenza o l'assenza del cinetocore, o del centromero, nei micronuclei. L'elemento conclusivo è la frequenza degli eritrociti immaturi (policromatici) contenenti micronuclei. Quando gli animali vengono trattati in continuo per quattro settimane o più, come elemento conclusivo si può usare anche la percentuale di eritrociti maturi (ortocromatici) del sangue periferico che contengono micronuclei.

L'esame dei micronuclei dei mammiferi *in vivo* è particolarmente idoneo a valutare il rischio mutagenico, in quanto permette di prendere in considerazione elementi del metabolismo, della farmacocinetica e dei processi di riparazione del DNA *in vivo*, anche se questi possono variare in funzione della specie, dei tessuti e dell'effetto genetico indagato. 1 test *in vivo* sono utili anche ad approfondire gli studi di un effetto mutagenico rilevato in vitro.

Qualora risulti che la sostanza in esame, o un suo metabolita reattivo, non raggiungono il tessuto bersaglio, il test non è adeguato.

Cfr. anche Introduzione generale, parte B.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Centromero (cinetocoro): regione/i di un cromosoma sede di attacco del fuso durante la divisione cellulare, che permette il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Micronuclei: piccoli nuclei sovrannumerari, separati dal nucleo principale delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi (meiosi) da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

Eritrocita ortocromatico: eritrocita maturo in cui mancano i ribosomi, che può essere distinto dagli eritrociti policromatici immaturi mediante coloranti selettivi per i ribosomi.

Eritrocita policromatico: eritrocita immaturo, in uno stadio di sviluppo intermedio, che contiene ancora ribosomi e che pertanto può essere distinto dagli eritrociti ortocromatici maturi mediante coloranti selettivi per i ribosomi.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Gli animali sono esposti alla sostanza in esame tramite una via adeguata. Se si utilizza il midollo osseo, gli animali sono sacrificati a tempo debito dopo il trattamento; il midollo osseo viene quindi prelevato, preparato e colorato (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Se si utilizza sangue periferico, questo viene raccolto a tempo debito dopo il trattamento, si preparano quindi gli strisci e si colorano (4) (8) (9) (10). Per i test eseguiti con sangue periferico l'intervallo fra l'ultima esposizione della sostanza e la raccolta delle cellule dovrebbe essere minimo. Si individuano quindi i micronuclei nei preparati.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Scelta delle specie animali*

Se si usa il midollo osseo si raccomanda di servirsi di topi o ratti, benché si possa usare qualsiasi specie adeguata di mammifero. Se si usa il sangue periferico si raccomanda di servirsi di topi, ma si può utilizzare qualsiasi specie adeguata di mammifero, purché sia una specie in cui la milza non espleta la funzione emocateretica sugli eritrociti micronucleati e che si è rivelata sufficientemente sensibile per l'individuazione degli agenti che causano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche. Si scelgano individui giovani e in buona salute provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dell'esperimento le variazioni di peso fra gli animali devono essere minime: non possono superare il 20 % del peso medio per sesso.

1.4.1.2. *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B: l'umidità ideale è pari al 50-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4. *Sostanza in esame/Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento degli animali. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

1.4.2.2. *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/-mezzo disperdente), trattati in parallelo per ciascun sesso. Gli animali dei due gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi dovrebbero produrre micronuclei *in vivo* a livelli di esposizione che provocano un aumento rilevabile rispetto alla media. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame ed è sufficiente un solo prelievo per campione. È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	N: CAS	N. Einecs
Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
N-ethil-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfammide Ciclofosfammide monoidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenmelammina	51-18-3	200-083-5

▼B

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dai dati precedenti risulti che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con micronuclei sono accettabili. Se per i controlli negativi si procede ad un solo campionamento, lo si effettui al momento del primo prelievo. Si ricorra anche a controlli negativi non trattati, salvo che dati precedenti dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

Se si usa sangue periferico come controllo negativo parallelo è ammissibile anche un campione prelevato prima del trattamento, solo però negli studi brevi sul sangue periferico (che vanno per esempio da 1 a 3 somministrazioni), qualora i dati ottenuti rientrino nel range previsto in letteratura.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Numero e sesso degli animali**

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 animali analizzabili per sesso (11). Se al momento della sperimentazione sono disponibili dati relativi a sperimentazioni sulla stessa specie e con la medesima via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare i test su un unico sesso. Qualora l'esposizione umana alle sostanze chimiche sia specifica per un sesso, come per esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, i test devono essere eseguiti su animali di tale sesso.

1.5.2. **Protocollo di trattamento**

Non si può raccomandare un protocollo standard (cioè 1, 2 o più somministrazioni a intervalli di 24 ore). I campioni ottenuti dopo somministrazione protratta sono accettabili purché sia comprovato un effetto positivo o, per uno studio negativo, ne sia stata dimostrata la tossicità o sia stata usata la dose limite, continuando la somministrazione fino al prelievo dei campioni. La sostanza in esame può essere somministrata anche in dosi frazionate, per esempio a due riprese nello stesso giorno, a intervalli non superiori a qualche ora, per agevolarne la somministrazione, trattandosi di un prodotto di grande volume.

Il test può essere eseguito in due modi:

(a) la sostanza è somministrata agli animali in un'unica dose. Sono prelevati campioni di midollo osseo almeno due volte, ad adeguati intervalli, la prima volta almeno 24 ore dopo il trattamento, l'ultima non dopo 48 ore. Se il prelievo è effettuato meno di 24 ore dopo la somministrazione se ne fornisca la ragione. I campioni di sangue periferico vanno prelevati almeno due volte, ad adeguati intervalli, la prima volta almeno 36 ore dopo la somministrazione, l'ultima non dopo 72 ore. Quando in una delle fasi si abbia una risposta positiva non è necessario procedere ad altri prelievi;

▼B

(b) se si procede a due o più somministrazioni giornaliere (per esempio due o più somministrazioni ad intervalli di 24 ore), i campioni vanno prelevati un'unica volta, fra le 18 e le 24 ore dopo l'ultima somministrazione per il midollo osseo e tra le 36 e le 48 ore dopo l'ultima somministrazione per il sangue periferico (12).

Se del caso, possono essere effettuati ulteriori campionamenti.

1.5.3. **Dosi**

Se si procede a uno studio per individuare l'intervallo di dosi, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie, ceppo e sesso, con il medesimo protocollo usato nel test principale (13). In caso di tossicità si usino per la prima fase di campionamento tre dosi diverse, che vanno dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Sostanze con azione biologica specifica, non tossiche a dosi basse (come ormoni e mitogeni) possono costituire un'eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo (per esempio una riduzione della percentuale di eritrociti immaturi nel midollo osseo o nel sangue periferico).

1.5.4. **Test con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2 000 mg per kg di peso corporeo in dose unica o in due dosi nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Per studi di maggiore durata la dose limite è pari a 2 000 mg/kg di peso corporeo al giorno, da somministrare per 14 giorni al massimo; per un trattamento più lungo è pari a 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Sulla base della esposizione umana prevista per la sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5. **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

▼B

1.5.6. **Preparazione di midollo osseo/sangue**

Le cellule del midollo osseo vengono di solito prelevate dal femore o dalla tibia immediatamente dopo che l'animale è stato sacrificato. Le cellule sono prelevate, preparate e sottoposte a un processo di colorazione con metodi di accertata validità. Il sangue periferico è prelevato dalla vena caudale o da altro vaso sanguigno adeguato. Le cellule ematiche vengono immediatamente sottoposte a un processo di colorazione in condizioni sopravitali (8) (9) (10), oppure si preparano strisci che sono poi colorati. L'uso di un colorante specifico per il DNA [per esempio arancio acridina (14) o Hoechst 33258 più pironina-Y (15)] può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Ciò non esclude l'uso di coloranti convenzionali (per esempio Giemsa). Si possono usare anche altri sistemi [per esempio colonne di cellulosa per la rimozione delle cellule nucleate (16)], se ne è provata l'efficacia per la preparazione dei micronuclei in laboratorio.

1.5.7. **Analisi**

La percentuale degli eritrociti immaturi rispetto al totale (immaturi + maturi) viene determinata per ciascun animale contando in tutto almeno 200 eritrociti per il midollo osseo e 1 000 per il sangue periferico (17). Tutti i vetrini, compresi i controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Si esaminino almeno 2 000 eritrociti immaturi per animale per determinare la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati. Informazioni ulteriori si possono ottenere dal conteggio dei micronuclei negli eritrociti maturi. Nell'analisi dei vetrini, la proporzione degli eritrociti immaturi sugli eritrociti totali non deve essere inferiore al 20 % del valore dei controlli. Quando gli animali sono trattati in continuo per 4 settimane o più, si può anche determinare la frequenza degli eritrociti con micronuclei su almeno 2 000 eritrociti maturi per animale. In alternativa alle tecniche manuali, si possono accettare sistemi di analisi automatica (analisi dell'immagine e citometria a flusso continuo su cellule in sospensione), se adeguatamente motivati e di provata efficacia.

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. L'unità sperimentale è l'animale. Il numero degli eritrociti immaturi e degli di eritrociti immaturi con micronuclei, nonché la percentuale degli eritrociti immaturi, devono essere elencati separatamente per ciascun animale. Quando gli animali sono trattati in continuo per 4 settimane o più, si forniscano anche i dati relativi agli eritrociti maturi, se sono stati rilevati. Si indichi per ciascun animale la percentuale degli eritrociti immaturi sul totale e, se ritenuta utile, la percentuale degli eritrociti micronucleati. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati dei due sessi possono essere combinati nell'analisi statistica.

▼B

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla dose somministrata del numero di cellule contenenti micronuclei, o un evidente aumento del numero di cellule contenenti micronuclei nei campioni prelevati alla medesima fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (18) (19), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni sperimentali modificate.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio significano che la sostanza induce la formazione di micronuclei, che sono il risultato di un danno cromosomico o di un danno all'apparato mitotico negli eritroblasti della specie in esame. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di esperimento, la sostanza in esame non produce micronuclei negli eritrociti immaturi della specie in esame.

Si vagli la possibilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti entrino in circolo o raggiungano specifica-mente il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione deve comprendere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente,

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se noto.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo usato,

— numero, età e sesso degli animali,

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio degli esperimenti, con range, valore medio e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni di esperimento:

— controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente),

— risultati dello studio per individuare l'intervallo di dosi, se effettuato,

▼B

— criteri di selezione delle dosi,

— illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame,

— illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame,

— criteri di selezione della via di somministrazione,

— metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto ber saglio, se del caso,

— conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso,

— dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua,

— descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento,

— metodi di preparazione dei vetrini,

— metodi di misura della tossicità,

— criteri di conteggio degli eritrociti immaturi contenenti micronuclei,

— numero di cellule analizzate per animale,

— criteri in base a cui i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— segni di tossicità,

— proporzione degli eritrociti immaturi sugli eritrociti totali,

— numero di eritrociti immaturi contenenti micronuclei per animale,

— media ± deviazione standard degli eritrociti immaturi contenenti micronuclei per gruppo,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— analisi statistiche e metodi applicati,

— controlli negativi paralleli e in letteratura,

— controlli positivi paralleli.

— Discussione dei risultati.

— Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In* Vivo Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mutation *Res.,* 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: Developments *in Science and Practice of Toxicology,* ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amster dam, pp., 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, Mutation Res., 189, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronu cleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res., 245. pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for thè Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peri pheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Col laborative Study by CSGMT/-JEMMS, MMS, *Mutation Res., 278,* pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-terni mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), In Vivo, Rodent Ery- throcyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.,* 312, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S, (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 313-319.

(13) Fielder, R.)., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe,]., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Res., 120, pp, 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 213, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 347, pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic* Mutagenicity tests. UKEMS *Recommended Procedures, UK.EMS* Sub-Committee *on* Guidelines *for Mutagenicity Testing.* Report, Part I, *revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Pap- worth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kir- kland (ed.), .Statistical Evaluation *of Mutagenicity Test Data. UKEMS* Sub-Committee on *Guidelines for Mutagenicity Testing.* Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. **MUTAGENICITÀ — TEST DI REVERSIONE SU BATTERI**

1. **METODO**

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

I1 saggio di retromutazione su batteri utilizza ceppi di Salmonella typhimurium e Escherichia coli auxotrofi nei confronti di un amminoacido per identificare mutazioni puntiformi che implicano sostituzione, addizione o delezione di una o più paia di basi del DNA (1) (2) (3). Il principio su cui è basato questo saggio è la sua capacità di rivelare, nei ceppi sperimentali, retromutazioni che ripristinano la capacità funzionale dei batteri di sintetizzare un amminoacido essenziale. I batteri retromutanti sono individuati in base alia capacità di crescere in assenza dell'amminoacido di cui ha invece bisogno il ceppo sperimentale progenitore.

Le mutazioni puntiformi sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni puntiformi in oncogeni e geni soppresori dei tumori di cellule somatiche sono implicate nella comparsa delle neoplasie umane come in quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio. Il saggio di retro-mutazione batterica è rapido, poco costoso e relativamente facile da eseguire. Molti ceppi sperimentali presentano caratteristiche che le rendono più sensibili per l'identificazione di mutazioni, in particolare sequenze di DNA sensibili nei siti di reversione, maggior permeabilità cellulare per le grandi molecole e assenza dei sistemi di riparazione del DNA, o rafforzamento dei sistemi soggetti a errore. La specificità dei ceppi sperimentali può fornire informazioni utili sul tipo di mutazioni indotte da agenti genotossici. Per i testi di retromutazione batterica esiste una vastissima base dati, che contiene i risultati per una grande varietà di strutture e sono stati sviluppati metodi ormai classici per l'analisi chimica di prodotti con proprietà chimico-fisiche diverse, compresi i composti volatili.

Vedi anche introduzione generale parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Un test di reversione in Salmonella typhimurium o Escherichia coli rivela in un ceppo auxotrofo, che necessita l'apporto di un amminoacido (rispettivamente istidina o triptofano), una mutazione che lo trasforma in un ceppo che non necessita l'apporto dell'amminoacido.

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi sono agenti che provocano un cambiamento di basi nel DNA. In un test di reversione questo cambiamento può verificarsi nel sito della mutazione originale o in un altro sito del genoma batterico.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura sono agenti che provocano l'inserzione o la delezione di una o più basi nel DNA, modificando cosi la fase di lettura nell'RNA.

▼B

1.3. CONSIDERAZIONI INIZIALI

Nel saggio di reversione batterica si usano cellule procariote, che differiscono dalle cellule dei mammiferi in fattori come l'assorbimento, il metabolismo, la struttura cromosomica e i meccanismi di riparazione del DNA. I test in vitro richiedono in genere una fonte esogena di attivazione metabolica, i sistemi di attivazione metabolica in vitro non sono in grado di simulare perfettamente le condizioni *in vivo* nei mammiferi. Il test, pertanto, non fornisce informazioni dirette sul potenziale mutageno e cancerogeno di una sostanza nei mammiferi.

Il saggio di reversione batterica è comunemente impiegato come prima tappa per individuare l'azione genotossica e, in particolare, la capacità di indurre mutazioni puntiformi. Numerosi dati dimostrano che molte sostanze chimiche che risultano positive a questo saggio presentano attività mutagena anche in altri test. Vi sono esempi di agenti mutageni che non sono rivelati da questo test; le ragioni di questi insuccessi possono essere ricondotte alla natura specifica della mutazione, a differenze di attivazione metabolica o a differenze di biodisponibilità. D'altra parte, i fattori che aumentano la sensibilità del test possono indurre a sopravvalutare l'azione mutagena.

Il test di retromutazione batterica può non essere adatto per la valutazione di alcune classi di sostanze chimiche, per esempio i composti fortemente battericidi (come alcuni antibiotici) e quelli di cui si suppone (o si sa) che interferiscano specificamente con il sistema di moltiplicazione cellulare nei mammiferi (per esempio, alcuni inibitori delle topoisomerasi e alcuni analoghi di nucleosidi). In tali casi possono essere più adeguati test su mammiferi.

Molti composti che risultano positivi al test sono cancerogeni nei mammiferi, tuttavia la correlazione non è assoluta: dipende dalla classe chimica. Inoltre vi sono cancerogeni che non sono rivelati da questo saggio, perché agiscono con meccanismi diversi, non genotossici, o con meccanismi assenti nelle cellule batteriche.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Le cellule batteriche in sospensione sono esposte alla sostanza in esame in presenza e in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica. Nel metodo di incorporazione su piastra, tali sospensioni sono miscelate con un agar di copertura e piastrate immediatamente su terreno minimo. Nel metodo di preincubazione, il composto di trattamento è posto in incubazione, mescolato ad un agar di copertura, poi piastrato su terreno minimo. In entrambe le tecniche, dopo due o tre giorni di incubazione si contano le colonie revertanti e se ne confronta il numero con quello delle colonie revertanti spontanee su piastre di controllo esposte al solo solvente.

Per i test di reversione batterica sono state descritte varie procedure. Quelle più comunemente usate sono: il metodo di incorporazione su piastra (1) (2) (3) (4), il metodo di preincubazione (2) (3) (5) (6) (7) (8), il metodo di fluttuazione (9) (10) e il metodo di sospensione (11). Sono state descritte modifiche per i test su gas o vapori (12).

▼B

Le procedure descritte riguardano principalmente i metodi di incorporazione su piastra e di preincubazione. Sono entrambi ammissibili per l'esecuzione di esperimenti con e senza attivazione metabolica. Per alcune sostanze è più efficace il metodo di preincubazione. Si tratta di sostanze appartenenti alle classi chimiche che includono le nitrosammine alifatiche a catena corta, i metalli bivalenti, a aldeidi, i coloranti azoici e i composti diazoici, gli alcaloidi pirollizidinici, i composti allilici e i nitrocomposti (3). È noto anche che alcune classi di mutageni non sono sempre identificabili con procedure standard come il metodo di incorporazione su piastra o il metodo di preincubazione. Devono essere considerate «casi speciali» e si raccomanda vivamente di usare altri metodi di rilevazione. Sono stati identificati i seguenti «casi speciali» (con esempi di possibili metodi di rilevazione): coloranti azoici e composti diazoici (3) (5) (6) (13), gas e sostanze chimiche volatili (12) (14) (15) (16) e glicosidi (17) (18). Le deviazioni dalla procedura standard devono essere scientificamente motivate.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO

1.5.1. **Preparazioni**

1.5.1.1. *Butteri*

Si lascino sviluppare le colture fresche di batteri fino alla fase esponenziale tardiva o alla fase stazionaria precoce (approssimativamente 10^9 cellule per ml). Non si usino colture in fase stazionaria tardiva. E essenziale che le colture usate nell'esperimento contengano un titolo elevato di batteri vitali. Il titolo può essere provato sulla base di dati di controllo precedenti sulle curve di crescita, oppure, nei singoli saggi, determinando il numero di cellule vitali mediante un test di piastramento.

La temperatura di incubazione raccomandata è di 37 °C.

Si usino almeno cinque ceppi di batteri, tra cui quattro ceppi di S. typhimurium (TA 1535; TA 1537 o TA97a o TA97; TA98; e TA100) la cui affidabilità è provata e che forniscono risposte riproducibili. I ceppi di S. typhimurium contengono paia di basi GC sul sito di reversione primario ed è noto che non permettono di identificare alcuni mutageni ossidanti, agenti che provocano cross-linking e idrazine. Tali sostanze possono essere individuate con ceppi di E. coli YVP2 o da S. typhimurium TA102 (19) che hanno una coppia di basi AT sul sito di reversione primaria. La combinazione di ceppi raccomandata è pertanto:

— S. typhimurium TA1535, e

— S. typhimurium TA1537 o TA97 o TA97a, e

— S. typhimurium TA98, e

— S. typhimurium TA100, e

— E. coli WP2 uvrA. o E. coli WP2 uvtA (pKM101), o S. typhimurium Ta102.

Al fine di rilevare mutageni che provocano cross-linking, può essere preferibile includere TA102 o aggiungere un ceppo di E. coli con sistema di riparazione del DNA privo di errore [per esempio, E. coli WP2 o E. Coli WP2 (pKM101)]

▼B

Si usino metodi di provata validità per la preparazione delle colture primarie, la verifica dei marcatori e la conservazione. La necessità dell'amminioacido in supplemento nutritivo per la crescita deve essere dimostrata per ciascuna delle colture congelate (istidina per ceppi di S. typhimurium, e triptofano per ceppi di E. coli). Si controllino anche altre caratteristiche fenotipiche, e cioè: la presenza o l'assenza di plasmidi R [resistenza all'ampicillina nei ceppi TA98, TA100 e TA97a o TA97, WP2 uvtA e WP2 uvrA (pKM101), e resistenza a ampicillina + tetraciclina nel ceppo TA102], se del caso; la presenza di mutazioni caratteristiche (cioè la mutazione rfa in S. typhimurium attraverso la sensibilità al cristalvioletto e la mutazione uvtA in E. coli o la mutazione uvtB in S. typhimurium, attraverso la sensibilità all'ultravioletto) (2) (3). I ceppi devono produrre un certo numero di colonie retromutanti spontanee per piastra, situato entro il range di frequenze rapportato ai valori precedenti ottenuti nel laboratorio e, possibilmente, ai valori del range riportati in letteratura.

1.5.1.2. *Terreno di coltura*

Si usi una minima quantità di agar adeguato (per esempio contenente una minima quantità di terreno E di Vogel-Bonner e glucosio) e un agar di copertura contenente istidina e biotina o triptofano, tale da permettere un certo numero di divisioni cellulari (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Attivazione metabolica*

i batteri dovrebbero essere esposti alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (1) (2), o una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (18) (20) (21). La frazione post-mitocondriale viene usata di solito a concentrazioni comprese fra 5 e 30 % v/v nel composto S9. La scelta e le condizione di un sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare più di una concentrazione della frazione post-mitocondriale. Per coloranti azoici e composti diazoici, può essere più adeguato un sistema di attivazione metabolica riduttivo (6) (13).

1.5.1.4. *Sostanza in esame/Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento dei batteri. Le sostanze liquide possono essere aggiunte diretta-mente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità, che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Il solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza dei batteri e con l'attività di S9 (22). L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Se si procede all'esame di sostanze instabili in acqua, si usino solventi organici anidri.

▼B

1.5.2. **Condizioni di esperimento**

1.5.2.1. *Ceppi sottoposti a test (vedi 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentrazione di esposizione*

l criteri da considerare per determinare la quantità massima di sostanza da usare sono la citotossicità e la solubilità nel composto di trattamento finale.

Può essere utile determinare la tossicità e l'insolubilità in un esperimento preliminare. La citotossicità può essere rivelata da una riduzione del numero di colonie revertanti, dalla comparsa di una crescita anormale del fondo, o dal grado di sopravvivenza delle colture trattate. La citotossicità di una sostanza può risultare alterata in presenza di sistemi di attivazione metabolica. L'insolubilità è dimostrata dalla presenza di un precipitato nel composto finale, visibile ad occhio nudo nelle condizioni di esperimento effettive.

La concentrazione massima raccomandata per sostanze non citotossiche solubili è di 5 mg/piastra o 5 µl/piastra. Per sostanze non citotossiche insolubili a 5 mg/piastra o 5 pi/piastra, una o più concentrazioni devono essere insolubili nelle ultime miscele di trattamento. Le sostanze citotossiche a concentrazione inferiori a 5 mg/-piastra o 5 µl/piastra devono essere saggiate fino ad una concentrazione citotossica. Il precipitato non deve interferire con la valutazione dei risultati.

Si usino almeno cinque diverse concentrazioni analizzabili della sostanza in esame, ad intervalli approssimativamente semilogaritmici (cioè 10) per i primi esperimenti. Per l'analisi della relazione concentrazione-rispo-sta, può essere necessario ridurre gli intervalli. Nella valutazione di sostanze che contengono quantità sostanziali di impurezza potenzialmente mutagene si possono prendere in considerazione concentrazioni superiori a 5 mg/piastra o 5 (il/piastra.

1.5.2.3. *Controlli negativi e positivi*

Ogni test dovrà comportare controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) paralleli, con e senza attivazione metabolica. Per i controlli positivi, si scelgano concentrazioni che dimostrino la validità di ogni test.

Quando si usa un sistema di attivazione metabolica, le sostanze per i controlli positivi di riferimento devono essere scelte in funzione del tipo di ceppo batterico.

Le seguenti sostanze sono esempi di controlli positivi adatti per saggi con attivazione metabolica:

Denominazione	Numero CAS	Numero Einecs
9,10-dimetilanthracene	781-43-1	212-308-4
7,1 2-dimetilbenz[a]antracene	57-97-6	200-359-5
3enzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5
2-amminoantracene	613-13-8	210-330-9

▼B

Denominazione	Numero CAS	Numero Einecs
ciclofosfammide	50-18-0	
ciclofosfammide monoidrato	6055-19-2	200-015-4

Le seguente sostanza è un controllo positivo adatto per il metodo di attivazione metabolica riduttiva:

Denominazione	Numero CAS	Numero Einecs
Congo Red	573-58-0	209-358-4

Il 2-amminoantracene non dovrebbe essere usato come unico indicatore dell'efficacia del composto S9. Se si usa il 2-amminoantracene, si caratterizzi ogni lotto di S9 anche con un mutageno che richiede attivazione metabolica da parte di enzimi microsomiali, per esempio benzo[a]pirene. dimetilbenzantracene.

Le seguenti sostanze sono esempi di controlli positivi a specificità di ceppo per esperimenti eseguiti senza sistema di attivazione metabolica esogeno:

Denominazione	Numero CAS	Numero Einecs	Ceppo
sodio azide	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 e TA 100
2-nitrofluorene	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-amminoacridina	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 e TA 97a
1CR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 e TA 97a
idroperossido di cumene	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicina C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA e TA 102
N-ethil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA e-WP2uvrA(pKM101)
4-nitrochinolina-l-ossido	56-57-5	200-281-1	WP2. WP2uvrA e-WP2uvrA(pKM101)
furilfurammide (AF2)	3688-53-7		ceppi contenenti plasmidi

Si possono usare altre adeguate sostanze di riferimento per i controlli positivi. Si usino, se disponibili, sostanze di una classe chimica correlata.

Si effettuino anche controlli negativi, usando solo il solvente o il mezzo disperdente sul terreno di coltura: i controlli vanno trattati come le colture che contengono la sostanza oggetto del test. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che esistano precedenti dati di controllo che dimostrano che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

▼B

1.5.3. **Procedura**

Per il metodo di incorporazione su piastra (1) (2) (3) (4), senza attivazione metabolica, di norma si mescolano 0,05 ml o 0,1 ml della soluzione, 0,1 ml di coltura batterica fresca (contenente approssimativamente 10^8 cellule vitali) e 0,5 ml di tampone sterile con 2,0 ml di agar di copertura. Per i test con attivazione metabolica, si mescolano di norma 0,5 ml del composto di attivazione metabolica contenente una quantità adeguata di frazione post-mitocondriale (dal 5 al 30 % v/v) von l'agar di copertura (2,0 ml), i batteri e la sostanza in esame o la soluzione. Il contenuto di ciascuna provetta viene mescolato e piastrato su terreno minimo (agar). Prima dell'incubazione si lascia solidificare l'agar di copertura.

Per il metodo di preincubazione (2) (3) (5) (6), la sostanza in esame/-soluzione è preincubata con il ceppo batterico (contenente approssimativamente 10^8 cellule vitali) e con un tampone sterile o con il sistema di attivazione metabolica (0,5 ml), di norma per 20 minuti o più, a 30-37 °C: è quindi mescolata all'agar di copertura e piastrata su terreno minimo (agar). Di norma si mescolano 0,05 o 0,1 ml di sostanza in esame/soluzione, 0,1 ml di batteri e 0,5 ml di composto S9 o di tampone sterile con 2,0 ml di agar di copertura. Durante la preincubazione le provette vanno aerate con un agitatore.

Per una valida stima della variazione, si usino piastre in triplo a ciascuna dose. L'uso di piastre in doppio è accettabile se scientificamente motivato. La perdita occasionale di una piastra non invalida necessariamente il test.

I test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti ermetici (12) (14) *(15)* (16).

1.5.4. **Incubazione**

Tutte le piastre di un esperimento devono essere poste in incubazione a 37 °C per 48-72 ore; si rilevi quindi il numero di colonie revertanti per piastra.

2. **RISULTATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati devono essere presentati come numero di colonie revertanti per piastra. Si fornisca anche il numero di colonie revertanti sulle piastre dei controlli negativi (controllo trattato con solo solvente e controllo non trattato, se effettuato) e positivi. Per la sostanza in esame e per i controlli, positivi e negativi (non trattati o con solo solvente), si indichino le cifre per le singole piastre, il numero medio di colonie revertanti per piastra e la deviazione standard.

In caso di risposta inequivocabilmente positiva non sono necessarie verifiche. I risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate. I riusultati negativi devono essere confermati caso per caso. Se non si ritiene necessaria la conferma dei risultati negativi, se ne indichino le ragioni. Nei test successivi si dovrebbero modificare i parametri di studio per estendere la gamma delle condizioni in esame. Fra i parametri modificabili si citano l'intervallo tra le concentrazioni, il metodo di trattamento (incorporazione su piastra o preincubazione in ambiente liquido) e le condizioni di attivazione metabolica.

▼B

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento, correlato con la concentrazione, per tutte le concentrazioni sottoposte a esame e/o un aumento riproducibile, ad una o più concentrazioni, del numero di colonie revertanti per piastra per almeno un ceppo, con o senza sistema di attivazione metabolica (23). Si consideri in primo luogo la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (24), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati palesemente positivi o negativi, ma in alcuni casi i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui, nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di retromutazione batterica dimostrano che la sostanza induce mutazioni puntiformi per sostituzioni di basi o mutazione della fase di lettura nel genoma di Salmonella typhimurium o Escherichia coli. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di test, la sostanza in esame non induce mutazioni nella specie sottoposta al test.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota.

Ceppi:

— ceppi usati:

— numero per cellule per coltura:

— caratteristiche dei ceppi.

Condizioni di esperimento:

— quantità della sostanza in esame per piastra (mg/piastra o (µl/-piastra/e criteri di selezione della concentrazione e del numero di piastre per concentrazione;

— terreni usati;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, criteri di accettabilità;

— procedura di trattamento.

Risultati:

— segni di tossicità,

— segni di precipitazione,

— conteggi per le singole piastre,

▼B

— numero medio di colonie revertanti per piastra e deviazione standard,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— eventuali analisi statistiche,

— dati sui controlli paralleli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con intervalli, medie e devia zioni standard,

— dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi precedenti, con intervalli, medie e devia zioni standard.

Discussione dei risultati

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutatimi Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Privai, M.. Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mam- malian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res., 168,* pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters, 1,* pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, 1. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised,* ed. D.]. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety, 8,* pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res., 38,* pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and]. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacte- ria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B. }., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis. 3,* pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), lmproved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, pp. 335-344.

(13) Privai, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, pp. 3347.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. *Mol. Mutagen.,* 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/-Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis,* 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium, Cancer Res., 39,* pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Die- tary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77,* pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay,]. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/-Microsome Test, *Mutation Res., 88,* pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen)., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation *Res., 189,* pp. 83 — 91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity* Testing. Part (*II*. Statistica! *livaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15 **SAGGIO DI MUTAGENESI E PRESCREENING DI CANCEROGENESI MUTAZIONE GENICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Per misurare l'induzione di mutazioni geniche indotte da agenti chimici, con e senza attivazione metabolica, può essere fatto uso di una varietà di ceppi aploidi e diploidi del lievito Saccharomyces cerevisiae.

Sono stati utilizzati sistemi di mutazione in avanti in ceppi aploidi, come la misura della mutazione da mutanti rossi, richiedenti adenina (ade-I, ade-2), a doppi mutanti bianchi richiedenti adenina; e sistemi selettivi come l'induzione della resistenza alla canavanina.

Il sistema di retromutazione più largamente convalidato comporta l'uso del ceppo aploide XV 185-14C che porta le mutazioni di tipo «senza senso» (ochre) ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 e trp 5-48, le quali possono essere revertite da mutageni che inducono sostituzioni di base nel sito specifico o mutazioni che sopprimono «ochre». Il ceppo XV 185-14C porta altresi il marcatore his 1-7, mutazione di tipo «senso sbagliato» revertita principalmente da mutazioni nel secondo sito, e il marcatore hom 3-10 che viene revertito da mutageni che inducono mutazioni del tipo «inserzione-delezione».

Fra i ceppi diploidi del S. cerevisiae il solo largamente convalidato è il ceppo D_7, omozigote per ilv 1-92.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparati

È opportuno preparare le soluzioni delle sostanze in esame e dei composti di controllo o di riferimento, servendosi di un veicolo appropriato, al momento dell'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua si devono usare soluzioni di solventi organici quali l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2 % in volume (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe influenzare in modo significativo la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

▼B

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica esogena.

Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale integrata con cofattori, ottenuta dai fegati di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'uso di altre specie, di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

Condizioni di effettuazione del saggio

Ceppi

I ceppi più largamente usati negli studi sulle mutazioni geniche sono il ceppo aploide XV 185-14C e il ceppo diploide D_7. Possono essere appropriati anche altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza delle cellule e del numero dei mutanti è fatto uso di terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno procedere in parallelo a controlli positivi, non trattati e con il solo solvente. Per ciascun evento genetico specifico vanno usate appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

Occorre far uso di almeno 5 concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. Per le sostanze tossiche la concentrazione più elevata usata nel test non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10 %. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche completamente solubili in acqua la concentrazione massima va determinata caso per caso.

Condizioni di incubazione

Le piastre vengono incubate per 4-7 giorni a temperatura da 28º a 30 ºC nell'oscurità.

Frequenze delle mutazioni spontanee

È opportuno usare subcolture con frequenze delle mutazioni spontanee entro i limiti accettati come normali.

▼B

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi che si inducono per mutazione genica e della sopravvivenza cellulare è opportuno fare uso di almeno tre piastre di replica per concentrazione. Nel caso di esperimenti nei quali si usino marcatori a bassa frequenza di mutazione, quali hom 3-10, per poter ottenere dati aventi rilevanza statistica è necessario aumentare il numero delle piastre.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di S. cerevisiae viene normalmente effettuato secondo un procedimento di test in sospensione liquida con impiego di cellule quiescenti o in crescita. Gli esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28º a 37 ºC e in agitazione 1-5 X $1O^7$ cellule/mi; in casi opportuni, nel corso del trattamento si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della mutazione genica. Se il primo esperimento è negativo il secondo esperimento dovrebbe essere condotto su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, viene confermato in un appropriato esperimento indipendente.

2. **DATI**

1 dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero delle colonie contate, del numero di mutanti, della sopravvivenza e della frequenza dei mutanti. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente. I dati devono essere stabiliti secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— ceppo usato,

— condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o in crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,

— condizioni del trattamento: livelli di esposizione, procedimento e durata del trattamento, temperatura di trattamento, controlli positivi e negativi,

— numero delle colonie contate, numero di mutanti, sopravvivenza e frequenza dei mutanti, relazione dose/risposta se disponibile, valutazione statistica dei dati,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.16 **RICOMBINAZIONE MITOTICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

La ricombinazione mitotica in Saccharomyces cerevisiae può essere rilevata fra geni (o in linea più generale fra un gene e il suo centromero) e all'interno dei geni. La prima delle due eventualità è denominata crossing-over mitotico e genera prodotti reciproci, mentre la seconda eventualità è per lo più non reciproca ed è denominata conversione genica. Il crossing-over viene generalmente determinato mediante la produzione di colonie o settori recessivi omozigoti in un ceppo eterozigote, mentre la conversione genica viene determinata attraverso la produzione di revertanti prototrofici in un ceppo auxotrofico eteroallelomorfo portante due diversi alleli del medesimo gene. I ceppi più comunemente usati per la rilevazione della conversione genica mitotica sono i ceppi D_4 (eteroallelomorfo irí ade 2 e trp5),D_7 (eteroallelomorfo in trp 5),BZ_{34} (eteroallelomorfo in arg 4)e JDl (eteroallelomorfo in his 4 e trp 5). Il crossing-over mitotico producente settori omozigoti di colore rosso e rosa può essere determinato nel ceppo D_5 o in D_7 (che misura anche la conversione genica mitotica e la retromutazione in ilv 1-92), essendo entrambi i ceppi eteroallelomorfi per alleli complementanti di ade 2.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

È opportuno preparare le soluzioni della sostanza in esame e dei composti di controllo o di riferimento, facendo uso di un solvente appropriato, al momento di procedere all'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua è opportuno usare solventi organici come l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2 % (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe alterare significativamente la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

Attivazione metabolica

Le cellule devono essere esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica esogena. Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale supplementare con cofattori e ottenuta dai fegati di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'impiego di altre specie, di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

▼B

Condizioni sperimentali

Ceppi

I ceppi più frequentemente usati sono i ceppi diploidi D_4, D_5, D_7, e JD1. Può essere appropriato anche l'impiego di altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza e della frequenza della ricombinazione mitotica si devono usare terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno effettuare in parallelo controlli positivi, controlli non trattati o trattati con solo solvente. Per ciascun tipo specifico di ricombinazione devono essere usate le appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno cinque concentrazioni della sostanza in esame adeguatamente intervallate. Tra i fattori da prendere in considerazione vi sono la citotossicità e la solubilità. La concentrazione più bassa non deve produrre alcun effetto sulla vitalità cellulare. Per le sostanze tossiche, la più alta concentrazione saggiata non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10 %. Le sostanze relativamente insolubili in acqua devono essere saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima del test va determinata caso per caso.

Le cellule possono essere esposte alle sostanze in esame in fase stazionaria o in fase di crescita per periodi fino a 18 ore. Nel caso di tempi di trattamento prolungati occorre tuttavia accertare mediante esame microscopico che nelle culture non vi sia formazione di spore, la cui presenza invaliderebbe il test.

Condizióni di incubazione

Le piastre vengono incubate nell'oscurità per 4-7 giorni a temperatura da 28 ° a 30 °C. Le piastre usate per l'analisi dei settori omozigoti di colore rosso e roseo derivanti dal crossing-over mitotico vanno tuttavia tenute in frigorifero (4 °C) per un altro ciclo di uno o due giorni prima dell'analisi, per dare tempo allo sviluppo del pigmento nelle colonie ricombinanti.

Frequenze della ricombinazione mitotica spontanea

È opportuno usare subcolture con frequenze di ricombinazione mitotica spontanea entro i limiti accettati come normali.

▼B

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi prodotti dalla conversione genica mitotica e per quella della sopravvivenza è opportuno fare uso di un minimo di tre piastre di replica per concentrazione. Nella determinazione della omozigosi recessiva derivante dal crossing-over mitotico il numero delle piastre va aumentato in modo da ottenere un numero adeguato di colonie.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di S. cerevisiae viene normalmente effettuato in un procedimento di test in sospensione liquida con cellule in fase stazionaria o in fase di crescita. Esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in fase di crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28 º a 37 ºC con scuotimento 1-5 × 10^7 cellule/mi; nel corso del trattamento, nei casi opportuni si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo l'incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della ricombinazione mitotica.

Se il primo esperimento è negativo il secondo dovrebbe essere eseguito su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, il secondo viene confermato in un esperimento indipendente appropriato.

2. **DATI**

I dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero dei ricombinanti, della sopravvivenza e della frequenza dei ricombinanti.

Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente.

I dati vanno stabiliti per valutazione secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile;

— ceppo usato,

— condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o di crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,

— condizioni del trattamento: concentrazione di esposizione, procedimento e durata del trattamento, tempera tura di trattamento, controlli positivi e negativi,

— numero di colonie contate, numero dei ricombinanti, frequenza della sopravvivenza e della ricombinazione, relazione dose/-risposta se possibile, valutazione statistica dei dati,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

▼B

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.17. MUTAGENICITÀ — TEST IN VITRO DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 476, In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

Il test in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero permette di identificare mutazioni geniche indotte da sostanze chimiche. Fra le linee cellulari adeguate si citano le cellule di linfoma di topo L5178Y, le linee CHO, CHO-AS52 e V79 di cellule di criceto cinese, le cellule linfoblastoidi umane TK6 (1). In queste linee cellulari di norma si misurano le mutazioni sui loci della timidina chinasi (TK) e dell'ipoxantina-guanina fosfori-bosil trasferasi (HPRT) e su un transgene della xantina-guanina fosforibosil trasferasi (XPRT). 1 saggi di mutazione TK, HPRT e XPRT rivelano varie categorie di fenomeni genetici. La posizione autosomica di TK e XPRT può permettere di individuare effetti genetici (per esempio grandi delezioni) non individuati sul locus HPRT dei cromosomi X (2) (3) (4) (5) (6).

Nel test in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate o ceppi cellulari. Le cellule sono scelte in base alla capacità di crescita in coltura e alla stabilità della frequenza di mutazioni spontanee.

I saggi in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Tale sistema di attivazione metabolica non può simulare perfettamente le condizioni *in vivo* nel mammifero. Si evitino condi zioni che porterebbero a risultati che non riflettono una mutagenicità intrinseca. Risultati positivi che non riflettono una mutagenicità intrinseca possono avere origine da cambiamenti di pH e di osmolalità o da ele vati livelli di citotossicità (7).

II saggio è usato per individuare potenziali mutageni e cancerogeni per i mammiferi. Molti composti positivi a questo test sono cancerogeni per i mammiferi, tuttavia la correlazione non è assoluta, ma dipende dalla classe chimica: vi sono sempre più elementi che inducono a ritenere che esistono cancerogeni che non sono rivelati da questi test perché sembrano agire attraverso altri meccanismi, non genotossici.

Cfr. anche Introduzione generale parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Mutazione «in avanti»: una mutazione genica in cui dal tipo parentale alla forma mutante si ha alterazione o perdita dell'attività enzimatica o della funzione della proteina codificata.

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi: sostanze che provocano la sostituzione di una o più coppie di basi del DNA.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura: Sostanze che provocano l'inserzione o la delezione di una o più coppie di basi nella molecola di DNA.

▼B

Tempo di espressione fenotipica: il periodo durante il quale i prodotti genici inalterati scompaiono dalle cellule recentemente mutate.

Frequenza dei mutanti: numero di cellule mutanti diviso per il numero di cellule vitali.

Crescita totale relativa: aumento del numero di cellule nel tempo, in confronto con una popolazione di cellule di controllo: si calcola moltiplicando la crescita in sospensione rispetto al controllo negativo per l'efficienza di clonazione del controllo negativo.

Crescita relativa in sospensione: aumento del numero di cellule nel corso del periodo di espressione rispetto al controllo negativo.

Vitalità: l'efficienza di clonazione delle cellule trattate al momento del piastramento in condizioni selettive dopo il periodo di espressione.

Sopravvivenza: l'efficienza di clonazione delle cellule trattate al momento del piastramento, al termine del trattamento; il tasso di sopravvivenza viene espresso di solito in relazione alla sopravvivenza della popolazione di cellule di controllo.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Le cellule carenti di timidina chinasi (TK) a causa della mutazione $TK^{+/-}$ —> $TK^{-/-}$ sono resistenti agli effetti citotossici dell'analogo pirimidinico trifluorotimidina (TFT). Le cellule capaci di produrre la timidina chinasi sono sensibili alla TFT, che provoca l'inibizione del metabolismo cellulare e arresta la divisione cellulare. Di conseguenza, le cellule mutanti sono in grado di proliferare in presenza di TFT, mentre le cellule normali, che contengono timidina chinasi, non lo sono. Analogamente le cellule carenti di HPRT o XPRT sono selezionate in base alla resistenza alla 6-tioguanina (TG) o alla 8-azaguanina (AG). Le proprietà della sostanza in esame devono essere studiate accuratamente quando in uno dei test di mutazione genica su cellule di mammifero si sperimenta un analogo di una base o un composto correlato all'agente selettivo. Per esempio, è necessario controllare la sospetta tossicità selettiva della sostanza in esame nei confronti di cellule mutanti e non mutanti. Quando sono sottoposte a test sostanze chimiche strutturalmente correlate all'agente selettivo (8). deve quindi essere confermata l'efficacia del sistema o dell'agente selettivo.

Le cellule in sospensione o in coltura monostrato sono esposte alla sostanza in esame, con e senza attivazione metabolica, per un tempo adeguato, poi reinoculate per determinare la citotossicità e permettere l'espressione fenotipica prima della selezione dei mutanti (9) (10) (11) (12) (13). La citotossicità è determinata di norma misurando l'efficacia relativa di clonazione (sopravvivenza) o la crescita totale relativa delle colture dopo il trattamento. Le colture trattate sono mantenute nel terreno di coltura per un periodo sufficiente, specifico per ciascun locus e tipo cellulare, per permettere l'espressione fenotipica ottimale delle mutazioni indotte. La frequenza di mutanti è determinata mediante inseminazione di un numero noto di cellule in terreno contenente l'agente selettivo, per rilevare le cellule mutanti, e in terreno non contenente l'agente selettivo, per determinare l'efficacia di clonazione (vitalità). Dopo un adeguato periodo di incubazione le colonie sono contate. La frequenza dei mutanti è costituita dal rapporto tra il numero di colonie mutanti nel terreno selettivo e in quello non selettivo.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Cellule*

I tipi di cellule adatti sono molti, per esempio i subcloni delle cellule L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 o TK6. Le cellule usate per questo test devono essere notoriamente sensibili ai mutageni chimici e presentare elevata efficienza di clonazione e frequenza stabile delle mutazioni spontanee. Si controlli che non siano contaminate da micoplasma: non si usino i ceppi contaminati.

Il test deve essere impostato in modo da avere sensibilità ed efficacia predeterminate. Il numero di cellule, di colture e di concentrazioni della sostanza in esame deve riflettere tali parametri predefiniti (14). Ad ogni sta dio del test il numero minimo di cellule vitali che sopravvivono al trattamento deve essere basato sulla fre quenza delle mutazioni spontanee. Come regola generale si può usare un numero di cellule pari almeno al decuplo dell'inverso della frequenza di mutazioni spontanee. Si raccomanda comunque di utilizzare almeno 10^6 cellule. Dovrebbero essere disponibili risultati di precedenti esperienze sul sistema cellulare, che indichino che le prestazioni del test sono costanti.

1.4.1.2. *Terreni e condizioni di coltura*

Si usino adeguati terreni di coltura e condizioni di incubazione (recipienti di coltura, temperatura, concentrazione di CO_2, e umidità). I terreni devono essere scelti in funzione dei sistemi selettivi e del tipo di cellule. E particolarmente importante che le condizioni di coltura siano scelte in modo da garantire la crescita ottimale delle cellule durante il periodo di espressione e la capacità di formare colonie da parte delle cellule mutanti e non mutanti.

1.4.1.3. *Preparazione delle colture*

Le cellule provenienti da colture primarie sono inoculate in un terreno di coltura e incubate a 37 °C. Prima di iniziare il test può rivelarsi necessario asportare dalle colture eventuali cellule mutanti preesistenti.

1.4.1.4. *Attivazione metabolica*

Le cellule dovrebbero essere esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18), o una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (19) (20).

La frazione post-mitocondriale è di solito usata a concentrazioni finali dell'1-10 % v/v nel terreno di coltura. La scelta e le condizioni di un sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare più di una concentrazione della frazione post-mito-condriale.

▼B

Vari nuovi procedimenti, tra cui la creazione mediante ingegneria genetica di linee cellulari che esprimono enzimi attivatori specifici, possono fornire le risorse potenziali per l'attivazione endogena. La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (per esempio dall'importanza dell'isoenzima del citocromo P450 per il metabolismo della sostanza in esame).

1.4.1.5. *Sostanza in esame/Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte diretta-mente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

11 solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilita. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Nell'esame di sostanze instabili in acqua, si usi un solvente organico anidro. L'acqua può essere rimossa mediante un setaccio molecolare.

1.4.2.2. *Concentrazioni di esposizione*

Fra i criteri da considerare nel determinare la concentrazione massima si citano la citotossicità, la solubilità nel sistema di prova e le variazioni di pH o di osmolalità.

La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un indicatore adeguato dell'integrità e della moltiplicazione cellulare, come l'efficacia relativa di clonazione (tasso di sopravvivenza) o la crescita totale relativa. Può essere utile determinare la citotossicità e la solubilità in un esperimento preliminare.

Si usino almeno quattro concentrazioni analizzabili. In caso di sostanza citotossica, le concentrazioni devono andare dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica; in altri termini, di norma le concentrazioni devono essere separate al massimo da un fattore compreso tra 2 e 10. Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, il tasso di sopravvivenza relativa (efficacia relativa di clonazione) o la crescita totale relativa dovrebbero essere pari al 10-20 % circa (e in ogni caso non inferiori al 10 %). Per sostanze a basso grado di citotossicità, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 5 µl/ml, 5 mg/ml o 0,01 M (si scelga il valore più basso).

▼B

Le sostanze difficilmente solubili devono essere sottoposte a test nelle condizioni di coltura fino al limite di solubilità e oltre. L'eventuale insolubilità va provata nel terreno finale in cui sono trattate le cellule. Può essere utile valutare la solubilità all'inizio e alla fine del trattamento, in quanto essa può modificarsi nel corso del- l'esperimento a causa della presenza di cellule, S9, siero, ecc. L'insolubilità è rilevabile ad occhio nudo. Il precipitato non deve interferire con la valutazione.

1.4.2.3. *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica. Quando si usa l'attivazione metabolica, la sostanza usata per i controlli positivi deve esigere attivazione per dare una risposta mutagenica.

Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Condizione di attivazione metabolica	Locus	Sostanza	Numero CAS	Numero EINECS
Assenza di attivazione metabolica esogena	HPRT	Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
		Etilnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (colonie piccole e grandi)	Metansolfonato di metile	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metansolfonato d'etile	62-50-0	200-536-7
		Etilnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Presenza di attivazione metabolica esogena	HPRT	3-Metilcolantrene	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimentilammina	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetilbenzantracene	57-97-6	200-359-5
	TK (colonie piccole e grandi)	Ciclofosfammide	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfammide monoidrato	6055-19-2	
		Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5
		3-Metilcolantrene	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimetilammina (per livelli elevati di S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5

Si possono usare altre sostanze adeguate per i controlli positivi, per esempio, la 5-bromo 2'-deossiuridina (CAS n. 59-14-3, EINECS n. 200-415-9) se il laboratorio dispone di una base dati su tale sostanza, desunti da precedenti esperimenti. Per i controlli positivi si usino, se possibile, sostanze chimiche di una classe chimica correlata alla sostanza saggiata.

▼B

Si effettuino anche controlli negativi, con solvente o mezzo disperdente usato da solo sul terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture che contengono la sostanza sottoposta al test. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che precedenti esperimenti dimostrino che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.4.3. **Procedura**

1.4.3.1. *Trattamento con la sostanza in esame*

Le cellule in proliferazione sono esposte alla sostanza in esame con e senza attivazione metabolica. L'esposizione deve protrarsi per un periodo adeguato (si considera che di norma tre-sei ore danno buoni risultati). Il tempo di esposizione può corrispondere a uno o più cicli cellulari.

Si possono usare colture in doppio o in singolo per ciascuna delle concentrazioni. Quando si usano colture singole, il numero di concentrazioni deve essere aumentato, per garantire un adeguato numero di colture per l'analisi (per esempio, almeno 8 concentrazioni analizzabili). Le colture dei controlli negativi (solvente) devono essere in doppio.

1 test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti di coltura ermetici (21) (22).

1.4.3.2. *Misura del tasso di sopravvivenza, della vitalità e della frequenza delle mutazioni*

Al termine del periodo di esposizione, le cellule sono lavate e messe in coltura per determinare la sopravvivenza e permettere l'espressione del fenotipo mutante. La misura della citotossicità mediante determinazione dell'efficacia relativa di clonazione (sopravvivenza) o della crescita totale relativa delle colture inizia di solito dopo il periodo di trattamento.

A ciascun locus corrisponde un determinato tempo minimo, necessario per permettere l'espressione subottimale del fenotipo dei mutanti neoindotti (HPRT e XPRT richiedono almeno 6-8 giorni, e TK almeno 2 giorni). Le cellule sono coltivate in terreno con e senza agenti selettivi per determinare rispettivamente il numero di mutanti e l'efficacia di clonazione. La vitalità (usata per il calcolo della frequenza di mutanti) si misura al termine del tempo di espressione, piastrando le colture in terreno non selettivo.

Se la sostanza in esame è positiva a test su L5178Y $TK^{+/-}$, la dimensione delle colonie deve essere rilevata almeno su una delle colture trattate (quella con la concentrazione positiva più alta) e sui controlli negativi e positivi. Se la sostanza in esame è negativa al test su L5178Y $TK^{+/-}$, la dimensione va rilevata sui controlli negativi e positivi. Anche negli studi condotti su TK6$TK^{+/-}$, si può rilevare la dimensione delle colonie mutanti.

▼B

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati devono comprendere la determinazione di citotossicità e di vitalità, il conteggio delle colonie e la fre quenza dei mutanti nelle colture trattate e di controllo. In caso di risposta positiva al test su L5178Y $TK^{+/-}$, si contino le colonie, distinguendo fra piccole e grandi, almeno per una concentrazione della sostanza in esame (concentrazione positiva massima) e per i controlli negativi e positivi. La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti (quelli che producono colonie grandi e quelli che producono colonie piccole) è stata stu diata particolareggiatamente (23) (24). Nel saggio $TK^{+/-}$, le colonie sono recensite sulla base del criterio della crescita: normale (colonie grandi) e lenta (colonie piccole) (25). Le cellule mutanti che hanno subito altera zioni genetiche più gravi hanno tempi di duplicazione più lunghi e formano di conseguenza colonie piccole.

II danno può andare dalla perdita dell'intero gene ad aberrazioni cromosomiche che si manifestano nel cario tipo. La presenza di mutanti che producono colonie piccole è stata messa in relazione con sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche rilevanti (26). Le cellule mutanti che hanno subito alterazioni meno gravi crescono a velocità simile a quella delle cellule parentali, formando colonie grandi.

Si indichi il tasso di sopravvivenza (efficacia relativa di clonazione) o la crescita totale relativa. La frequenza dei mutanti deve essere espressa come rapporto fra il numero delle cellule mutanti e quello delle cellule sopravvisute.

Si presentino i dati relativi alle singole colture. Tutti i dati inoltre vanno riassunti in una tabella. Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva. 1 risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate. I risultati negativi devono essere confermati caso per caso. Se non si considera necessaria la conferma di risultati negativi, se ne fornisca la ragione. Se si procede a test ulteriori in caso di risultati ambigui o negativi, si dovrebbero modificare i parametri di studio, per ampliare la gamma delle condizioni valutate. Fra i parametri di studio modificabili si citano l'intervallo tra le dosi saggiate e le condizioni di attivazione metabolica.

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla dose o un aumento riproducibile della frequenza dei mutanti. Si consideri per prima cosa la rilevanza biologica dei risultati. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali, ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

▼B

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi, ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui, nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero indicano che la sostanza in esame induce mutazioni geniche nelle cellule di mammifero utilizzate nelle colture. Una riproducibile correlazione fra l'entità della risposta positiva e la dose è maggiormente significativa. Risultati negativi significano che nelle condizioni del test la sostanza in esame non induce mutazioni geniche nelle cellule di mammifero usate nella coltura.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente:

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota;

Cellule:

— tipo e origine delle cellule;

— numero di colture cellulari;

— eventuale numero di passaggi in coltura, se del caso;

— metodi usati per la conservazione della cultura cellulare, se del caso;

— assenza di micoplasma.

Condizioni di esperimento:

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, per esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità, se disponibili;

— composizione del terreno, concentrazione di CO_2;

— concentrazione della sostanza in esame;

— volume del mezzo disperdente e della sostanza in esame aggiunto;

— temperatura di incubazione;

— tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— densità delle cellule durante il trattamento;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità;

— controlli positivi e negativi;

▼B

— durata del periodo di espressione (con numero di cellule inseminate, subcolture e protocolli di alimenta zione, se del caso):

— agenti selettivi;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;

— metodi usati per contare il numero di cellule vitali e mutanti;

— definizione delle colonie considerate, per dimensione e tipo (compresi i criteri in base a cui le colonie sono considerate «piccole» o «grandi», se del caso).

Risultati:

— segni di tossicità;

— segni di precipitazione;

— dati sul pH e l'osmolalità durante l'esposizione alla sostanza in esame, se determinati;

— dimensioni delle colonie, se registrate almeno per i controlli negativi e positivi;

— idoneità del laboratorio a individuare mutanti in colonie piccole con il sistema L5178Y $TK^{+/-}$, se del caso;

— relazione dose-risposta, se possibile;

— eventuali analisi statistiche;

— dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi paralleli;

— dati sui precedenti controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con ranges, medie e devia zioni standard;

— frequenza dei mutanti.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res., 94,* pp. 467-485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K.. Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis. 4,* pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res., 223,* pp. 121-128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from 1CPEMC Task Group 9, Mutation *Res., 257,* pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (198 3), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation *Res.,* 115, pp. 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutageni-city of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.,* 196, pp. 17-36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. ?.. Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res., 189,* pp. 135-141.

(11) Liber, H. L, Yandell, D. W. and Little,]. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.,* 216, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-lnduced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.,* 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L, Cole,)., McGregor, D. B. and Asquith,]. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: Statistica! *Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.,* 46, pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res., 59,* pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in In Vitro *Metabolic* Activation *in Mutagenesis Testing,* de Serres, F. J., Fouts,]. R., Bend,). R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airbome Agents,* New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Muta- tion Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L, Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc.* Natl. *Acad. Sci. USA, 87,* pp. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^{1}) and Mutants of L51 78Y/-TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res*. 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res., *229,* pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.

▼B

B.18 **DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA: SINTESI NON PROGRAMMATA DEL DNA — CELLULE DI MAMMIFERO IN VITRO**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Il test della sintesi non programmata del DNA — Unscheduled DNA Syntesis (UDS) — misura la sintesi di riparazione del DNA dopo l'escissione e la rimozione di un tratto di DNA contenente la zona del danno indotto da agenti chimici e fisici. Il test si basa sull'incorparazione di timidina marcata con tritio (^{3}H-TdR) nel DNA di cellule di mammiferi che non si trovano nella fase S del ciclo cellulare. L'assunzione di ^{3}H-TdR può essere determinata per autoradiografia oppure mediante conteggio per scintillazione in fase liquida — liquid scintillation counting (LSC) — del DNA dalle cellule trattate. Le cellule di mammiferi in coltura, salvo nel caso che si faccia uso di epatociti primari di topo, vengono trattate con l'agente all'esame con e senza un sistema di attivazione metabolica esogena. La UDS può essere misurata anche in sistemi *in vivo*.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Le sostanze in esame e quelle di controllo o di riferimento vanno preparate in terreno di crescita ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati e poi ancora diluite in terreno di crescita prima di essere utilizzate per il test. La concentrazione finale del veicolo non deve produrre alcun effetto sulla vitalità delle cellule.

Nel test possono essere utilizzate colture primarie di epatociti di ratto, di linfociti umani o di linee cellulari stabilizzate (ad esempio fibroblasti diploidi umani).

È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Sono necessarie almeno due colture di cellule per l'autoradiografia e sei colture (o meno, se giustificato scientificamente) per le determinazioni LSC e UDS per ogni punto sperimentale.

▼B

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere in ciascun esperimento controlli simultanei positivi e negativi (non trattati e/o del solo veicolo), con e senza attivazione metabolica.

Esempi di controlli positivi per il test su epatociti di ratto sono il 7,12-DMBA (7,12-dimetilbenzatracene) e il 2-AAF (2-acetilamino-fluorene). Nel caso delle linee cellulari stabilizzate un esempio di controllo positivo sia per le determinazioni autoradiografiche che per le determinazioni LSC effettuate senza attivazione metabolica è la 4-NQO (4-nitrochinolina-N-ossido); la N-dimetilnitrosamina è a sua volta un esempio di composto per controllo positivo quando sia fatto uso di sistemi di attivazione metabolica.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di concentrazioni multiple della sostanza in esame in una gamma adeguata ai fini della determinazione della risposta. La concentrazione più elevata deve dar luogo a qualche effetto citotossico. I composti relativamente insolubili in acqua vanno saggiati fino al loro limite di solubilità. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Cellule

Per il mantenimento delle colture è opportuno fare uso di terreni di crescita, di concentrazioni di CO_2 e di condizioni di temperatura e di umidità appropriate. Le linee cellulari stabilizzate devono essere controllate periodicamente per escludere la presenza di contaminazione da micoplasma.

Attivazione metabolica

Con le colture primarie di epatociti non si fa uso di sistemi di attivazione metabolica. Le* linee cellulari stabilizzate ed i linfociti vengono esposti alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Procedimento

Preparazione delle colture

La linee cellulari stabilizzate vengono generate da coltura stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante separazione per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C.

Colture a breve termine di epatociti di ratto vengono preparate dando modo a epatociti dissociati di fresco in un terreno appropriato di attaccarsi alla superficie di crescita.

Le colture di linfociti umani vengono preparate secondo tecniche appropriate.

▼B

Trattamento delle colture con la sostanza in esame

Epatociti primari di ratto

Gli epatociti di ratto isolati di fresco vengono trattati con la sostanza in esame in un terreno contenente ^{3}H-TdR per una durata appropriata. Al termine del periodo di trattamento le cellule vanno tolte mediante filtraggio dal terreno, risciacquate, fissate ed essiccate. I vetrini vanno immersi in emulsione autoradiografica (alternativamente si possono usare pellicole adatte), esposti, sviluppati, colorati ed enumerati.

Linee cellulari stabilizzate e linfociti

Tecniche autoradiografiche: Le colture di cellule vengono esposte alla sostanza in esame per una durata appropriata e successivamente trattate con ^{3}H-TdR. La durata sarà determinata dalla natura della sostanza, dall'attività del sistema metabolizzante e dal tipo delle cellule. Per rilevare il valore massimo di UDS, è opportuno aggiungere ^{3}H-TdR contemporaneamente alla sostanza all'esame, ovvero entro pochi minuti dall'esposizione alla sostanza stessa. La scelta fra i suddetti due procedimenti sarà fatta in relazione alla possibilità di interazioni fra la sostanza all'esame e ^{3}H-TdR. Al fine di poter distinguere fra UDS e la replicazione semi-conservativa di DNA si può inibire quest'ultima, ad esempio facendo uso di un terreno deficiente di arginina, a basso contenuto di siero o con idrossiurea nel mezzo di coltura.

Misure LSC di UDS: Prima del trattamento con la sostanza in esame è opportuno bloccare nel modo che si è descritto sopra l'entrata delle cellule nella fase S. Le cellule vengono poi esposte alla sostanza in esame nel modo che si è descritto per l'autoradiografia. Al termine del periodo di incubazione si estrae il DNA dalle cellule e si determinano il contenuto totale di DNA e la misura della incorporazione di ^{3}H-TdR.

Occorre rilevare che quando si fa uso delle tecniche sopra descritte di linfociti umani, la soppressione della replicazione semi-conservativa di DNA non è necessaria in colture non stimolate.

Analisi

Determinazioni autoradiografiche

Nella determinazione di UDS nelle cellule in coltura non si contano i nuclei in fase S. È opportuno contare almeno 50 cellule per concentrazione. Le lastrine vanno codificate prima del conteggio, È opportuno contare su ciascuna piastrina diversi campi a caso interamente separati tra loro. Per la determinazione della quantità di incorporazione di ^{3}H-J-TdR nel citoplasma è bene contare nel citoplasma di ciascuna cellula conteggiata tre aree delle dimensioni del nucleo.

Determinazioni LSC

Nelle determinazioni LSC UDS occorre fare uso di un numero adeguato di colture per ogni concentrazione e per i controlli.

▼B

Tutti i risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. **DATI**

I dati devono essere presentati in forma di tabelle.

2.1. DETERMINAZIONI AUTORADIOGRAFICHE

Della entità dell'incorporazione di ^{3}H-TdR nel citoplasma e del numero dei granuli osservati nel nucleo delle cellule va presa nota separatamente.

Per descrivere la distribuzione dell'entità dell'incorporazione di ^{3}H-TdR nel citoplasma e del numero dei granuli per nucleo può essere fatto riferimento alla media, alla mediana ed al modo.

2.2. DETERMINAZIONI LSC

Per le determinazioni LSC, l'incorporazione di ^{3}H-TdR va indicata in termini di dpm/μg di DNA. Il valore medio di dpm/μg di DNA con la deviazione standard può essere usato per descrivere la distribuzione della incorporazione.

I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— cellule usate, densità e numero dei passagi al momento del trattamento, numero delle colture di cellule,

— metodi usati per il mantenimento delle colture di cellule, con indicazione del terreno, della temperatura e della concentrazione di CO_2,

— sostanza in esame, veicolo, concentrazioni e ragioni della scelta delle concentrazioni usate nella determinazione,

— dettagli riguardanti i sistemi di attivazione metabolica,

— programmi di trattamento,

— controlli positivi e negativi,

— tecnica autoradiografica usata,

— procedimenti usati per bloccare l'entrata delle cellule nella fase S,

— procedimenti usati per l'estrazione di DNA e per la determinazione del contenuto totale di DNA nelle determinazioni LSC,

— relazione dose-risposta se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

▼B

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.19 **SAGGIO DEGLI SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI IN VITRO**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Quello degli scambi tra cromatidi fratelli — Sister chromatid exchange (SEC) — è un test a breve termine per la rilevazione degli scambi reciproci di DNA fra due cromatidi fratelli di un cromosoma in duplicazione. Gli SCE rappresentano l'interscambio di prodotti della replicazione di DNA in corrispondenza di loci apparentemente omologhi. Il processo di scambio comporta presumibilmente la rottura e la riunione di DNA, ma sulla sua base molecolare non si conosce in realtà molto. La rilevazione degli SCE richiede qualche mezzo per marcare in modo differenziale i cromatidi fratelli, e questo può essere ottenuto mediante incorporazione di bromodeossiurtdina (BrdU) nel DNA cromosomico per due cicli cellulari.

Colture in vitro di cellule di mammiferi vengono esposte alla sostanza in esame con e senza un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi, se appropriato, e poste in coltura per due cicli di replicazione in terreno contenente BrdU. Dopo un trattamento con un inibitore del fuso (ad esempio la colchicina) per accumulare cellule in uno stadio di mitosi di tipo metafasico (c-metafase), le cellule vengono raccolte e si procede alle preparazioni cromosomiche.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

— Nel saggio si possono usare colture primarie (linfociti umani) o linee cellulari stabilizzate (ad esempio cellule di ovario di hamster cinese). Le linee cellulari devono essere controllate per escludere la presenza di contaminazione da Mycoplasma.

— Vanno usati terreni di coltura e condizioni di incubazione (temperatura, recipienti di coltura, concentrazione di CO_2 ed umidità) appropriati.

— Le sostanze in esame possono essere preparate in terreni di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale dei veicoli nei sistemi di coltura non deve influire in maniera significativa sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule, ed è parallelamente opportuno verificare la frequenza degli SCE per mezzo di un controllo con solvente.

▼B

— E opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica di mammiferi. Alternativamente, ove si faccia uso di tipi di cellule con attività metabolica endogena, l'intensità e la natura dell'attività devono essere appropriate per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Per ciascun punto sperimentale dovrebbero essere usate colture almeno in duplicato.

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, facendo uso sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica, ed è opportuno anche effettuare un controllo del veicolo.

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

— come composto ad azione diretta:

  — l'etilmetansulfonato,

— come composto ad azione indiretta:

  — la ciclofosfamide.

Se del caso, può essere incluso nell'esperimento un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica della sostanza in esame.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno tre concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. La concentrazione più elevata deve dar luogo ad un effetto tossico significativo, ma deve ancora consentire il verificarsi di una replicazione adeguata delle cellule. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Procedimento

Preparazione delle colture

Linee cellulari stabilizzate vengono generate da colture stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante distacco per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C. Nel caso di coltura monostrato, il numero delle cellule per ogni recipiente di coltura va regolato in modo che le colture non siano confluenti in misura molto maggiore del 50 % al momento della raccolta. Alternativamente, le cellule possono essere usate in forma di coltura in sospensione. Le colture di linfociti umani sono ottenute da sangue eparinizzato secondo tecniche appropriate ed incubate a 37 °C.

▼B

Trattamento

Vengono esposte alla sostanza in esame per una durata adeguata cellule in uno stadio di crescita esponenziale; nella maggior parte dei casi può essere efficace una durata da una a due ore, ma la durata del trattamento può in taluni casi essere prolungata fino a due cicli cellulari completi. Le cellule non aventi una sufficiente attività metabolica endogena vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate per due cicli di replicazione in presenza di BrdU. In un procedimento alternativo si possono esporre le cellule contemporaneamente alla sostanza in esame e al BrdU per la durata completa di coltura di due cicli cellulari.

Le colture di linfociti umani vengono trattate mentre si trovano in condizione semisincrona.

Le cellule vengono analizzate alle loro seconda divisione dopo il trattamento, per assicurarsi che siano state esposte alla sostanza negli stadi più sensibili del ciclo cellulare. Tutte le colture alle quali si aggiunge BrdU, vanno manipolate nell'oscurità o in luce attenuata di lampade ad incandescenza fino al momento della raccolta delle cellule, allo scopo di ridurre per quanto possibile la fotolisi del DNA contenente BrdU.

Raccolta delle cellule

Le colture di cellule vengono trattate con un inibitore del fuso (ad esempio colchicina) da 1 a 4 ore prima della raccolta. Ciascuna coltura viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi.

Preparazione e colorazione dei cromosomi

I preparati di cromosomi vengono ottenuti secondo le tecniche citogenetiche correnti. La colorazione dei vetrini per l'evidenziazione degli SCE può essere effettuata secondo diverse tecniche (ad esempio con il metodo della fluorescenza più Giemsa).

Analisi

Il numero di cellule analizzate deve essere basato sulla frequenza spontanea di controllo degli SCE. Normalmente si analizzano per gli SCE almeno 25 metafasi ben spaziate per coltura. I vetrini vengono codificati prima dell'analisi. Nei linfociti umani si analizzano soltanto metafasi contenenti 46 centromeri. Nelle linee cellulari stabilizzate si analizzano a loro volta soltanto metafasi contenenti ± 2 centromeri del numero modale. E opportuno indicare se il salto di marcatura a livello del centromero viene o non viene conteggiato come SCE. I risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. **DATI**

I dati devono essere presentati in forma di tabelle. Il numero degli SCE per metafase e il numero degli SCE per cromosoma vanno indicati separatamente per tutte le colture trattate e quelle di controllo.

I dati devono essere definiti secondo metodi statistici appropriati.

▼B

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— cellule usate, metodi di mantenimento della coltura cellulare,

— condizioni sperimentali: composizione dei mezzi, concentrazione di CO_2, concentrazione della sostanza all'esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, tempo di trattamento, inibitore del fuso usato, sua concentrazione e durata del trattamento connesso, tipo di sistema di attivazione di mammiferi usato, controlli positivi e negativi,

— numero di colture di cellule per punto sperimentale,

— dettagli della tecnica usata per la preparazione delle lastrine,

— numero delle metafasi analizzate (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),

— numero medio di SCE per cellula e per cromosoma (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),

— criteri per il riscontro degli SCE,

— criteri di selezione delle dosi,

— relazione dose/risposta se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.20 **SAGGIO DEI LETALI RECESSIVI LEGATI AL SESSO: DROSOPHILA MELANOGASTER**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Il saggio dei letali recessivi legati al sesso — sex-linked recessive lethal (SLRL) — nel quale è fatto uso della Drosophila melanogaster, permette di rilevare l'induzione sia di mutazioni puntiformi che di piccole delezioni nella linea germinale dell'insetto. Si tratta di un saggio capace di rivelare mutazioni in circa 800 loci sul cromosoma X; questa cifra rappresenta circa l'80 % di tutti i loci del cromosoma X; quest'ultimo rappresenta a sua volta circa un quinto dell'intero genoma aploide.

Le mutazioni nel cromosoma X nella D. melanogaster sono espresse fenotipicamente nei maschi portanti il gene mutante. Quando la mutazione è letale nella condizione emizigote, la sua presenza si desume dall'assenza di una delle due classi di discendenza maschile che sono normalmente prodotte da una femmina eterozigote. Il saggio SLRL si basa sulla disponibilità di cromosomi specificamente marcati.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Ceppi

Possono essere usati maschi di un ceppo ben definito di tipo selvatico e femmine del ceppo Muller-5. Possono altresì essere usati altri ceppi di femmine marcate in modo appropriato con cromosomi X multipli invertiti.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame vanno disciolte in acqua. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati (ad esempio una miscela di etanolo e Tween-60 o 80), e successivamente diluite in acqua o in soluzione salina prima della somministrazione. È opportuno evitare quale solvente il dimetilsol-fossido (DMSO).

▼B

Numero di animali

Il saggio va programmato con una sensibilità ed una potenza predeterminati. Sul numero di cromosomi trattati che devono essere analizzati influirà fortemente la frequenza delle mutazioni spontanee osservata nel controllo appropriato.

Vie di somministrazione

L'esposizione può essere orale, per iniezione o per esposizione a gas o a vapori. La somministrazione della sostanza in esame può essere fatta in forma di soluzione zuccherina. Se necessario, le sostanze possono essere disciolte in soluzione di NaCl allo 0,7 % ed iniettate nel torace o nell'addome.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere nell'esperimento controlli negativi (del solvente) e positivi. Ove tuttavia siano disponibili appropriati dati storici di controllo del laboratorio, non sono necessari controlli concomitanti.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di tre concentrazioni. Per una valutazione preliminare può essere fatto uso di una sola concentrazione della sostanza in esame, che può essere quella massima tollerata o quella che dà luogo ad una qualche indicazione di tossicità. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare l'esposizione alla concentrazione massima praticabile.

Procedimento

Maschi di tipo selvatico (di età da 3 a 5 giorni) vengono trattati con la sostanza in esame e accoppiati individualmente con un numero maggiore di femmine vergini dello stock Muller-5 o di altro stock marcato in maniera appropriata (con cromosomi X multipli invertiti). Le femmine vengono sostituite con vergini fresche ogni due, tre giorni cosi da coprire l'intero ciclo delle cellule germinali. Sulla prole di dette femmine viene effettuata l'analisi degli effetti letali corrispondenti agli effetti sullo sperma maturo, sugli spermatidi di stadio medio o avanzato, sugli spermatidi precoci, sugli spermaticiti e sugli spermatogoni al momento del trattamento.

Le femmine eterozigoti F_1, degli incroci di cui sopra sono fatte accoppiare individualmente (ossia in ragione di una femmina per bottiglietta) con i loro fratelli. Nella generazione F_2 si procede su ciascuna coltura all'analisi dell'assenza di maschi del tipo selvatico. Se da una femmina F_1 appare essere derivata una coltura portante un letale nel cromosoma X dei genitori (ossia se non si osservano maschi con il cromosoma trattato) si devono mettere alla prova figlie di quella femmina con il medesimo genotipo per stabilire se la letalità si ripete nella generazione successiva.

2. **DATI**

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei cromosomi X saggiati, del numero dei maschi non fertili e del numero dei cromosomi letali per ciascuna concentrazione di esposizione e per ciascun periodo di accoppiamento per i singoli maschi trattati. Deve essere riportato per ciascun maschio il numero degli aggregati di differenti dimensioni, I risultati del test devono essere confermati in un esperimento a parte.

▼B

Per la valutazione del saggio dei letali recessivi legati al sesso deve essere fatto uso di metodi statistici appropriati. L'agglomerazione di letali recessivi aventi origine da un medesimo maschio dev'essere considerata e valutata secondo criteri statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— stock: stock o ceppi di Drosophila usati, età degli insetti, numero dei maschi trattati, numero dei maschi sterili, numero di colture F_2 costituite, numero di colture F_2 senza progenie, numero di cromosomi portanti un letale individuati per ciascuno stadio delle cellule germinali,

— criteri per la definizione delle dimensioni dei gruppi trattati,

— condizioni di effettuazione del saggio: descrizione dettagliata dei programmi di trattamento e di campionatura, livelli di esposizione, dati della tossicità, controlli negativi (del solvente) e positivi, se del caso,

— criteri per il riscontro delle mutazioni letali,

— relazione esposizione/effetto se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.21 SAGGIO IN VITRO DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Per la rilevazione di cambiamenti fenotipici in vitro indotti da sostanze chimiche associate con una trasformazione maligna *in vivo* può essere fatto uso di sistemi di coltura di cellule di mammiferi. Fra le cellule più largamente usate figurano le cellule C3H10T$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, le cellule di ratto Fisher; i saggi si fondano su cambiamenti della morfologia cellulare, sulla formazione di foci e sulla perdita della dipendenza da ancoraggio in agar semisolido. Esistono anche altri sistemi meno largamente usati i quali mettono in luce altri tipi di cambiamenti fisiologici o morfologici nelle cellule successivamente all'esposizione a sostanze chimiche carcinogene. Nessuno degli eventi finali dei test in vitro ha un legame meccanicistico accertato con il cancro. Alcuni fra i saggi sono in grado di evidenziare agenti promotori dei tumori. La citotossicità può essere determinata attraverso la misura dell'effetto della sostanza in esame sulla capacità di formazione di colonie (efficienza di clonaggio) o sul tasso di crescita delle colture. La misurazione della citotossicità ha lo scopo di stabilire se l'esposizione alla sostanza in esame abbia avuto carattere rilevante dal punto di vista tossicologico, ma non può essere usata per calcolare la frequenza della trasformazione in tutti i saggi poiché alcuni di essi possono comportare un'incubazione prolungata e/o un ripiastramento delle cellule.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Cellule

È disponibile tutta una varietà di linee cellulari o di cellule primarie, in relazione al saggio di trasformazione che si intende effettuare. Il ricercatore deve accertarsi che nel saggio che si sta effettuando le cellule presentino dopo esposizione a carcinogeni noti l'appropriato cambiamento fenotipico, e che il saggio nel suo laboratorio sia di provata e documentata validità e attendibilità.

Terreni di coltura

Devono essere usati terreni di coltura e condizioni sperimentali appropriati per il saggio di trasformazione che si effettua.

▼B

Sostanza in esame

Le sostanze in esame possono essere preparate in mezzi di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati, prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale del veicolo nel sistema di coltura non deve influire sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule né sull'incidenza della trasformazione.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi. Alternativamente, quando sia fatto uso di tipi di cellule che possiedono un'attività metabolica endogena deve essere accertato che la natura dell'attività stessa sia appropriata per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, con impiego sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica; è altresì opportuno fare uso di un controllo negativo (del solvente).

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

— sostanze ad azione diretta:

  — etilmetansulfonato,

  — β-propiolattone;

— composti richiedenti un'attivazione metabolica:

  — 2-acetilaminofluorene,

  — 4-dimetilaminoazobenzene,

  — 7,12-dimetilbenzantracene.

Se del caso, è opportuno includere un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica del composto in esame.

Concentrazioni

È opportuno usare varie concentrazioni della sostanza in esame. Dette concentrazioni devono dar luogo ad un effetto tossico correlato con la concentrazione, nel senso che la concentrazione più elevata produce un livello ridotto di sopravvivenza, mentre alla concentrazione più bassa la sopravvivenza è approssimativamente dello stesso ordine che nel controllo negativo. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedure appropriate. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza va determinata caso per caso.

▼B

Procedimento

L'esposizione delle cellule deve avere una durata appropriata in relazione al sistema di saggio adottato, e questo, quando l'esposizione è prolungata, può comportare un ridosaggio con cambio del mezzo e, se necessario, con miscela di attivazione metabolica fresca. Le cellule non aventi un'attività metabolica endogena sufficiente vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema di attivazione metabolica appropriato. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate in condizioni appropriate per la comparsa del fenotipo trasformato che si sta studiando, e viene infine determinata l'incidenza della trasformazione. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente.

2. **DATI**

I dati vanno presentati in forma di tabella e possono assumere forme diverse a seconda del tipo di determinazione effettuato, ad esempio numero di foci o di colonie per piastre, piastre positive o numero delle cellule trasformate. La sopravvivenza va espressa quale percentuale dei livelli di controllo, e la frequenza della trasformazione sotto forma del numero di trasformanti in relazione al numero dei sopravvissuti. I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— tipo di cellule usato, numero delle colture cellulari, metodi di mantenimento delle colture,

— condizioni di effettuazione del saggio, concentrazione della sostanza in esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, durata dell'incubazione, durata e frequenza del trattamento, densità delle cellule durante il trattamento, tipo di sistema di attivazione metabolica esogena usato, controlli positivi e negativi, specificazione del fenotipo studiato, sistema selettivo usato (se del caso), criteri per la scelta delle dosi,

— metodo seguito per l'enumerazione delle cellule vitali e delle cellule trasformate,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.22 **SAGGIO DEI LETALI DOMINANTI NEI RODITORI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Gli effetti dei letali dominanti provocano la morte dell'embrione o del feto. L'induzione di letali dominanti per effetto dell'esposizione ad una sostanza chimica indica che la sostanza in causa ha attaccato il tessuto germinale della specie all'esame. E generalmente ammesso che i letali dominanti sono dovuti a un danno cromosomico (anomalie strutturali e numeriche). La morte dell'embrione in femmine trattate può altresì essere il risultato di effetti tossici.

Come criterio generale si espongono animali maschi al composto in esame e si accoppiano i medesimi con femmine vergini non trattate. I diversi stadi delle cellule germinali possono essere saggiati separatamente mediante l'osservanza di intervalli in successione negli accoppiamenti. L'aumento degli impianti morti per femmina nel gruppo trattato in confronto con gli impianti morti per femmina nel gruppo di controllo rispecchia la perdita successiva all'impianto. La perdita anteriore all'impianto può essere stimata sulla base di conteggi dei corpi lutei oppure attraverso il raffronto del totale degli impianti per femmina nel gruppo trattato e in quello di controllo. L'effetto letale dominante complessivo è rappresentato dalla somma della perdita anteriore e successiva all'impianto. Il calcolo dell'effetto letale dominante complessivo si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo trattato e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Una riduzione del numero di impianti a determinati intervalli può essere il risultato dell'uccisione di cellule (vale a dire, di spermatociti e/o di spermagoni).

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

In tutti i casi in cui ciò sia possibile, le sostanze in esame vanno disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o sospese in solventi appropriati. Il solvente usato non deve né interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno fare uso di preparazioni fresche della sostanza in esame.

▼B

Condizioni sperimentali

Vie di somministrazione

Il composto in esame va in generale somministrato una sola volta. Sulla base di informazioni tossicologiche può essere adottato un programma di trattamento ripetuto. Le vie di somministrazione correnti sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale. Possono altresì essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Quali specie da sottoporre al saggio sono raccomandati i ratti o i topi. Animali sani nella piena maturità sessuale vengono randomizzati ed assegnati al gruppo per il trattamento e al gruppo di controllo.

Numero e sesso

Occorre fare uso di un numero adeguato di maschi trattati in modo da tener conto della variazione spontanea del carattere biologico di cui si effettua la valutazione. Il numero scelto deve essere basato sulla sensibilità di rilevazione e sul valore di significatività determinati in precedenza. Ad esempio, in un esperimento tipico, il numero dei maschi per ciascun gruppo/dose deve essere sufficiente per dare da 30 a 50 femmine gravide per ogni intervallo di accoppiamento.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno in linea generale includere in ciascun esperimento dei controlli simultanei positivi e negativi (del veicolo). Quando siano disponibili risultati accettabili di controlli positivi relativi ad esperimenti effettuati di recente nel medesimo laboratorio, al posto di un controllo positivo simultaneo può essere fatto uso di detti risultati. Le sostanze per i controlli positivi vanno usate a dosi opportunamente basse (ad esempio MMS, intraperitoneale, a 10 mg/kg) allo scopo di dimostrare la sensibilità del saggio.

Livelli delle dosi

Di norma va fatto uso di tre livelli di dosaggio. La dose più alta deve produrre segni di tossicità o di riduzione della fertilità negli animali trattati. In taluni casi può essere sufficiente un solo livello elevato di dosaggio.

Saggio del limite

Le sostanze non tossiche vanno saggiate a 5 g/kg con una sola somministrazione o a 1 g/kg/giorno con somministrazione ripetuta.

Procedimento

Sono possibili vari schemi di trattamento. Il tipo di trattamento più largamente usato è quello della somministrazione singola della sostanza in esame. Possono essere applicati anche altri schemi di trattamento.

I singoli maschi vengono accoppiati in successione con una o due femmine vergini non trattate ad intervalli appropriati dopo il trattamento. Le femmine vanno lasciate con i maschi almeno per la durata di un ciclo di estro o fino a che sia avvenuto l'accoppiamento, da determinare in base alla presenza di sperma nella vagina o di un tappo vaginale.

▼B

II numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato in base al programma di trattamento e deve essere tale che vengano esaminati dopo il trattamento tutti gli stadi delle cellule germinali.

Le femmine vengono sacrificate nella seconda metà del periodo di gravidanza, e si procede all'esame del contenuto uterino per la determinazione del numero degli impianti morti e viventi. Si possono anche esaminare le ovaie per determinare il numero dei corpi lutei.

2. **DATI**

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei maschi, del numero delle femmine gravide e del numero delle femmine non gravide. I risultati di ciascun accoppiamento, con indicazione dell'identità dei singoli soggetti maschi e femmine, vanno riportati individualmente. Per ciascuna femmina va indicata la settimana di accoppiamento, e per i maschi il livello di dosaggio, nonché rispettivamente le frequenze degli impianti vivi e degli impianti morti.

Il calcolo dell'effetto complessivo letale dominante si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo sottoposto al saggio e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Il rapporto' fra gli impianti morti e quelli vivi del gruppo trattato posto a raffronto con il rapporto corrispondente del gruppo di controllo viene analizzato ai fini dell'indicazione della perdita successiva all'impianto.

Se i dati sono registrati come morti precoci e morti tardive, ciò deve risultare dalle tabelle. Se la perdita anteriore all'impiantazione è stimata, ne deve essere dato ragguaglio. La perdita anteriore all'impianto può essere calcolata come discrepanza fra il numero dei corpi lutei e il numero degli impianti, ovvero come riduzione del numero medio di impianti per utero in confronto con gli accoppiamenti di controllo.

I dati vengono valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, età e peso degli animali usati, numero degli animali dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,

— sostanza in esame, solvente, livelli di dosaggio saggiati e ragioni della scelta delle dosi, controlli negativi e positivi, dati della tossicità,

— via e durata dell'esposizione,

— ordine degli accoppiamenti,

— metodo usato per stabilire l'avvenuto accoppiamento,

— metodo del sacrificio,

— criteri per l'analisi dei letali dominanti,

— relazione dose/risposta, se del caso,

▼B

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.23. TEST DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 483. Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INTRODUZIONE

Il saggio *in vivo* di aberrazione cromosomica su spermatogoni di mammifero è destinato ad identificare sostanze che causano aberrazioni cromosomiche strutturali nelle cellule spermatogoniche di mammifero (1) (2) (3) (4) (5). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi, cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni del tipo cromatidico, ma si verificano anche aberrazioni di tipo cromosomico. Il metodo non è destinato a misurare le aberrazioni numeriche e di norma non è usato a tal fine. Le mutazioni cromosomiche ed i fenomeni ad esse correlati sono causa di numerose malattie genetiche umane.

Questo saggio misura fenomeni cromosomici negli spermatogoni e pertanto dovrebbe permettere di prevedere l'induzione di mutazioni ereditabili nelle cellule germinali.

Per tale saggio si usano di norma roditori. Si tratta di test citogenetici *in vivo*, che rivelano aberrazioni cromo-somiche nelle mitosi degli spermatogoni. Altre cellule bersaglio non sono oggetto del presente saggio.

Per rilevare aberrazioni di tipo cromatidico in cellule spermatogoniche, è necessario esaminare la prima divisione cellulare mitotica dopo il trattamento, prima che tali aberrazioni scompaiano nelle successive divisioni cellulari. L'analisi dei cromosomi allo stadio della meiosi, per individuare aberrazioni cromosomiche allo stadio della diacinesi-metafase I, quando le cellule trattate diventano spermatociti, può fornire ulteriori informazioni sugli spermatogoni trattati.

Questo saggio *in vivo* è inteso a verificare se i mutageni delle cellule somatiche siano attivi anche nelle cellule germinali. Inoltre il saggio sugli spermatogoni è idoneo a valutare il rischio di mutagenicità in quanto permette di tener conto di fattori di metabolismo *in vivo*, di farmacocinetica e di processi di riparazione del DNA.

I testicoli contengono varie generazioni di spermatogoni, che presentano sensibilità diverse al trattamento chi mico. Le aberrazioni individuate rappresentano pertanto una risposta globale delle popolazioni di spermato- goni trattati, tra cui predominano le cellule spermatogoniche differenziate, più numerose. Le varie generazioni di spermatogoni sono o non sono esposte alla circolazione generale in funzione della posizione all'interno del testicolo, a causa della barriera fisica e fisiologica costituita dalle cellule di Sertoli e dalla barriera ematotestico lare.

Il test non è idoneo se è evidente che la sostanza in esame o un metabolita reattivo non raggiungono il tes suto bersaglio.

Cfr. anche Introduzione generale, pane B.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Gap: lesione acromatica di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè 3n, 4n ecc).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase della divisione cellulare, che si presenta con delezioni, riordinamenti intercromosomici e intracro-mosomici.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Gli animali sono esposti alle sostanze in esame tramite una via di esposizione adeguata e sono quindi sacrificati a tempo debito, dopo somministrazione di un inibitore della metafase (p.es. colchicina o Colcemid®). Sono poi approntate e sottoposte a un processo di colorazione preparazioni cromosomiche provenienti dalle cellule germinali, e se ne analizzano le cellule in metafase per determinare le aberrazioni cromosomiche.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Scelta delle specie animali*

Criceti cinesi e topi maschi sono gli animali più comunemente usati, ma si possono usare maschi di altre specie di mammiferi. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dello studio la variazione di peso tra gli animali deve essere minima e non superare ± 20 % del peso medio.

1.4.1.2. *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

▼B

1.4.1.4. *Preparazione delle dosi*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte diretta-mente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

11 solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

1.4.2.2. *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/-mezzo disperdente). Gli animali dei vari gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi dovrebbero produrre aberrazioni strutturali *in vivo* negli spermatogoni a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media.

Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame e che il campionamento venga effettuato una sola volta, È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	N. CAS	N. Einecs
Ciclofosfammide Ciclofosfammide monoidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cicloesilammina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Acrilammide monomerica	79-06-1	201-173-7
Trietilenmelammina	51-18-3	200-083-5

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dati precedenti dimostrino che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con aberrazioni cromosomiche sono accettabili. Si ricorra anche controlli negativi non trattati, salvo che risultati di test precedenti o dati citati in letteratura dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

▼B

1.5. PROCEDURA

1.5.1. *Numero degli animali*

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 maschi analizzabili.

1.5.2. **Protocollo di trattamento**

Le sostanze in esame sono somministrate di preferenza in un'unica volta, o in due volte. Possono essere somministrate anche in dosi frazionate, ad esempio in due volte nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo, per agevolare la somministrazione, trattandosi di un prodotto di grande volume. Se si usa una posologia diversa, se ne fornisca la motivazione scientifica.

Dopo il trattamento si proceda al prelievo di due campioni nel gruppo cui è stata somministrata la dose massima. Poiché la cinetica del ciclo cellulare può essere influenzata dalla sostanza in esame, si effettuino un campionamento precoce e uno tardivo, rispettivamente 24 e 48 ore dopo il trattamento. Per dosi diverse dalla dose massima è opportuno procedere al prelievo 24 ore dopo il trattamento, o dopo un periodo pari a 1,5 volte la durata del ciclo cellulare, salvo sia noto che un campionamento in un momento diverso è più idoneo a identificare l'effetto ricercato (6).

Si possono effettuare ulteriori prelievi. Ad esempio, per sostanze chimiche che possono indurre perdita di cromosomi o che possono esercitare effetti indipendenti dalla fase S, può essere opportuno effettuare un campionamento più precoce (1).

L'opportunità di un protocollo di trattamento ripetuto deve essere valutata caso per caso. Dopo un protocollo ripetuto gli animali devono essere sacrificati 24 ore (1,5 volte la durata del ciclo cellulare) dopo l'ultima somministrazione. Si possono usare fasi di campionamento addizionali, se opportuno.

Prima di sacrificare gli animali si inietti per via interperitoneale una dose adeguata di un inibitore della mitosi (ad esempio Colcemid® o colchicina). Gi animali saranno quindi sacrificati dopo un adeguato lasso di tempo. Per i topi si tratterà di circa 3-5 ore; per i criceti cinesi di circa 4-5 ore.

1.5.3. **Dosi**

Se si procede a uno studio per individuare l'intervallo di dosi, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie e ceppo, con il medesimo protocollo usato nel test principale (7). In caso di tossicità si usino per la prima fase di campionamento tre dosi diverse, che vadano dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali.

▼B

Sostanze con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità negli spermatogoni (ad esempio una riduzione del coefficiente mitotico alla prima e alla seconda metafase meiotica; tale diminuzione non dovrebbe essere superiore al 50 %).

1.5.4. **Test con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2 000 mg/kg di peso corporeo in dose unica o in due dosi nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Sulla base dell'esposizione umana prevista per la sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5. **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6. **Preparazione dei cromosomi**

Le sospensioni cellulari ottenute da uno o da entrambi i testicoli immediatamente dopo che l'animale è stato sacrificato sono esposte ad una soluzione ipotonica e fissate. Le cellule sono poi spalmate su vetrini e sottoposte a un processo di colorazione.

1.5.7. **Analisi**

Per ogni animale si analizzino almeno 100 cellule in metafase correttamente spalmate (cioè almeno 500 metafasi per gruppo). Tale numero può essere ridotto se si osservano numerose aberrazioni. Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di fissaggio dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase con perdita di cromosomi, le cellule esaminate devono contenere un numero di centromeri pari a $2n \pm 2$.

2. **RISULTATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati relativi ai singoli animali vanno presentati in forma di tabelle. L'unità sperimentale è l'animale. Per ciascun animale si valuti la percentuale di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali e il numero di aberrazioni per cellula. I vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, il loro numero e la loro frequenza devono essere indicati per i gruppi di trattamento e di controllo. I gap devono essere registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non vanno di norma inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni.

▼B

Se si osservano tanto mitosi che meiosi, al fine di stabilire un eventuale effetto citotossico si determini il rapporto fra le mitosi degli spermatogoni e la prima e seconda metafase meiotica per tutti gli animali trattati e per i controlli negativi, su un campione totale di 100 cellule in divisione per animale. Se si osservano solo mitosi, si determini il coefficiente mitotico in almeno 1 000 cellule per animale.

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, ad esempio un aumento del numero relativo di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche, correlato alla dose somministrata, o un palese aumento del numero di cellule con aberrazioni nei campioni, prelevati alla stessa fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose della sostanza in esame. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (8), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio *in vivo* di aberrazione cromosomica negli spermatogoni indicano che una sostanza induce aberrazioni cromosomiche nelle cellule germinali della specie sottoposta a test. Risultati negativi indicano che nelle condizioni del test la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche nelle cellule germinali della specie sottoposta a test.

Si vaglino le probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti raggiungano specificamente il tessuto bersaglio.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente,

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo usati,

— numero ed età degli animali,

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio del test, con intervallo, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

▼B

Condizioni di esperimento:

— risultati dello studio per individuare l'intervallo di dosi, se effettuato,

— criteri di selezione delle dosi,

— criteri di selezione della via di somministrazione,

— illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame,

— illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame,

— criteri di determinazione del momento del sacrificio,

— conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose di cellule analizzate per animale,

— effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso,

— dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua,

— descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento,

— metodi di misura della tossicità,

— natura e concentrazione dell'inibitore della mitosi, durata del trattamento,

— metodi di preparazione dei vetrini,

— criteri di conteggio delle aberrazioni,

— numero criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— segni di tossicità,

— coefficiente mitotico,

— tasso di mitosi degli spermatogoni in rapporto alla prima e seconda metafase meiotica,

— tipo e numero delle aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale,

— numero totale delle aberrazioni per gruppo,

— numero di cellule con aberrazioni per gruppo,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— eventuali analisi statistiche,

— dati sui controlli negativi paralleli,

— dati sui precedenti controlli negativi con intervalli, inedie e deviazioni standard,

— dati sui controlli positivi paralleli,

— eventuali cambiamenti di ploidia.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Adler, I.D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York. pp. 477-484.

(2) Adler, I.D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic *Mutagenicily Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines far Mutagenicity Testing. Report. Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res., 52,* pp. 207-209.

(6) Adler, I.D., Shelby, M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation* Res., 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland D.J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage,].R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation *of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines far Mutagenicity Testing, report, Part III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24 **SAGGIO DELLE MACCHIE (SPOT TEST): TOPI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Quello qui considerato è un saggio *in vivo* nei topi, nel quale vengono esposti alle sostanze chimiche degli embrioni in corso di sviluppo. Le cellule-bersaglio negli embrioni in corso di sviluppo sono i melanoblasti e i geni-bersaglio sono quelli che governano la pigmentazione del pelame dell'animale. Gli embrioni in corso di sviluppo sono eterozigoti per una serie di detti geni della colorazione del mantello. Una mutazione nell'allele dominante di un gene di questo tipo in un melanoblasto, o la sua perdita (tramite diversi eventi genetici) ha come risultato l'espressione del fenotipo recessivo nelle sue cellule discendenti, costituita da una macchia di colore cambiato nel mantello del topo risultante. Si riporta quindi il numero della prole con dette macchie o mutazioni, e se ne raffronta la frequenza con quella riscontrata nella prole risultante da embrioni trattati soltanto con il solvente. Il saggio delle macchie (spot test) nei topi rivela presunte mutazioni somatiche nelle cellule fetali.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Quando ciò è possibile, le sostanze in esame vengono disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. Il solvente usato non deve interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno usare preparazioni fresche della sostanza in esame.

Animali da esperimento

Si accoppiano topi del ceppo T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{ch}p/c hp; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con il ceppo HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) o con C57 BL (nonagouti, a/a). Possono essere usati anche altri incroci appropriati, ad esempio fra NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) e DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), a condizione che producano prole nonagouti.

▼B

Numero e sesso

Viene trattato un numero di femmine gravide sufficiente per ottenere un numero appropriato di prole sopravvivente per ciascun livello di dosaggio usato. Le dimensioni appropriate del campione sono determinate dal numero delle macchie osservate nei topi trattati e dalla scala dei dati di controllo. Un risultato negativo è accettabile soltanto quando si siano riscontrati almeno 300 figli di femmine trattate con la dose più alta.

Controlli positivi e negativi

È opportuno che siano disponibili dati di controllo simultanei ottenuti su topi trattati soltanto con il solvente (controlli negativi). Eventuali dati storici di controllo del medesimo laboratorio possono essere messi insieme con i dati di controllo nuovi in modo da accrescere la sensibilità del saggio, a condizione che essi siano omogenei. Se non si rileva alcuna mutagenicità per la sostanza in esame, dovrebbero essere disponibili dati di controllo positivo ottenuti di recente nel medesimo laboratorio in seguito a trattamento con una sostanza della quale sono noti gli effetti di mutagenicità con questo saggio.

Vie di somministrazione

Le vie abituali di somministrazione sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale delle femmine gravide. Nei casi in cui ciò possa essere appropriato, si fa uso anche del trattamento per inalazione o di altre vie di somministrazione.

Livelli di dose

Si fa uso di almeno due livelli di dose, con uno dei livelli che dà luogo a segni di tossicità o ad una riduzione delle proporzioni della figliata. Per le sostanze non tossiche è opportuno ricorrere all'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Viene di norma praticato un unico trattamento nel giorno 8, 9 o 10 di gravidanza, contando come giorno 1 quello in cui si è osservato per la prima volta il tappo vaginale. Detti giorni corrispondono a 7,25, 8,25 e 9,25 giorni dopo il concepimento. Possono essere praticati trattamenti successivi nel corso di detti giorni.

Analisi

La prole viene codificata e nel periodo fra tre o quattro settimane dopo la nascita si effettua su di essa l'analisi delle macchie pigmentale. Si distinguono tre categorie di macchie:

a) macchie bianche a distanza fino a 5 mm dalla linea ventrale mediana, che si presume derivino dall'uccisione di cellule (WMVS);

b) macchie gialle di tipo aguti, associate con le mammelle, gli organi genitali, le zone della gola, delle ascelle e dell'inguine e la parte mediana della fronte, che si presume derivino da difettoso differenziamento (MDS);

c) macchie pigmentate e bianche distribuite in disordine sul manto, che si presume derivino da mutazioni somatiche (RS).

▼B

Devono essere osservate tutte e tre le categorie, ma ha rilevanza genetica soltanto l'ultima, RS. Eventuali problemi per quel che riguarda la distinzione fra MDS e RS possono essere risolti mediante microscopia fluorescente di peli presi come campione.

Va presa nota di evidenti anomalie morfologiche grossolane della prole.

2. **DATI**

I dati vengono presentati sotto forma del numero totale dei discendenti esaminati e del numero dei discendenti che hanno una o più macchie da mutazione somatica presunta. I dati relativi ai trattamenti ed al controllo negativo vengono posti a raffronto secondo metodi statistici appropriati. I dati sono anche presentati su base per prole.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— ceppi usati nell'incrocio,

— numero di femmine gravide nei gruppi trattati e nei gruppi di controllo,

— dimensioni medie delle figliate nei gruppi trattati ed in quelli di controllo alla nascita ed allo svezzamento,

— livelli di dose della sostanza in esame,

— solvente usato,

— giorno di gravidanza al quale è stato praticato il trattamento,

— vie di somministrazione del trattamento,

— numero complessivo dei discendenti esaminati, e numero dei discendenti con WMVS, MDS e RS nei gruppi trattati e in quelli di controllo,

— anomalie morfologiche grossolane,

— relazione dose/risposte di RS quando ciò sia possibile,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.25 **TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

I1 saggio delle traslocazioni ereditabili nel topo rivela cambiamenti strutturali e numerici dei cromosomi nelle cellule germinali di mammiferi quali sono recuperate nella progenie della prima generazione. I tipi di mutazioni cromosomiche sono delle traslocazioni reciproche e, Se è compresa progenie femminile, la perdita del cromosoma X. I portatori di traslocazione e le femmine XO presentano fertilità ridotta e di ciò è fatto uso per la selezione di progenie F_1, per l'analisi citogenetica. Taluni tipi di traslocazioni (autosoma-X e tipo c-t) provocano sterilità completa, Le traslocazioni sono citogeneticamente osservabili in cellule meiotiche alla diacinesi della metafase I di individui di sesso maschile, che sono o maschi F_1, o figli di femmine F_1. Le femmine XO sono identificate citogeneticamente dalla presenza di 39 cromosomi soltanto nelle mitosi del midollo osseo.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in soluzione salina isoconica. Se insolubili esse vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. È fatto uso di soluzioni della sostanza in esame preparate di fresco. Se si fa uso di un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con il composto in esame né dar luogo ad effetti tossici.

Vie di somministrazione

Le vie di somministrazione sono solitamente l'intubazione orale o l'iniezione intraperitoneale. Possono essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Per la facilità della riproduzione e della verifica citologica, gli esperimenti in questione vengono effettuati sui topi. Non è necessario alcun ceppo di topi specifico. Tuttavia, nell'effettuazione di prove riguardanti la fertilità è opportuno che le dimensioni medie della figliata del ceppo usato siano di più di 8 neonati e siano inoltre relativamente costanti.

Sono usati animali sani sessualmente maturi.

▼B

Numero di animali

Il numero degli animali occorrenti dipende dalla frequenza delle traslocazioni spontanee, e dal tasso minimo di induzione necessario per un risultato positivo.

Il saggio si effettua normalmente mediante analisi della progenie maschile F_1. E opportuno esaminare almeno 500 capi di progenie maschile F_1 per ciascun gruppo/dose. Se si include progenie femminile F_1, occorrono 300 maschi e 300 femmine.

Uso di controlli negativi e positivi

Dovrebbero essere disponibili dati adeguati di controllo, derivati da controlli simultanei o storici. Qualora siano disponibili dati accettabili di controllo positivo da esperimenti condotti di recente nello stesso laboratorio, questi risultati possono essere usati in luogo del controllo positivo simultaneo.

Livelli di dose

Si sperimenta un solo livello di dose, ossia solitamente la dose più alta associata con la produzione dei minimi effetti tossici, ma senza che sia influenzato il comportamento riproduttivo o la sopravvivenza. Per stabilire una relazione dose/risposta sono necessarie due dosi supplementari più basse. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare un'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Trattamento e accoppiamento

Sono possibili due schemi di trattamento. Nello schema più largamente usato è praticata un'unica somministrazione della sostanza in esame. Si può tuttavia procedere anche all'applicazione della sostanza in esame 7 giorni per settimana per 35 giorni. Il numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato dal programma di trattamento adottato, e deve essere stabilito in modo che siano considerati tutti gli stadi delle cellule germinali trattate. Al termine del periodo di accoppiamento, le femmine vengono tenute in gabbie individuali. Quando le femmine partoriscono, si prende nota della data, del numero e del sesso della progenie. Tutta la progenie maschile viene svezzata, mentre tutta la progenie femminile viene scartata, salvo nel caso che la si includa nell'esperimento.

Controllo della eterozigosi di traslocazione

È praticato l'uno o l'altro di due metodi possibili:

— analisi della fertilità della progenie F_1 e successiva verifica degli eventuali portatori di traslocazione mediante analisi citogenetica,

— analisi citogenetica di tutta la progenie maschile F_1 senza selezione preliminare mediante analisi della fertilità.

a) Analisi della fertilità

La diminuzione della fertilità di un individuo F_1 può essere stabilita attraverso l'osservazione delle dimensioni della figliata e/o dell'analisi del contenuto uterino delle femmine accoppiate.

Devono essere stabiliti dei criteri specifici per la determinazione della fertilità normale e della fertilità diminuita nel ceppo di topi usato.

▼B

Osservazione dell'entità delle figliate: i maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono posti in gabbia individualmente con femmine del medesimo esperimento o della colonia. Le gabbie vengono ispezionate giornalmente a partire da 18 giorni dopo l'accoppiamento. Viene presa nota alla nascita dell'entità della figliata e del sesso dalla progenie F_2 e le figliate vengono successivamente scartate. Se si sottopone al saggio la progenie femminile F_1, si tiene la progenie F_2 di piccole figliate per un'ulteriore sperimentazione. Le portatrici femmine di traslocazioni sono verificate mediante analisi citogenetica di una traslocazione in uno qualsiasi dei loro discendenti maschi. Le femmine XO si riconoscono dal cambiamento del rapporto fra i sessi nella loro progenie (maschi/-femmine da 1:1 a 1:2). In un procedimento in serie si escludono gli animali F_1 normali da sperimentazioni ulteriori se la prima figliata F_2 raggiunge o supera un valore normale predeterminato, altrimenti si osserva una seconda o una terza figliata F_2.

Gli animali F_1 che non possono essere classificati come normali dopo l'osservazione di un numero di figliate F_2 fino a tre vengono saggiati ulteriormente mediante l'analisi del contenuto uterino delle femmine con essi accoppiate, oppure sono direttamente sottoposti all'analisi citogenetica.

Analisi del contenuto uterino: la diminuzione dell'entità delle figliate nei portatori di traslocazioni è dovuta a morte dell'embrione, e di conseguenza un numero elevato di impianti morti è indicativo della presenza di una traslocazione nell'animale all'esame. I maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono accoppiati con due, tre femmine ciascuno. Il concepimento viene determinato mediante ispezione giornaliera per l'osservazione di tappi vaginali fra le 8 e le 10 antimeridiane. Le femmine vengono uccise da 14 a 16 giorni dopo e viene presa nota degli impianti sia vivi che morti nei loro uteri.

b) Analisi citogenetica

Si allestiscono preparati di testicoli con la tecnica dell'essiccazione in aria. I portatori di traslocazioni sono identificati in base alla presenza di configurazioni multivalenti alla diacinesi di metafasi I degli spermatociti primari. L'osservazione di almeno due cellule con associazione multivalente costituisce la prova occorrente che l'animale sottoposto al saggio è un portatore di traslocazione.

Se non si è proceduto ad alcuna selezione nell'allevamento, sono esaminati citogeneticamente tutti i maschi F_1. Deve essere riscontrato al microscopio un minimo di 25 diacinesi metafasi I per maschio. Per i maschi F_1 con testicoli piccoli e con degradazione meiotica prima della diacinesi e per le femmine F_1 sospette di XO è necessario l'esame delle metafasi mitotiche, degli spermatogoni o del midollo osseo. La presenza di un cromosoma insolitamente lungo e/o corto in ognuna di 10 cellule è il segno di una traslocazione particolare sterile del maschio (tipo c-t). Talune traslocazioni di autosoma X che provocano la sterilità del maschio possono essere identificate soltanto raggruppando l'analisi dei cromosomi mitotici. La presenza di 39 cromosomi nella totalità di 10 mitosi è il segno di una condizione di XO in una femmina.

2. **DATI**

I dati sono presentati in forma di tabelle.

Sono riportati l'entità media delle figliate e il rapporto fra i sessi dagli accoppiamenti dei genitori alla nascita e allo svezzamento per ciascun intervallo di accoppiamento.

▼B

Per la valutazione della fertilità degli animali F_1 sono presentate le entità medie delle figliate di tutti gli accoppiamenti normali e le entità delle figliate singole dei portatori di traslocazioni F_1. Per l'analisi del contenuto uterino è dato ragguaglio del numero medio degli impianti vivi e morti degli accoppiamenti normali e del numero individuale degli impianti vivi e morti per ciascun accoppiamento di portatori di traslocazione F_1.

Per l'analisi citogenetica della diacinesi metafase I sono elencati per ciascun portatore di traslocazione il numero di tipi di configurazioni multivalenti ed il numero totale delle cellule.

Per gli individui F_1 sterili sono riportati il numero totale degli accoppiamenti e la durata del periodo di accoppiamento. Sono forniti i pesi dei testicoli e dettagli delle analisi citogenetiche.

Per le femmine XO sono riportati l'entità media delle figliate, il rapporto fra i sessi della progenie F_2 e i risultati dell'analisi citogenetica.

Se possibile i portatori di traslocazioni vengono preselezionati per mezzo di analisi della fertilità; le tabelle devono in tal caso recare l'indicazione del numero di soggetti così selezionati che sono risultati eterozigoti di traslocazione confermati.

Sono parimenti riportati i dati dei controlli negativi e degli esperimenti di controllo positivo.

3. RELAZIONE

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— ceppo dei topi, età degli animali, pesi degli animali trattati,

— numero di animali genitori dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,

— condizioni di effettuazione del saggio, descrizione particolareggiata del trattamento, livelli di dosaggio, solventi, programmi di accoppiamento,

— numero e sesso dei piccoli nati per femmina, numero e sesso dei piccoli allevati per l'analisi della traslocazione,

— tempo e criteri dell'analisi della traslocazione,

— numero e descrizione particolareggiata dei portatori di traslocazioni ivi compresi i dati riguardanti la procreazione e i dati sul contenuto uterino, se del caso,

— procedimenti citogenetici e dettagli delle analisi microscopiche, di preferenza con illustrazioni,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

▼B

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.26 TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA — STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI RODITORI

1. METODO

Questo metodo di tossicità subcronica corrisponde al TG 408 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Nella valutazione e nel giudizio delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale subcronica con dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta o con dosi ripetute per 28 giorni. Lo studio di 90 giorni fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta per un periodo di tempo prolungato che copre la maturazione post-svezzamento e la crescita, fino all'età adulta. Con questo studio si otterranno dati sui principali effetti tossici, sugli organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo, mediante i quali si potrà stimare il livello di esposizione al quale non si osservano effetti avversi, che può essere utilizzato per scegliere i livelli delle dosi per gli studi cronici e per definire i criteri di sicurezza relativi all'esposizione di soggetti umani.

Il metodo pone ulteriore enfasi sugli endpoint neurologici e fornisce un'indicazione degli effetti immunologia e riproduttivi. Si sottolinea inoltre la necessità di sottoporre gli animali ad attente osservazioni cliniche, allo scopo di ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Il presente studio dovrebbe permettere l'identificazione di sostanze chimiche che abbiano la capacità potenziale di provocare effetti neurotossici, o sul sistema immunologico) o sugli organi della riproduzione che potrebbero richiedere ulteriori indagini approfondite.

Cfr. anche introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Dose: quantità della sostanza di prova somministrata. La dose si esprime in termini di peso (g, mg) o di peso della sostanza in esame per unità di peso dell'animale sperimentale (ad esempio mg/kg), oppure in termini di concentrazioni dietetiche costanti (ppm).

Dosaggio: termine generico che comprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

NOAEL: abbreviazione di «no observed adverse effect level» (livello al quale non si osservano effetti dannosi): il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Ogni giorno, per un periodo di 90 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante il test sono sottoposti a esame necroscopico e, a conclusione del test, anche gli animali sopravvissuti vengono sacrificati e sottoposti a esame necroscopico.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.4.1. **Preparazione degli animali**

Si utilizzano solo animali sani che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali. Gli animali in esame vanno caratterizzati per specie, ceppo, origine, sesso, peso e/o età. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Le gabbie vanno disposte in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla collocazione. A ogni animale deve essere assegnato un numero di identificazione esclusivo.

1.4.2. **Preparazione delle dosi**

La sostanza di prova viene somministrata mediante sonda gastrica, oppure con la dieta o l'acqua di abbeveraggio. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale da esaminare.

Se necessario, la sostanza di prova viene disciolta o posta in sospensione in un veicolo adeguato. Dove possibile, si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione la possibilità di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, indi una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di mais) e infine una soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. Occorre inoltre determinare la stabilità della sostanza di prova nelle condizioni di somministrazione.

1.4.3. **Condizioni di esecuzione del test**

1.4.3.1. *Animali sperimentali*

La specie di elezione è il ratto, sebbene si possano utilizzare anche altre specie di roditori, come il topo. È bene usare ceppi di animali giovani adulti sani comunemente utilizzati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. La somministrazione dovrebbe iniziare al più presto possibile dopo lo svezzamento e comunque prima che gli animali abbiano raggiunto le nove settimane di vita. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi della tossicità cronica a lungo termine, è necessario usare animali dello stesso ceppo e provenienti dalla stessa origine in entrambi gli studi.

1.4.3.2. *Numero e sesso*

Per ciascun livello di dose vanno usati almeno 20 animali (dieci femmine e dicci maschi). Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero iniziale va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. In base alle precedenti conoscenze sulla sostanza chimica o su una sostanza analoga, occorre valutare la possibilità di includere un ulteriore gruppo satellite di dieci animali (cinque per sesso) nel gruppo di controllo e in quello trattato col livello di dose più elevato, allo scopo di osservare, dopo il periodo di trattamento, la reversibilità o la persistenza di eventuali effetti tossici. La durata di tale periodo post-trattamento va stabilita adeguatamente tenendo conto degli effetti osservati.

▼B

1.4.3.3. *Livelli di dose*

Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo concomitante, tranne quando si esegue un test limite (cfr. 1.4.3.4). 1 livelli di dose possono essere basati sui risultati di precedenti studi con dosi ripetute o di definizione del range e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti relativi alla sostanza in esame o a materiali analoghi. A meno che non sia limitato dalla natura fisico-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità, senza provocare il decesso o gravi sofferenze agli animali. Occorre scegliere una sequenza decrescente dei livelli di dose per poter eventualmente dimostrare la correlazione dosaggio/risposta e un NOAEL al livello di dose più basso. In genere, per definire i livelli decrescenti di dose si consiglia l'impiego di intervalli multipli di un numero compreso fra due e quattro e, spesso, l'aggiunta di un quarto gruppo sperimentale è preferibile all'uso di intervalli molto ampi (ad esempio, più di un fattore di circa 6-10) fra i dosaggi.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato oppure, se per somministrare la sostanza di prova si impiega un veicolo, trattato solo con il veicolo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo deve riceverne il volume più elevato somministrato. Se la sostanza di prova viene somministrata con la dieta e concorre a ridurre l'assunzione di cibo da parte degli animali, per distinguere fra la riduzione dovuta a questo fatto e quella determinata dalle alterazioni tossicologiche può essere utile un gruppo di controllo pair-fed.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di eventuali altri additivi: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo o ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sui consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.4.3.4. *Test limite*

Se impiegando la procedura descritta per il presente studio, un test a un livello di dose equivalente ad almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/die non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze strutturalmente affini non si prevede tossicità, ci si può esimere dal condurre uno studio completo con tre livelli di dose. Il test limite non si applica quando l'esposizione di soggetti umani indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Somministrazione delle dosi**

Le dosi della sostanza in esame devono essere somministrate quotidianamente, sette giorni alla settimana, per 90 giorni. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio (ad esempio cinque giorni alla settimana). Se si utilizza una sonda gastrica o una cannula per intubazione, la somministrazione deve avvenire in dose unica. Il volume massimo di liquido somministrabile ogni volta dipende dalle dimensioni dell'animale sperimentale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne in caso di soluzioni acquose per le quali si possono usare 2 ml/100 g di peso corporeo. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che in genere producono effetti più forti a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume da somministrare regolando! a concentrazione in modo da mantenere il volume costante a tutti i livelli di dose.

▼B

Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta si possono usare sia una concentrazione dietetica costante (ppm), sia un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale ed occorre motivare l'opzione scelta. Se si utilizza invece l'alimentazione forzata con sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno più o meno alla stessa ora, regolandola adeguatamente per mantenere la dose a un livello costante rispetto al peso corporeo dell'animale. Se lo studio sul periodo di 90 giorni è preliminare ad uno studio sulla tossicità cronica a lungo termine, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi.

1.5.2. **Osservazioni**

Il periodo di osservazione deve essere di almeno 90 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato a osservazioni di follow-up non vanno trattati per un periodo adeguato, allo scopo di individuare la persistenza o la remissione degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Occorre registrare le condizioni cliniche degli animali. Per identificare segni di morbilità e mortalità tutti gli animali vanno osservati almeno due volte al giorno, in genere all'inizio e alla fine della giornata.

Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, una volta alla settimana. Le osservazioni vanno eseguite fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'incirca allo stesso orario. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue l'esperimento. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. I segni da osservare sono almeno i seguenti: cambiamenti a livello cutaneo, del pelo, degli occhi e delle mucose, presenza di secrezioni ed escrezioni e attività neurovegetativa (ad esempio lacrimazione, piloerezione, reazioni pupillari, alterazioni della respirazione). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie (ad esempio tendenza a pulirsi eccessivamente, a girare in cerchio) e comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, deambulazione a ritroso) (1).

Prima della somministrazione della sostanza in esame e a conclusione dello studio occorre eseguire un esame oftalmologico, mediante un oftalmoscopio o analogo dispositivo idoneo, preferibilmente su tutti gli animali o comunque almeno sul gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata e sui controlli. Se si riscontrano alterazioni degli occhi è necessario esaminare tutti gli animali.

Verso la fine del periodo di esposizione e comunque non prima dell'11ª settimana si valutano i seguenti parametri: reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (1) (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (2), (3), (4), forza di presa (5) e attività motoria (6). Ulteriori particolari sulle procedure ammesse si trovano nei rispettivi riferimenti bibliografici, ma sono comunque accettabili procedure alternative.

Le osservazioni funzionali da effettuare verso la fine dello studio possono essere omesse se sono disponibili dati a questo riguardo derivati da altri studi e se le osservazioni cliniche quotidiane non hanno rivelato deficit funzionali.

▼B

Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali anche per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tale da interferire in modo significativo con l'esecuzione dei test di funzionalità.

1.5.2.1. *Peso corporeo e assunzione di cibo/acqua*

Tutti gli animali vanno pesati almeno una volta alla settimana. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua di abbeveraggio, anche il consumo di acqua va misurato almeno a cadenza settimanale. È utile tener conto del consumo di acqua anche negli studi con somministrazione mediante dieta o sonda gastrica perché potrebbe risultare alterato.

1.5.2.2. *Ematologia e biochimica clinica*

Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico e conservarli, se opportuno, in condizioni adeguate. Alla fine del test si raccolgono campioni di sangue subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali.

I seguenti esami ematologici vanno eseguiti sui campioni prelevati alla fine e nel corso del test: ematocrito, concentrazione di emoglobina, conta degli eritrociti, conta totale e differenziale dei leucociti, conta delle piastrine e misurazione del potenziale di coagulazione (tempo).

Le determinazioni di biochimica clinica per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, più specificatamente, degli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da ciascun animale subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali (salvo gli esemplari moribondi e/o sacrificati nel frattempo). Analogamente agli esami ematologici, si possono raccogliere campioni di sangue a intervalli intermedi per eseguire test di biochimica clinica. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni ([1]). Le determinazioni, nel plasma o nel siero, devono comprendere sodio, potassio, glucosio, colesterolo totale, urea, azoto ureico, creatinina, proteine totali e albumina, ed almeno tre enzimi indicativi degli effetti epatocellulari (ad esempio alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, fosfatasi alcalina, gamma-glutamil-transpeptidasi e deidrogenasi del sorbitolo). Possono essere aggiunte anche misurazioni di altri enzimi (epatici o di altra origine) e degli acidi biliari, che in alcune circostanze possono fornire utili informazioni.

A scelta, nel corso dell'ultima settimana di studio, è possibile eseguire le seguenti analisi delle urine, raccolte in tempi prestabiliti: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni da eseguire se le proprietà note della sostanza possono, o si sospetta che possano, influire sui profili metabolici sono calcio, fosforo, trigliceridi a digiuno, ormoni specifici, metaemoglobina e colinesterasi. Queste determinazioni vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

([1]) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. D'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza in esame. Se si adotta il digiuno notturno le osservazioni biochimiche cliniche vanno eseguite dopo le osservazioni funzionali.

▼B

Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

Non disponendo di sufficienti dati pregressi occorre valutare se sia necessario determinare le variabili ematologiche e di biochimica clinica prima della somministrazione: in generale non è raccomandabile che tali dati siano generati prima del trattamento (7).

1.5.2.3. *Necroscopia macroscopica*

Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necroscopia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Fegato, reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, utero, ovaie, timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e/o ponte), midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare), ghiandola pituitaria, tiroide, paratiroide, timo, esofago, ghiandole salivari, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, pancreas, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni (conservati con dilatazione e poi immersione in fissativo), aorta, gonadi, utero, annessi, ghiandola mammaria delle femmine, prostata, vescica, cistifellea (topo), linfonodi (preferibilmente un linfonodo interessato dalla via di somministrazione e un altro distante dalla via di somministrazione per coprire gli effetti sistemici), un nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, una sezione di midollo osseo (e/o un aspirato di midollo osseo fresco), cute e occhi (se gli esami oftalmologici hanno evidenziato alterazioni). I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

1.5.2.4. *Esame istopatologico*

Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo che riceve la dose più elevata vanno sottoposti a esame istopatologico completo. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche.

Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

▼B

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati devono essere forniti separatamente per ogni soggetto. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi o soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravita di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione.

I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— veicolo (se utilizzato): motivazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

2.2.2. **Specie di prova:**

— specie e ceppo usati,

— numero, età e sesso degli animali,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio del test.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— motivo della scelta del livello di dose,

— dettagli sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione dietetica, sulla concentrazione ottenuta, sulla stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— dettagli sulla somministrazione della sostanza in esame,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/die) e fattore di conversione dalla concentrazione della sostanza di prova nella dieta/acqua di abbeveraggio (ppm) alla dose effettiva, se del caso,

— particolari sulla qualità del cibo e dell'acqua.

2.2.4. **Risultati:**

— peso corporeo e cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo ed eventualmente di acqua,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi i segni di tossicità,

▼B

— natura, gravità e durata delle osservazioni cliniche (reversibili o meno),

— risultati dell'esame oftalmologico,

— valutazioni di attività sensoriale, forza di presa e attività motoria (se disponibili),

— test ematologici con i relativi valori basali,

— test biochimici clinici con i relativi valori basali,

— peso corporeo terminale, peso degli organi e rapporti tra peso degli organi e peso corporeo,

— risultati della necroscopia,

— descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici,

— dati sull'assorbimento, se disponibili,

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to.Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologie Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp.,.40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a.Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol.,.108, pp. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore-and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1. pp. 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in.Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA — STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI NON RODITORI**

1. **METODO**

Questo metodo di tossicità orale subcronica corrisponde al TG 409 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Nella valutazione e nel giudizio delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale subcronica con dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta o con dosi ripetute per 28 giorni. Lo studio di 90 giorni fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta in un periodo di rapida crescita, fino alla giovane età adulta. Con questo studio si otterranno dati sui principali effetti tossici, sugli organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo, mediante i quali si potrà stimare il livello di esposizione al quale non si osservano effetti avversi che può essere utilizzato per scegliere i livelli delle dosi per gli studi cronici e per definire i criteri di sicurezza relativi all'esposizione di soggetti umani.

Il metodo di test consente di identificare gli effetti avversi dell'esposizione a sostanze chimiche in specie di non roditori e va usato solo:

— nei casi in cui gli effetti osservati in altri studi indichino la necessità di procedere ad un chiarimento o ad una caratterizzazione in un secondo test su specie di non roditori, oppure

— nei casi in cui gli studi tossicocinetici indichino che sia meglio utilizzare una particolare specie di non roditori, oppure

— nei casi in cui altri motivi specifici giustifichino l'uso di una specie di non roditori.

Cfr. anche introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Dose: quantità della sostanza di prova somministrata. La dose si esprime in termini di peso (g, mg) o di peso della sostanza in esame per unità di peso dell'animale sperimentale (ad esempio mg/kg), oppure in termini di concentrazioni dietetiche costanti (ppm).

Dosaggio: termine generico che comprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

NOAEL: abbreviazione di «no observed adverse effect level» (livello al quale non si osservano effetti dannosi): il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Ogni giorno, per un periodo di 90 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante il test sono sottoposti a esame necroscopico e, a conclusione del test, anche gli animali sopravvissuti vengono sacrificati e sottoposti a esame necroscopico.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.4.1. **Selezione delle specie di animali**

La specie di non roditori comunemente utilizzata è il cane, preferibilmente di razza definita: spesso si utilizza la razza beagle, è possibile utilizzare anche altre specie, come il maiale, il mini-pig ed altri. Si raccomanda di non utilizzare primati, la cui scelta va motivata. Si utilizzano animali giovani e sani e, nel caso del cane, la somministrazione deve iniziare preferibilmente a 4-6 mesi e comunque entro il 9° mese di vita. Per gli studi preliminari a studi della tossicità cronica a lungo termine, è necessario usare la stessa specie o la stessa razza in entrambi gli studi.

1.4.2. **Preparazione degli animali**

Si utilizzano solo animali sani e giovani che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali. La durata dell'acclimatazione dipende dalla specie selezionata per il test e dalla sua origine. Si raccomanda un periodo di almeno 5 giorni per cani o maiali di una colonia residente allevati a scopo sperimentale, e di almeno 2 settimane per gli stessi animali provenienti da fonti esterne. Gli animali sperimentali vanno caratterizzati per specie, ceppo, origine, sesso, peso e/o età. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Le gabbie vanno disposte in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. A ogni animale deve essere assegnato un numero di identificazione esclusivo.

1.4.3. **Preparazione delle dosi**

La sostanza in esame può essere somministrata nella dieta o nell'acqua di abbeveraggio, mediante sonda gastrica o in capsule. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale in esame.

Se necessario, la sostanza di prova viene disciolta o posta in sospensione in un veicolo adeguato. Dove possibile, si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione la possibilità di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, indi una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di mais) e infine una soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. Occorre determinare inoltre la stabilità della sostanza di prova nelle condizioni di somministrazione.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Numero e sesso degli animali**

Per ciascun livello di dose vanno usati almeno otto animali (quattro femmine e quattro maschi). Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Il numero di animali al termine dello studio deve essere tale da consentire di effettuare una valutazione significativa degli effetti tossici. In base alle precedenti conoscenze sulla sostanza chimica o su una sostanza analoga, occorre valutare la possibilità di includere un ulteriore gruppo satellite di otto animali (quattro per sesso) nel gruppo di controllo e in quello trattato col livello di dose più elevato, allo scopo di osservare, dopo il periodo di trattamento, la reversibilità o la persistenza di eventuali effetti tossici. La durata di tale periodo post-trattamento va stabilita adeguatamente tenendo conto degli effetti osservati.

▼B

1.5.2. **Dosaggio**

Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo concomitante, tranne quando si esegue un test limite (cfr. 1.5.3). I livelli di dose possono essere basati sui risultati di precedenti studi con dosi ripetute o di definizione del rango e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi al composto in esame o a materiali analoghi. A meno che non sia limitato dalla natura fisico-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità, senza provocare il decesso o arrecare gravi sofferenze. Occorre scegliere una sequenza decrescente dei livelli di dose per poter eventualmente dimostrare la correlazione dosaggio/risposta e un NOAEL al livello di dose più basso. In genere, per definire i livelli decrescenti di dose è ottimale l'impiego di intervalli multipli di un numero compreso fra due e quattro e, spesso, l'aggiunta di un quarto gruppo sperimentale è preferibile all'uso di intervalli molto ampi (ad esempio, più di un fattore di circa 6-10) fra i dosaggi.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato oppure, se per somministrare la sostanza di prova si impiega un veicolo, trattato solo con il veicolo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo deve riceverne il volume più elevato somministrato. Se la sostanza di prova viene somministrata con la dieta e concorre a ridurre l'assunzione di cibo da parte degli animali, per distinguere fra la riduzione dovuta a questo fatto e quella determinata dalle alterazioni tossicologiche può essere utile un gruppo di controllo pair-fed.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di eventuali altri additivi: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo o ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.5.3. **Test limite**

Se, impiegando la procedura descritta per il presente studio, un test a un livello di dose equivalente ad almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/die non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze strutturalmente affini, non si prevede tossicità, ci si può esimere dal condurre uno studio completo con tre livelli di dose. Il test limite non si applica quando l'esposizione di soggetti umani indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

1.3.4. **Somministrazione delle dosi**

Le dosi della sostanza in esame devono essere amministrate quotidianamente, sette giorni alla settimana, per 90 giorni. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio (ad esempio cinque giorni alla settimana). Se si utilizza una sonda gastrica o una cannula per intubazione, la somministrazione deve avvenire in dose unica. Il volume massimo di liquido somministrabile ogni volta dipende dalle dimensioni dell'animale sperimentale e di norma va mantenuto al minimo possibile. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che in genere producono effetti più forti a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume da somministrare regolando la concentrazione in modo da mantenere il volume costante a tutti i livelli di dose.

▼B

Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta si possono usare sia una concentrazione dietetica costante (ppm), sia un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale ed occorre motivare l'opzione scelta. Se si utilizza invece l'alimentazione forzata mediante sonda gastrica o se si somministrano capsule, la dose va somministrata ogni giorno più o meno alla stessa ora, regolandola adeguatamente per mantenere la dose a un livello costante rispetto al peso corporeo dell'animale. Se lo studio sul periodo di 90 giorni è preliminare ad uno studio sulla tossicità cronica a lungo termine, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi.

1.5.5. **Osservazioni**

Il periodo di osservazione deve essere di almeno 90 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato a osservazioni di follow-up non vanno trattati per un periodo adeguato, allo scopo di individuare la persistenza o la remissione degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Occorre registrare le condizioni cliniche degli animali. Per identificare segni di morbilità e mortalità tutti gli animali vanno osservati almeno due volte al giorno, in genere all'inizio e alla fine della giornata.

Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, una volta alla settimana. Le osservazioni vanno eseguite, se fattibile, fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'inarca allo stesso orario. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. I segni di tossicità, compresi il momento dell'esordio, il grado e la durata, vanno accuratamente registrati. I segni da osservare sono almeno i seguenti: cambiamenti a livello cutaneo, del pelo, degli occhi e delle mucose, presenza di secrezioni ed escrezioni e attività neurovegetativa (ad esempio lacrimazione, piloerezione, reazioni pupillari, alterazioni della respirazione). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie (ad esempio tendenza a pulirsi eccessivamente, a girare in cerchio) e qualsiasi comportamento insolito.

Prima della somministrazione della sostanza in esame e a conclusione dello studio occorre eseguire un esame oftalmologico, mediante un oftalmoscopio o analogo dispositivo idoneo, preferibilmente su tutti gli animali o comunque almeno sul gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata e sui controlli. Se si riscontrano alterazioni degli occhi correlate al trattamento è necessario esaminare tutti gli animali.

1.5.5.1. *Peso corporeo e assunzione di cibo/acqua*

Tutti gli animali vanno pesati almeno una volta alla settimana. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua di abbeveraggio, anche il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale. È utile tener conto del consumo di acqua anche negli studi con somministrazione mediante dieta o sonda gastrica perché potrebbe risultare alterato.

▼B

1.5.5.2. *Ematologia e biochimica clinica*

Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico e conservarli, se opportuno, in condizioni adeguate. Alla fine del test si raccolgono campioni di sangue subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali.

Gli esami ematologici, compresi ematocrito, concentrazione di emoglobina, conta degli eritrociti, conta totale e differenziale dei leucociti, conta delle piastrine e una misurazione del potenziale di coagulazione scelta tra tempo dì coagulazione, tempo di protrombina o tempo di tromboplastina, vanno eseguiti all'inizio dello studio e successivamente a intervalli mensili o a metà del periodo di test e infine alla conclusione del test.

Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, gli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da tutti gli animali all'inizio dello studio, poi a intervalli mensili o a metà del test, e infine a conclusione del periodo di test. Gli elementi da valutare sono l'equilibrio elettrolitico, il metabolismo dei carboidrati e la funzionalità epatica e renale. La scelta di test specifici sarà influenzata dalle osservazioni sulla modalità di azione della sostanza di prova. Prima della raccolta dei campioni di sangue, gli animali vanno lasciati a digiuno per un periodo adeguato alla specie. Si consiglia di determinare calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno, alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, ornitindecarbossilasi, gamma-glutamil-transpeptidasi, azoto ureico, albumina, creatininemia, bilirubina totale e proteine sieriche totali.

L'analisi delle urine va effettuata almeno all'inizio dello studio e successivamente a metà e alla conclusione, raccogliendo le urine in tempi prestabiliti. Le determinazioni da effettuare comprendono aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche. Se necessario, per ampliare lo studio dell'effetto o degli effetti osservato/i è possibile impiegare ulteriori parametri.

È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni che possono rendersi necessario per un'adeguata valutazione tossicologica comprendono le analisi dei lipidi, degli ormoni, equilibrio acidi/basi, metaemoglobina e inibizione della colinesterasi. Se necessario, per ampliare lo studio degli effetti osservati è possibile effettuare ulteriori esami biochimici clinici. Queste determinazioni vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

1.5.5.3. *Necroscopia macroscopica*

Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necroscopia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Fegato (compresa la cistifellea), reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, ovaie, utero, tiroide (con paratiroidi), timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

▼B

I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e/o ponte), midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare), ghiandola pituitaria, occhi, tiroide, paratiroide, timo, esofago, ghiandole salivari, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, cistifellea, pancreas, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni, aorta, gonadi, utero, annessi, ghiandola mammaria delle femmine, prostata, vescica, linfonodi (preferibilmente un linfonodo interessato dalla via di somministrazione e un altro distante dalla via di somministrazione per coprire gli effetti sistemici), un nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, una sezione di midollo osseo (e/o un aspirato di midollo osseo fresco) e cute. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

1.5.5.4. *Esame istopatologico*

Vanno sottoposti a esame istopatologico completo gli organi e i tessuti conservati di almeno tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo che riceve la dose più elevata. Si procede a questo esame anche sugli animali degli altri gruppi qualora nel gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche.

Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

2. DATI E RELAZIONE

2.1. DATI

I dati devono essere forniti separatamente per ogni soggetto. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione.

I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

▼B

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— veicolo (se utilizzato): motivazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

2.2.2. **Specie di prova:**

— specie e ceppo usati,

— numero, età e sesso degli animali,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio del test.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— motivo della scelta del livello di dose,

— dettagli sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione dietetica, sulla concentrazione ottenuta, sulla stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— dettagli sulla somministrazione della sostanza in esame,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/die) e fattore di conversione dalla concentrazione della sostanza di prova nella dieta/acqua di abbeveraggio (ppm) alla dose effettiva, se del caso,

— particolari sulla qualità del cibo e dell'acqua.

2.2.4. **Risultati:**

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo, ed eventualmente di acqua,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità,

— natura, gravità e durata delle osservazioni cliniche (reversibili o meno),

— esame oftalmologico,

— test ematologici con i relativi valori basali,

— test biochimici cimici con i relativi valori basali,

— peso corporeo terminale, peso degli organi e rapporti tra peso degli organi e peso corporeo,

— risultati della necroscopia,

— descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici,

— dati sull'assorbimento, se disponibili,

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

▼B

B.28 **SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza sperimentale viene applicata quotidianamente alle cute in dosi scalari a vari gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio vengono sottoposti a necroscopia, ed alla conclusione della prova anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento ed alimentazione per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo. Poco prima dell'inizio dell'esperimento gli animali da trattare vengono tosati nella zona dorsale del tronco. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima del saggio. La tosatura o la rasatura usualmente deve essere ripetuta ad intervalli approssimativamente settimanali. Durante la tosatura o la rasatura del pelo, occorre fare attenzione a non scorticare la pelle. La superficie corporea da trattare per l'applicazione della sostanza in esame non dovrebbe essere inferiore al 10 % del totale. Il peso dell'animale dovrebbe essere preso in considerazione quando si decidono le dimensioni delle superficie da liberare dal pelo e dalla copertura. Quando si saggiano solidi, che possono essere polverizzati se del caso, la sostanza in esame dovrebbe essere umidificata sufficientemente con l'acqua o, se necessario, con un veicolo adatto per assicurare un buon contatto con la pelle. Le sostanze in esame liquide sono in genere usate non diluite. L'applicazione quotidiana si estenderà da 5 a 7 giorni per settimana.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Si possono utilizzare esemplari adulti di ratto, coniglio o cavia. Altre specie possono essere utilizzate, ma il loro uso richiede una giustificazione. All'inizio del saggio, la gamma di variazione del peso dovrebbe essere ± 20 % del peso medio. Quando uno studio di tossicità subcronica cutanea viene condotto come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo.

▼B

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 maschi e 10 femmine) con pelle sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero totale dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Livelli di dose

Almeno tre livelli di dose con un controllo o un controllo del veicolo, se si utilizza un veicolo, sono richiesti. Il periodo di esposizione dovrebbe essere di almeno 6 ore al giorno. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere eseguita ogni giorno alla stessa ora e la quantità di sostanza applicata dovrebbe essere aggiustata a intervalli (settimanali o bisettimanali) per mantenere un livello costante di dose in termini di peso corporeo dell'animale. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico ai soggetti dei gruppi trattati. Quando per facilitare il dosaggio si usa un veicolo, il gruppo di controllo del veicolo dovrebbe essere sottoposto a dosaggio come i gruppi trattati, e ricevere la stessa quantità che riceve il gruppo a livello di dose più elevata. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma produrre pochi o nessun decesso. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Quando esista una valutazione utile di esposizione umana, il livello più basso dovrebbe superare questo valore. Idealmente, il livello di dose intermedio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici. Nei gruppi trattati con livello di dose basso, intermedio e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrà essere bassa e tale da permettere una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame produce irritazioni gravi della pelle, le concentrazioni dovrebbero essere ridotte e ciò può provocare una riduzione, o l'assenza, di altri effetti tossici al livello di dose elevato. Sela pelle è stata gravemente danneggiata, può rendersi necessaria l'interruzione dello studio, Si procederà quindi a un nuovo studio con concentrazione più basse.

Saggio limite

Se uno studio preliminare con livello di dose di 1 000 mg/kg o un livello di dose più elevato in relazione a una possibile esposizione umana, quando questa sia nota, non produce effetti tossici, ulteriori prove possono non essere considerate necessarie.

Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere osservati quotidianamente per individuare eventuali segni di tossicità. Il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità dovrebbero essere registrati.

▼B

Procedimento

Gli animali dovrebbero essere ingabbiati individualmente e sottoposti a trattamento con la sostanza in esame, idealmente 7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni.

Gli animali appartenenti a ciascun gruppo satellite previsto per ulteriori osservazioni dovrebbero essere mantenuti ancora per 28 giorni per individuare i sintomi di guarigione oppure di persistenza degli effetti tossici. Il tempo di esposizione dovrebbe essere 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area che è approssimativamente il 10 % della superficie corporea totale. Con sostanze molto tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma deve comunque essere coperta da uno strato più uniforme e più sottile possibile.

Durante l'esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto con la pelle da una fascia porosa di garza e da un nastro non irritante. La superficie cutanea su cui è applicata la sostanza dovrebbe essere coperta opportunamente in modo da trattenere la fascia e la sostanza in esame, per evitare un'eventuale ingestione da parte degli animali della sostanza in esame. Si può ricorrere a mezzi per limitare i movimenti dell'animale, ma l'immobilizzazione completa non è un metodo raccomandato.

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza in esame residua dovrebbe essere rimossa, ove possibile, con l'uso di acqua o con qualche altro metodo appropriato per pulire la pelle.

Tutti gli animali dovrebbero essere quotidianamente sottoposti a osservazione e si dovrebbe registrare i segni di tossicità, incluso il tempo d'insorgenza, l'intensità e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, nonché del sistema nervoso centrale e autonomo, del sistema respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi non siano persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti dei gruppi di trattamento non satelliti sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza sperimentale e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali, o perlomeno su quelli a cui vengono somministrati il dosaggio elevato, e infine al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti negli occhi, tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misurazione del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o il conteggio delle piastrine;

▼B

c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di studio, ritenute opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione di prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutamminico-piruvica transaminasi serica ([1]), glutammico-ossalacetico transaminasi serica ([2]), ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se necessarie, per estendere la ricerca di effetti osservati;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi sia una indicazione basata sulla tossicità prevista o osservata.

Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli devono essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni macroscopiche; cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, (trachea), polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato, milza, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori, cistifellea (se esiste), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), (sterno con midollo osseo), (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare) e (ghiandole lacrimali esorbitali). I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo bersaglio coinvolto.

Esame istopatologico

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulla cute normale e sulla cute trattata, e sugli organi e tessuti degli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;

b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;

([1]) Ora nota come alanina-aminotransferasi serica.
([2]) Ora nota come appartato-aminotransferasi serica.

▼B

c) gli organi bersaglio dovrebbero essere esaminati anche nei gruppi trattati con altre dosi;

d) quando si usano i ratti, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei polmoni degli animali dei gruppi trattati con dosaggi bassi e intermedi per l'individuazione di infezioni poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dosi elevate;

e) quando si fa uso di un gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei tessuti e degli organi che presentano lesioni in altri gruppi trattati.

2. **DATI**

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale degli animali che presentano ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta,

— condizione sperimentali,

— livello di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose,

— livello senza effetto, quando possibile,

— tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,

— tempo di osservazione di ogni segno anormale e successivo decorso,

— dati di alimentazione e sul peso corporeo,

— risultati oftalmologici,

— analisi ematologiche usate e risultati completi,

— analisi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine),

— risultati della necroscopia,

▼B

— descrizione particolareggiata di tutti di risultati istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼M4

B.29. TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 90 GIORNI

SINTESI

Il presente metodo di prova rivisto B.29 è stato concepito per caratterizzare pienamente la tossicità per inalazione della sostanza per una durata subcronica (90 giorni) e fornire dati affidabili per valutazioni quantitative dei rischi legati all'inalazione. Dei gruppi di roditori, composti da almeno 10 maschi e 10 femmine, sono esposti per 6 ore al giorno per 90 giorni (13 settimane) a: a) la sostanza in esame a tre livelli di concentrazione o più; b) all'aria filtrata (controllo negativo); e/o c) al veicolo (gruppi di controllo del veicolo). Di norma gli animali sono esposti alla sostanza in esame per 5 giorni la settimana ma è possibile anche esporli 7 giorni su 7. Vengono sempre testati sia maschi che femmine, ma possono essere esposti a livelli di concentrazione diversi se uno dei due sessi è notoriamente più sensibile ad una determinata sostanza. Per caratterizzare in modo più adeguato la tossicità della sostanza in esame, il presente metodo consente al responsabile dello studio di includere dei gruppi satellite (reversibilità), sacrifici intermedi, lavaggio bronchioalveolare (BAL), esami neurologici e ulteriori valutazioni istopatologiche o di patologia clinica.

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche 413 (2009). La prima linea guida dell'OCSE sulla tossicità subcronica per inalazione n. 413 è stata adottata nel 1981 (1). Questo metodo di prova B.29 (che corrisponde alla linea guida n. 413 rivista del 2009) è stato aggiornato per tenere conto dei progressi scientifici e rispondere alle esigenze normative attuali e future.

2. Gli studi di tossicità subcronica per inalazione sono utilizzati principalmente per calcolare le concentrazioni stabilite dalla normativa per valutare i rischi per i lavoratori nell'ambiente professionale. Servono anche a valutare i rischi per le persone nelle abitazioni, i trasporti e l'ambiente. Il presente metodo consente di caratterizzare gli effetti avversi risultanti da un'esposizione quotidiana ripetuta, per inalazione, ad una sostanza per 90 giorni (che corrisponde a circa 10 % della durata di vita di un ratto). I dati tratti dagli studi sulla tossicità subcronica per inalazione possono servire per le stime quantitative dei rischi e la scelta delle concentrazioni negli studi di tossicità cronica. Il presente metodo di prova non è destinato specificatamente ai test sui nanomateriali. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono riportate alla fine del capitolo e nel documento di orientamento n. 39 (2).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

3. Il laboratorio deve tenere conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di svolgere la prove, in modo da migliorare la qualità dello studio e ridurre al minimo l'utilizzo di animali. Tre le informazioni utili per la scelta delle concentrazioni adeguate si annoverano: l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo; gli impieghi previsti o i rischi di esposizione umana, i dati (Q)SAR disponibili e i dati tossicologici in merito a sostanze chimiche di struttura affine; o dati tratti da altri studi di esposizione ripetuta. Se nel corso dello studio si prevedono o si constatano effetti neurotossici, il responsabile dello studio può decidere di includere le valutazioni ritenute necessarie e anche una serie di osservazioni funzionali (*functional observational battery* — fob) e misurazioni dell'attività motoria. Lo svolgimento di questi esami aggiuntivi non interferisce con l'impostazione di base dello studio, anche se la durata delle esposizioni può essere fondamentale in relazione ad alcuni esami specifici.

▼M4

4. Le diluzioni di sostanze corrosive o irritanti possono essere saggiate a concentrazioni che consentono di conseguire il grado di tossicità auspicato. Per ulteriori informazioni si invita a consultare il documento di orientamento n. 39 (2). Nell'esposizione degli animali a questa sostanze, le concentrazioni auspicate devono essere sufficientemente basse da non provocare dolore e stress intensi, pur essendo sufficienti a prolungare la curva concentrazione-risposta fino a dei livelli corrispondenti all'obiettivo scientifico e regolamentare della prova. La scelta di queste concentrazioni deve avvenire caso per caso, di preferenza in base ad uno studio di tipo range finding adeguatamente impostato che fornisca informazioni sull'endpoint critico, le eventuali soglie di irritazione e il momento dell'insorgenza degli effetti (cfr. paragrafi da 11 a 13). Occorre fornire la giustificazione della scelta delle concentrazioni.

5. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia. Gli animali moribondi sono considerati alla stregua degli animali che muoiono nel corso della prova. I criteri da applicare per decidere in merito all'eutanasia degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di un documento d'orientamento dell'OCSE, che contiene anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (3).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

6. Si devono utilizzare roditori adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La specie preferita è il ratto. In caso di utilizzo di un'altra specie è necessario motivarne la scelta.

Preparazione degli animali

7. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Il giorno della randomizzazione gli animali selezionati devono essere giovani adulti di età compresa tra 7 e 9 settimane. Il loro peso corporeo non deve superare di ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova, affinché si acclimatino alle condizioni di laboratorio,.

Condizioni di allevamento degli animali

8. Gli animali devono essere identificati individualmente, possibilmente mediante dispositivi subcutanei al fine di agevolarne l'osservazione e evitare qualsiasi confusione. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ± 3 °C. L'umidità relativa va idealmente mantenuta tra 30 e 70 %, anche se ciò potrebbe non essere possibile quando si utilizza l'acqua come veicolo. Prima e dopo l'esposizione, gli animali sono generalmente tenuti in gabbia, suddivisi per sesso e concentrazione, ma il numero di animali per gabbia non deve interferire con un'agevole osservazione di ogni singolo animale e deve ridurre al minimo le perdite dovute a cannibalismo e combattimenti. Se l'esposizione avviene «a naso solo», potrebbe essere necessario abituarli ai dispositivi di contenzione, che non devono provocare agli animali eccessivi stress fisici, termici o dinamici. La contenzione può incidere sui parametri fisiologici, come la temperatura corporea (ipertermia) e/o il volume respiratorio al minuto. Se si dispone di dati generici che dimostrano che nessuna di queste alterazioni avviene a un livello apprezzabile, il periodo di adattamento ai dispositivi di contenzione non è necessario. Gli animali esposti «a corpo intero» ad un aerosol devono essere stabulati separatamente per la durata dell'esposizione per evitare che filtrino l'aerosol attraverso il pelo degli altri animali presenti nella gabbia. Salvo nei periodi di esposizione, gli animali possono essere nutriti in base a diete convenzionali e certificate da laboratorio, accompagnate da acqua potabile a volontà. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità.

▼M4

Camere di inalazione

9. La scelta della camera di inalazione dipende dalla natura della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Il metodo preferito di esposizione è quello per via nasale (con cui s'intende l'esposizione unicamente della testa, del naso o del muso). Di norma si predilige l'esposizione per via nasale per gli studi di aerosol liquidi o solidi e di vapori che si possono condensare sotto forma di aerosol. L'esposizione «a corpo intero» può essere più indicata per conseguire obiettivi di studio particolari, ma tale scelta deve essere giustificata nella relazione sullo studio. Per garantire la stabilità atmosferica di una camera di esposizione «a corpo intero», il volume complessivo degli animali sottoposti alla prova non deve superare il 5 % del volume della camera. Il documento di orientamento n. 39 (2) descrive i principi delle tecniche di esposizione «a corpo intero» e per sola via nasale, nonché i relativi vantaggi e svantaggi.

STUDI DI TOSSICITÀ

Concentrazioni limite

10. A differenza degli studi di tossicità acuta, per gli studi di tossicità subcronica per inalazione non è definita la concentrazione massima. La concentrazione massima testata deve tenere conto di: 1) la concentrazione massima raggiungibile; 2) il livello di esposizione umana corrispondente al «peggiore dei casi»; 3) la necessità di mantenere un'adeguata alimentazione di ossigeno; e/o 4) il benessere degli animali. In assenza di limiti basati sui dati, si possono utilizzare i valori limite del regolamento (CE) n. 1272/2008 (13) (ossia una concentrazione massima di 5 mg/l per gli aerosol, di 20 mg/l per i vapori e 20 000 ppm per i gas); cfr. documento di orientamento n. 39 (2). Qualora sia necessario superare questi valori limite, per le prove con gas o sostanze fortemente volatili (ad esempio i refrigeranti), occorre giustificare questo superamento. La concentrazione limite deve provocare una chiara tossicità, senza causare stress eccessivo per gli animali né incidere sulla loro longevità (3).

Studio per la determinazione dell'intervallo di dosi (*range finding*)

11. Prima di iniziare lo studio principale, è di norma necessario effettuare uno studio preliminare di tipo range finding. Uno studio di questo tipo è più completo di uno studio di osservazione perché non si limita alla scelta delle concentrazioni. Le conoscenze acquisite grazie a questo tipo di studio possono determinare il buon esito dello studio principale. Uno studio per determinare l'adeguato intervallo di dosi può, ad esempio, fornire informazioni tecniche sul metodo di analisi, la dimensione delle particelle, la scoperta di meccanismi di tossicità, i dati istopatologici e di patologia clinica e le stime circa le concentrazioni NOAEL e MTC nello studio principale. Il responsabile dello studio può decidere di utilizzare uno studio di tipo range finding per individuare: la soglia di irritazione dell'apparato respiratorio (ad esempio mediante istopatologia dell'apparato respiratorio, test sulla funzionalità polmonare e lavaggi broncoalveolari), la concentrazione più alta tollerata dagli animali senza provocare stress eccessivo e i parametri che permetteranno di caratterizzare al meglio la tossicità della sostanza in esame.

12. Uno studio per la determinazione degli intervalli di dose può comportare uno o più livelli di concentrazione. In funzione degli effetti da misurare selezionati si devono esporre da tre a sei maschi e da tre a sei femmine a ciascun livello di concentrazione. Lo studio in questione deve durare da un minimo di 5 giorni ad un massimo di 28 giorni. Nella relazione sullo studio è opportuno illustrare la ragione della scelta delle concentrazioni per lo studio principale. il cui scopo è dimostrare una relazione concentrazione-risposta sulla base dell'endpoint ritenuto a priori più sensibile La concentrazione inferiore deve essere del tipo NOAEL mentre la concentrazione più elevata deve comportare una chiara tossicità, senza causare stress eccessivo per gli animali né incidere sulla loro longevità (3).

▼M4

13. Nello studio di tipo range finding, al momento della scelta dei livelli di concentrazione occorre tener conto di tutte le informazioni disponibili, anche quelle relative alle relazioni struttura-attività e i dati concernenti sostanze chimiche analoghe (cfr. paragrafo 3). Lo studio di determinazione dell'intervallo di dosi può confermare o invalidare la scelta degli endpoint ritenuti più sensibili secondo criteri meccanicisti, come l'inibizione della colinesterasi dovuta a organofosfati, la formazione di metaemoglobine da parte di agenti eritrotossici, gli ormoni tiroidei (T_3 e T_4) per i tireotossici, le proteine, la LDH, i neutrofili nei lavaggi broncoalveolari nel caso di particelle inoffensive scarsamente solubili o di aerosol irritanti per i polmoni.

Studio principale

14. Uno studio principale di tossicità subcronica di norma comprende tre livelli di concentrazione e, parallelamente, controlli negativi (aria) e/o del veicolo, se necessario (cfr. paragrafo 18). Per scegliere i livelli di esposizione adeguati, occorre avvalersi di tutte le informazioni disponibili, ivi compresi i risultati degli studi di tossicità sistemica, studi sul metabolismo e la cinetica (occorre fare il possibile per evitare livelli di concentrazione elevati caratterizzati da processi cinetici di saturazione). Ogni gruppo comprende 20 roditori (10 maschi e 10 femmine) che sono esposti alla sostanza in esame per 6 ore al giorno, 5 giorni la settimana per 13 settimane (per una durata totale dello studio di 90 giorni). Gli animali possono anche essere esposti per 7 giorni su 7 (ad esempio nel caso di prove su prodotti farmaceutici inalati). Se uno dei due sessi è notoriamente più sensibile alla sostanza in esame, i livelli di concentrazione possono differire secondo il sesso al fine di ottimizzare la concentrazione-risposta come indicato al paragrafo 15. Se per l'esposizione «a naso solo» s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è possibile adeguare la durata massima d'esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. La scelta di una durata di esposizione inferiore a 6 ore o superiore (ad esempio 22 ore al giorno) deve essere debitamente motivata. [cfr. il documento di orientamento n. 39 (2)]. Durante il periodo di esposizione l'alimentazione va sospesa, a meno che l'esposizione quotidiana sia superiore a 6 ore. Nel corso dell'esposizione «a corpo intero» si può continuare a somministrare acqua.

15. Le concentrazioni bersaglio selezionate devono consentire di individuare l'organo o gli organi bersaglio e di evidenziare una concentrazione-risposta chiara.

— Il livello di concentrazione elevato deve produrre effetti tossici senza provocare segni persistenti o la morte che impedirebbero una valutazione significativa dei risultati

— Il o i livelli di concentrazione medi devono essere intervallati in modo da produrre una graduazione degli effetti tossici tra la bassa e l'alta concentrazione

— Il livello di dose inferiore non deve produrre effetti tossici o al massimo effetti poco rilevanti.

Sacrifici intermedi

16. Se si prevedono sacrifici intermedi, ad ogni esposizione il numero di animali deve essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Occorre fornire la giustificazione del ricorso ai sacrifici intermedi di cui si deve tenere adeguatamente conto nelle analisi statistiche.

▼M4

Studio di gruppi satelliti (studio di reversibilità)

17. Uno studio di reversibilità può essere utilizzato per evidenziare il carattere reversibile persistente o ritardato della tossicità, per un periodo post-trattamento di una durata adeguata, e comunque di almeno 14 giorni. I gruppi satellite sono costituiti da 10 maschi e 10 femmine esposti contemporaneamente agli animali in esame nell'ambito dello studio principale. Questi gruppi devono essere esposti alla concentrazione più elevata della sostanza in esame. Sarebbe opportuno utilizzare anche un gruppo di controllo dell'aria e/o un gruppo di controllo del mezzo (cfr. paragrafo 18).

Animali di controllo

18. Gli animali del controllo negativo (aria) devono essere trattati come gli animali del gruppo soggetto alla prova, con la sola differenza che sono esposti ad aria filtrata e non alla sostanza in esame. Quando per produrre l'atmosfera di prova si utilizza acqua o un'altra sostanza, occorre integrare nello studio un gruppo di controllo del veicolo al posto del gruppo di controllo negativo (aria). Laddove possibile è opportuno utilizzare l'acqua come veicolo. In tal caso, gli animali del gruppo di controllo devono essere esposti all'aria caratterizzata dalla stessa umidità relativa dell'aria del gruppo in esame. La selezione di un veicolo adeguato deve basarsi su dati dello studio preliminare o storici adeguati. Qualora non si disponga di informazioni sufficienti sulla tossicità di un veicolo, il responsabile dello studio può utilizzare un gruppo di controllo negativo (aria) e un gruppo di controllo del veicolo, anche se questa opzione è vivamente sconsigliata. Se i dati storici indicano che un veicolo non è tossico, non occorre ricorrere a un gruppo di controllo negativo (aria) ma basta utilizzare un gruppo di controllo del veicolo. Se uno studio preliminare effettuato su una sostanza in esame incorporata in un veicolo non evidenzia nessuna tossicità, significa che il veicolo non è tossico alla concentrazione testata e che si deve utilizzare questo gruppo di controllo del veicolo.

CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Somministrazione delle concentrazioni

19. Gli animali sono esposti alla sostanza in esame sotto forma di gas, vapore, aerosol o una loro miscela. Lo stato fisico da testare dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, dalle concentrazioni prescelte e/o dalla forma fisica nella quale è più probabile che si presenti nel corso della manipolazione e dell'utilizzo. Le sostanze igroscopiche e reattive dal punto di vista chimico devono essere testate in atmosfera secca. Occorre prestare attenzione al fine di evitare concentrazioni esplosive. Per ridurre la granulometria, il materiale particolato può essere sottoposto a processi meccanici. Ulteriori informazioni sono riportate nel documento di orientamento n. 39 (2).

Distribuzione granulometrica

20. La granulometria deve essere effettuata per tutti gli aerosol e i vapori che potrebbero condensarsi e formare aerosol. Per consentire l'esposizione di tutte le zone pertinenti delle vie respiratorie, si raccomanda di utilizzare degli aerosol con diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) da 1 a 3 μm, con una deviazione standard geometrica (σ_g) compresa tra 1,5 e 3 (4). Occorre fare quanto possibile per rispettare queste condizioni, ma qualora non ci si riuscisse è necessario fornire il parere di un esperto. Ad esempio le particelle dei fumi metallici possono essere più piccole dello standard indicato, mentre le particelle caricate e le fibre possono essere più grandi rispetto a tale standard.

▼M4

Preparazione della sostanza in esame in un veicolo

21. Idealmente la sostanza deve essere testata senza un veicolo. Qualora sia necessario utilizzare un veicolo per ottenere la concentrazione e la granulometria adeguate della sostanza in esame, è preferibile utilizzare l'acqua. Quando una sostanza è disciolta in un veicolo, occorre verificarne la stabilità.

MONITORAGGIO DELLE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Flusso d'aria nella camera di esposizione

22. Durante ogni esposizione è necessario regolare attentamente, monitorare in continuo e registrare almeno una volta l'ora il flusso d'aria nella camera. Il monitoraggio in tempo reale della concentrazione (o stabilità temporale) dell'atmosfera di prova costituisce una misura permanente di tutti i parametri dinamici e un modo indiretto di controllarle tutti i parametri importanti per l'inalazione. Se la concentrazione è monitorata in tempo reale, la frequenza di misurazione della portata dell'aria può essere diminuita ad un'unica misurazione per giorno di esposizione. Si farà il possibile, nelle camere d'esposizione «a naso solo», per evitare la reinalazione. La concentrazione di ossigeno deve essere pari ad almeno il 19 % e la concentrazione di biossido di carbonio non deve superare l'1 %. Qualora si ritenga di non poter rispettare queste concentrazioni, è necessario misurare le concentrazioni di ossigeno e di anidride carbonica. Se le misurazioni effettuate il primo giorno di esposizione dimostrano che i livelli di questi gas sono corretti, non occorrono altre misurazioni.

Temperatura e umidità relativa della camera

23. La temperatura della camera deve essere mantenuta a 22 °C ± 3 °C. Sia nel caso delle esposizioni «a naso solo» che per le esposizioni «a corpo intero», l'umidità relativa nella zona in cui respira l'animale è costantemente monitorata e registrata ogni ora nel corso di ciascuna esposizione, se possibile. L'umidità relativa deve preferibilmente essere mantenuta tra 30 e 70 % ma può accadere che questi valori non siano raggiungibili (ad esempio, quando si studiano miscele acquose) o che non possa essere misurata per via delle interferenze della sostanza con il presente metodo di prova.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione nominale

24. Laddove possibile, si deve calcolare e registrare la concentrazione nominale nella camera di esposizione. La concentrazione nominale è data dalla divisione della massa della sostanza in esame generata per il volume di aria che è passato nel sistema della camera di inalazione. La concentrazione nominale non serve a caratterizzare l'esposizione degli animali, ma un confronto tra la concentrazione nominale e la concentrazione reale dà un'indicazione dell'efficienza di produzione del sistema di prova e può essere utile per individuare eventuali problemi di produzione.

Sostanza chimica in esame: Concentrazione reale

25. La concentrazione reale è la concentrazione della sostanza in esame prelevata nella zona della camera di inalazione in cui gli animali respirano. Le concentrazioni reali possono essere determinate con metodi specifici (ad esempio campionamento diretto, metodi di adsorbimento o di reazione chimica, e successiva caratterizzazione analitica) o con metodi non specifici, come l'analisi gravimetrica mediante filtrazione. Il ricorso all'analisi gravimetrica è ammissibile solo per gli aerosol di polveri che contengono un unico componente o per gli aerosol di liquidi poco volatili e deve fondarsi su opportune caratterizzazioni specifiche della sostanza in esame effettuate prima dello studio in corso. È possibile ricorrere all'analisi gravimetrica per

▼M4

determinare la concentrazione di un aerosol che contiene varie componenti in polvere, ma in tal caso occorrono dati analitici che dimostrino che la composizione del prodotto in sospensione nell'aria è analoga a quella del prodotto di partenza. In assenza di questi dati, può essere necessario rianalizzare periodicamente la sostanza in esame (idealmente in sospensione nell'aria) durante lo studio. Per gli agenti aerosolizzati che possono evaporare o sublimarsi, occorre dimostrare che tutte le fasi sono state raccolte con il metodo prescelto.

26. Nel corso dell'intero studio, si deve utilizzare, se possibile, un unico lotto della sostanza in esame e il campione va conservato in condizioni che ne mantengano la purezza, l'omogeneità e la stabilità. Prima di iniziare lo studio, occorre caratterizzare la sostanza in esame, valutandone anche la purezza e, se tecnicamente fattibile, l'identità e le quantità dei contaminanti e delle impurità individuati. A tal fine occorre conoscere quanto meno i dati seguenti: tempo di ritenzione e relativa area del picco, peso molecolare risultante dalla spettroscopia di massa o dalla gascromatografia, oppure altre stime. Il laboratorio che effettua la prova non è responsabile dell'identità del campione in esame, tuttavia per precauzione potrebbe confermare almeno in parte le caratteristiche fornite dallo sponsor (colore, natura fisica ecc.).

27. L'atmosfera di concentrazione deve essere mantenuta costante nei limiti del possibile. Per verificare la stabilità delle condizioni di esposizione si può utilizzare un dispositivo di monitoraggio in tempo reale, come un fotometro per aerosol o un analizzatore di idrocarburi totali per i vapori. La concentrazione reale della camera deve essere misurata almeno 3 volte nel corso di ogni giorno di esposizione per ciascun livello di esposizione. Se ciò non è possibile, per via di limitazioni inerenti al flusso d'aria o delle basse concentrazioni, è possibile prelevare un campione per periodo di esposizione. Idealmente si deve prelevare questo campione per l'intero periodo di esposizione. La concentrazione dei singoli campioni prelevati nella camera non deve deviare dalla concentrazione media della camera più del ± 10 %, nel caso di gas e vapori, o ± 20 % nel caso degli aerosol liquidi o solidi. Occorre calcolare e prender nota del tempo necessario affinché la camera di esposizione raggiunga l'equilibrio (t_{95}). La durata di un'esposizione copre il tempo di produzione della sostanza in esame, ivi compreso il tempo necessario affinché la camera raggiunga l'equilibrio (t_{95}) e la degradazione. Il documento di orientamento n. 39 (2) contiene indicazioni per la stima di t_{95}.

28. Per miscele molto complesse costituite da gas o vapori e da aerosol (ad esempio, atmosfere di combustione e sostanze chimiche generate per propulsione da appositi prodotti/dispositivi finali), ogni fase può comportarsi diversamente nella camera di inalazione. Per ciascuna fase (gas/vapore e aerosol) occorre pertanto scegliere almeno una sostanza indicatrice (analita), usualmente il principio attivo principale della miscela. Quando la sostanza chimica in esame è una miscela, nella relazione deve essere indicata la concentrazione analitica corrispondente alla miscela e non solo quella del principio attivo o della sostanza indicatrice (analita). Informazioni aggiuntive sulle concentrazioni effettive sono reperibili nel documento d'orientamento n. 39 (2).

Sostanza chimica in esame: Distribuzione granulometrica

29. La distribuzione granulometrica degli aerosol deve essere determinata almeno una volta la settimana per ciascuna concentrazione, utilizzando un impattore a cascata o un altro strumento, come uno spettrometro APS (*Aerodynamic Particle Sizer*). Se i risultati ottenuti con l'impattore a cascata e con l'altro strumento risultano equivalenti, quest'ultimo può essere utilizzato nel corso dell'intero studio.

▼M4

30. Per confermare l'efficienza di estrazione dello strumento principale, occorre utilizzare parallelamente un secondo strumento, come un filtro gravimetrico o un impinger/gorgogliatore. La concentrazione massica ottenuta dall'analisi granulometrica deve avvicinarsi, con scarti ragionevoli, a quella ottenuta con l'analisi su filtri [cfr. documento di orientamento n. 39 (2)]. Se questa equivalenza può essere dimostrata a tutte le concentrazioni saggiate nella fase iniziale dello studio, non è necessario effettuare ulteriori misure di conferma. Per il benessere degli animali occorre ridurre il più possibile i dati incerti che potrebbero comportare la necessità di ripetere uno studio.

31. È necessario effettuare un'analisi granulometrica nel caso di vapori che rischiano di condensarsi e formare aerosol o se si rilevano particelle in un'atmosfera di vapori che si presume possano formare fasi miste.

OSSERVAZIONI

32. Prima, durante e dopo il periodo di esposizione è necessario eseguire frequenti esami clinici degli animali. Osservazioni più frequenti possono essere utili in funzione della risposta degli animali nel corso dell'esposizione. Quando l'osservazione degli animali è ostacolata dai tubi di contenzione, dalla scarsa illuminazione nelle camere «a corpo intero» o da atmosfere opache, gli animali vanno attentamente osservati dopo l'esposizione. Le osservazioni fatte prima dell'esposizione del giorno successivo possono rilevare l'eventuale reversibilità o esacerbazione degli effetti tossici.

33. Tutte le osservazioni vanno registrate e riportate singolarmente per ciascun animale. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

34. Si osserveranno eventuali alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso, e dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. La misura della temperatura rettale può corroborare una bradipnea riflessa o un'ipo/ipertermia causate dall'esposizione o dalla reclusione. Lo studio può prevedere ulteriori valutazioni riguardanti: cinetica, biomonitoraggio, funzione polmonare, ritenzione di materiali scarsamente solubili che si accumulano nel tessuto polmonare e variazioni comportamentali.

PESO CORPOREO

35. Il peso di ogni singolo animale deve essere registrato immediatamente prima dell'esposizione (giorno 0), e due volte la settimana successivamente (ad esempio: il venerdì e il lunedì per verificare il recupero dopo un fine settimana senza esposizione, o a intervalli di tempo che consentano di valutare la tossicità sistemica) e al momento del decesso o dell'eutanasia. In assenza di effetti nel corso delle prime 4 settimane, il peso corporeo può essere misurato ogni settimana fino al termine dello studio. Gli animali del gruppo satellite (studio di reversibilità) devono continuare ad essere pesati a cadenza settimanale per l'intero periodo di recupero. Al termine dello studio, tutti gli animali devono essere pesati prima dell'eutanasia per non falsare il calcolo del rapporto tra il peso degli organi e il peso corporeo.

CONSUMO DI ALIMENTI E DI ACQUA

36. Si deve procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare, anche il consumo di acqua può essere misurato.

▼M4

PATOLOGIA CLINICA

37. Tutti gli animali, ivi compresi quelli dei gruppi di controllo e dei gruppi satelliti, una volta sacrificati devono essere sottoposti a esami clinici. L'intervallo di tempo tra la fine dell'esposizione e il prelievo di sangue deve essere annotato, soprattutto quando la ricostituzione dell'endpoint è rapida. Alla fine dell'esposizione, si raccomanda il campionamento per i parametri caratterizzati da una breve emivita del plasma (COHb, CHE e MetHb).

38. Nella tabella 1 sono elencati i parametri di patologia clinica generalmente necessari per gli esami tossicologici. L'esame delle urine non è sempre richiesto, ma può essere effettuato se ritenuto utile in funzione della tossicità prevista o osservata. Per caratterizzare meglio la tossicità della sostanza in esame, il responsabile dello studio può decidere di valutare ulteriori parametri (ad esempio attività colinesterasica, lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina o corpi di Heinz, creatinina chinasi, rapporto mieloide/eritroide, troponina, emogas, lattato deidrogenasi, sorbitolo deidrogenasi, glutammato-deidrogenasi e gamma-glutamil transpeptidasi).

Tabella 1

Parametri standard di patologia clinica

Ematologia	
Conta eritrocitaria	Conteggio dei globuli bianchi
Ematocrito	Conta differenziale dei globuli bianchi
Concentrazione dell'emoglobina	Conta delle piastrine
Tenore globulare medio in emoglobina	Coagulabilità (scegliere un parametro):
Volume medio corpuscolare	— Tempo di protrombina
Concentrazione di emoglobina corpuscolare media	— Tempo di coagulazione
Reticolociti	— Tempo di tromboplastina parziale attivata

Chimica clinica	
Glucosio (*)	Alanina-aminotransferasi
Colesterolo totale	Aspartato amminotransferasi
Trigliceridi	Fosfatasi alcalina
Azoto ureico ematico	Potassio
Bilirubina totale	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteina totale	Fosforo
Albumina	Cloruro
Globulina	

Esame delle urine (facoltativo)	
Aspetto (colore e torbidità)	Proteina totale
Volume	Glucosio
Densità relativa o osmolalità	Sangue/cellule ematiche
pH	

(*) Il responsabile dello studio deciderà se un periodo di digiuno è necessario per gli animali, in quanto un lungo periodo di digiuno può portare a misurazioni del glucosio parzialmente errate negli animali esposti rispetto agli animali del gruppo di controllo. Se si ricorre al digiuno, occorre che il periodo sia adeguato in funzione della specie utilizzata; per il ratto può essere di 16 ore (digiuno notturno). La determinazione della glicemia a digiuno può essere effettuata dopo il digiuno notturno, nel corso dell'ultima settimana di esposizione, o dopo la notte di digiuno notturno precedente l'autopsia (in tal caso insieme a tutti gli altri parametri di patologia clinica).

▼M4

39. Qualora esista la prova che le vie respiratorie inferiori (gli alveoli) sono il principale sito di deposito e ritenzione, si può ricorrere al lavaggio broncoalveolare (BAL) come tecnica migliore per analizzare quantitativamente i parametri del rapporto dose-effetto, incentrandosi soprattutto sull'alveolite, l'infiammazione polmonare e la fosfolipidosi. Questo esame consente di analizzare adeguatamente l'evoluzione del rapporto dose-effetto e del decorso temporale di una lesione alveolare. Il fluido di lavaggio può essere analizzato basandosi sul numero totale e differenziale di leucociti, proteine totali e lattato deidrogenasi. Altri parametri da considerare sono quelli indicativi di lesione lisosomiale, fosfolipidosi, fibrosi e infiammazione irritativa o allergica, che possono comprendere la determinazione di citochine o di chemiochine proinfiammatorie. Le misure legate al BAL spesso integrano i risultati degli esami istopatologici senza tuttavia sostituirli. Il documento di orientamento n. 39 (2) contiene le indicazioni su come effettuare il lavaggio dei polmoni.

ESAME OFTALMOLOGICO

40. Prima della somministrazione della sostanza in esame e al termine dello studio per tutti i gruppi trattati con una concentrazione elevata, occorre effettuare, avvalendosi di un oftalmoscopio o di un dispositivo equivalente, un esame oftalmologico del fondo dell'occhio, dei mezzi di rifrazione, dell'iride, della congiuntiva. Se sono individuate delle alterazioni a livello degli occhi, occorre esaminare tutti gli animali degli altri gruppi, ivi compreso il gruppo satellite (reversibilità).

PATOLOGIA MACROSCOPICA E PESO DEGLI ORGANI

41. Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso della prova e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti al dissanguamento totale (se fattibile) e autopsia macroscopica. Occorre annotare il tempo trascorso tra la fine dell'ultima esposizione di ogni animale e il suo sacrificio. Se non è possibile eseguire l'autopsia subito dopo il rilevamento del decesso, l'animale deve essere refrigerato (non congelato) ad una temperatura sufficientemente bassa da ridurre al minimo l'autolisi. L'autopsia deve essere effettuata non appena possibile, di norma entro un giorno o due dal decesso. Per ogni animale si annoteranno tutte le alterazioni patologiche macroscopiche, prestando particolare attenzione a quelle delle vie respiratorie.

42. Nella tabella 2 sono elencati gli organi e i tessuti che devono essere conservati in un ambiente adeguato nel corso dell'autopsia macroscopica ai fini dell'esame istopatologico. La conservazione degli organi e dei tessuti [tra parentesi quadre] e di qualsiasi altro organo o tessuto sono a discrezione del responsabile dello studio. Gli organi indicati in **grassetto** devono essere esportati e pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. La tiroide e gli epididimi devono essere pesati solo se necessario in quanto la loro asportazione può ostacolare la valutazione istopatologica. Gli organi e i tessuti sono fissati mediante formalina tamponata al 10 % o un altro fissativo adeguato, non appena finita l'autopsia e non meno di 24-48 ore prima dell'ablazione, in funzione del fissativo utilizzato.

▼M4

Tabella 2

Organi e tessuti preservati nel corso dell'autopsia macroscopica

Ghiandole surrenali	Esofago
Aorta	[Bulbo olfattivo]
Midollo osseo (e/o aspirato fresco di midollo)	**Ovaie**
Cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	Pancreas
Intestino cieco	Paratiroidi
Colon	Nervo periferico (sciatico o tibiale, di preferenza vicino al muscolo)
Duodeno	Pituitaria
[**Epididimi**]	Prostata
[Occhi (retina, nervo ottico) e palpebre]	Retto
Femore e grassella	Ghiandole salivari
Cistifellea (se presente)	Vescicole seminali
[Ghiandole di Harder]	Pelle
Cuore	Midollo spinale (cervicale, mediotoracico e lombare)
Ileo	**Milza**
Digiuno	Sterno
Reni	Stomaco
[Ghiandole lacrimali (extraorbitali)]	Denti
Laringe (3 livelli, ivi compresa la base dell'epiglottide)	**Testicoli**
Fegato	**Timo**
Polmone (tutti i lobi ad un livello, compresi i bronchi principali)	**Tiroidi**
Linfonodi della regione ilare del polmone, soprattutto per il particolato di sostanze chimiche poco solubile. Per esami più approfonditi e/o studi incentrati sull'aspetto immunologico, si possono esaminare anche altri linfonodi, ad esempio quelli delle regioni mediastinale, cervicale/submandibolare e/o auricolare.	[Lingua]
Linfonodi (distali dal punto di ingresso)	Trachea (almeno 2 livelli, tra cui 1 sezione longitudinale attraverso la carena e 1 sezione trasversale)
Ghiandola mammaria (femminile)	[Uretere]
Muscolo (coscia)	[Uretra]
Tessuti rinofaringei (almeno 4 livelli; 1 livello per comprendere il canale rinofaringeo e il tessuto associato al naso — *Nasal Associated Lymphoid Tissue* — NALT)	Vescica
	Utero
	Organi bersaglio
	Tutte le lesioni macroscopiche e le masse

▼M4

43. I polmoni devono essere asportati intatti, pesati e trattati con un fissativo idoneo ad una pressione di 20-30 cm di acqua per garantire che la struttura dei polmoni venga preservata (5). Le sezioni sono prelevate per tutti i lobi ad un livello, ivi inclusi i bronchi principali, ma se si effettua un lavaggio polmonare, il lobo che non è stato lavato è sezionato su tre livelli (non sezioni in serie).

44. Si devono esaminare almeno 4 livelli di tessuti rinofaringei, uno dei quali deve comportare il canale rinofaringeo (5) (6) (7) (8) (9) per permettere un esame adeguato dell'epitelio squamoso, transizionale (respiratorio non cigliato), respiratorio (respiratorio cigliato) e olfattivo, nonché del tessuto linfatico (NALT) (10) (11). Occorre inoltre esaminare tre livelli della laringe, e uno di questi deve includere la base dell'epiglottide (12). Occorre esaminare almeno due livelli della trachea, ivi compresa una sezione longitudinale lungo la carena della biforcazione dei bronchi extrapolmonari e una sezione trasversale.

ESAME ISTOPATOLOGICO

45. Una valutazione istopatologica di tutti gli organi e i tessuti di cui alla tabella 2 è necessaria per i gruppi di controllo e i gruppi trattati con la concentrazione più elevata, e per tutti gli animali che muoiono o subiscono l'eutanasia nel corso dello studio. Occorre prestare particolare attenzione all'apparato respiratorio, agli organi bersaglio e alle lesioni macroscopiche. Gli organi e tessuti sui quali si riscontrano delle lesioni nel gruppo trattato con la concentrazione più elevata devono essere esaminati in tutti i gruppi. Il responsabile dello studio può decidere di effettuare valutazioni istopatologiche anche per altri gruppi al fine di dimostrare una chiara risposta alle concentrazioni Quando si utilizza un gruppo satellite (reversibilità), la valutazione istopatologica va eseguita su tutti i tessuti e gli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati. Se nel gruppo trattato con la concentrazione più elevata si registra un numero eccessivo di morti premature o altri tipi di problemi che possono compromettere il significato dei dati, occorre effettuare una valutazione istopatologica del livello di concentrazione immediatamente inferiore. Si deve cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati degli esami microscopici.

DATI E RELAZIONE

Dati

46. Per i singoli animali occorre fornire i dati riguardanti il peso corporeo, il consumo di cibo, la patologia clinica, la patologia macroscopica, il peso degli organi e l'istopatologia. I dati di osservazione clinica devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di prova, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni specifici di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e i risultati dell'autopsia. Tutti i risultati, quantitativi e descrittivi, devono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico generalmente riconosciuto. I metodi statistici devono essere stabiliti nella fase di concezione dello studio.

Relazione sulla prova

47. La relazione deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Animali sperimentali e condizioni di allevamento:

— descrizione delle condizioni di stabulazione, tra cui: numero (o modifica del numero) di animali per gabbia, materiale utilizzato per la lettiera, temperatura ambiente e umidità relativa, fotoperiodo e dieta,

▼M4

— specie/ceppo utilizzati e giustificazione dell'impiego di specie diverse dal ratto; possono essere forniti dati di origine o dati storici se riguardano animali esposti a condizioni di esposizione, di stabulazione e di digiuno simili,

— numero, età e sesso degli animali,

— metodo di randomizzazione,

— descrizione dell'eventuale condizionamento prima della prova, in particolare per quanto concerne dieta, quarantena e terapie.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione),

— dati di identificazione e numero CAS (*Chemical Abstract Services*), se noto.

Veicolo:

— motivazione dell'utilizzo di un veicolo e giustificazione per la scelta del veicolo (se diverso dall'acqua),

— dati storici o paralleli che dimostrano che il veicolo non interferisce con i risultati dello studio.

Camera di inalazione:

— descrizione dettagliata della camera di inalazione, comprendente il volume e un diagramma,

— provenienza e descrizione delle apparecchiature utilizzate per l'esposizione degli animali e per la generazione dell'atmosfera,

— apparecchi di misurazione della temperatura, dell'umidità, della granulometria e della concentrazione reale,

— fonte dell'aria e sistema di climatizzazione utilizzato,

— metodi utilizzati per calibrare l'apparecchiatura al fine di garantire l'omogeneità dell'atmosfera di prova,

— differenza di pressione (positiva o negativa),

— bocchette di esposizione per camera («a naso solo»); ubicazione degli animali nella camera («a corpo intero»),

— stabilità dell'atmosfera di prova,

— ubicazione dei sensori termometrici e igrometrici e dei punti di campionamento dell'atmosfera della prova nella camera,

— trattamento dell'aria fornita/estratta,

— flussi d'aria, portata dell'aria in ogni bocchetta di esposizione («a naso solo») o rapporto tra il volume occupato dagli animali e il volume della camera («a corpo intero»),

— tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera (t_{95}),

— numero di sostituzioni del volume per ora,

— dispositivi di misurazione (se applicabile).

Dati sull'esposizione:

— giustificazione della scelta della concentrazione bersaglio dello studio principale,

▼M4

— concentrazioni nominali (ottenute dividendo la massa della sostanza in esame immessa nella camera d'inalazione per il volume dell'aria fatta circolare nella camera),

— concentrazioni reali ottenute nella zona in cui respirano gli animali; per le miscele in esame che producono forme fisiche eterogenee (gas, vapori, aerosol), si può analizzare separatamente ciascuna di esse,

— riportare le concentrazioni atmosferiche in unità di massa (ad esempio, mg/l, mg/m^3 ecc.), più che in unità di volume (ad esempio, ppm, ppb ecc.),

— distribuzione della dimensione delle particelle, diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (σ_g), con relativi metodi di calcolo. Occorre indicare anche le singole analisi granulometriche.

Condizioni sperimentali:

— indicazioni sulla preparazione della sostanza chimica in esame, precisando i dettagli delle procedure impiegate per ridurre la granulometria dei materiali solidi o per preparare soluzioni della sostanza in esame,

— una descrizione (di preferenza corredata di uno schema) dell'apparecchiatura utilizzata per generare l'atmosfera sperimentale e per esporvi gli animali,

— ragguagli sull'apparecchiatura utilizzata per monitorare la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera (ad esempio sviluppo di una curva di calibrazione),

— informazioni sull'apparecchiatura utilizzata per raccogliere campioni per la determinazione della concentrazione e della distribuzione della dimensione delle particelle nella camera,

— dettagli sul metodo d'analisi chimica impiegato e sulla convalida di tale metodo (specificando l'efficienza di recupero della sostanza in esame dal mezzo campionato),

— metodo di randomizzazione per l'assegnazione degli animali nei gruppi sperimentali e di controllo,

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua),

— giustificazione della scelta delle concentrazioni sperimentali.

Risultati:

— tabella con la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera,

— tabella con le concentrazioni nominali e reali nella camera,

— tabella con i dati granulometrici, ivi compresi i dati analitici sul campionamento, sulla distribuzione granulometrica e i calcoli del DAMM e della σ_g,

— tabella con i dati di risposta e livello di concentrazione per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa, natura, gravità, inizio e durata degli effetti),

▼M4

— tabella con il peso dei singoli animali,

— tabella con il consumo di cibo,

— tabella con i dati clinico-patologici,

— reperti necroscopici e reperti istopatologici per ciascun animale, se disponibili.

Discussione e interpretazione dei risultati:

— occorre dare particolare importanza alla descrizione dei metodi impiegati per soddisfare i criteri del presente metodo di prova, ad esempio per quanto concerne la concentrazione limite o la granulometria,

— occorre esaminare la respirabilità delle particelle alla luce dei risultati complessivi, in special modo se i criteri granulometrici non sono stati soddisfatti,

— si deve tenere conto, nella valutazione globale dello studio, della coerenza dei metodi utilizzati per determinare le concentrazioni nominali ed effettive e considerare il rapporto tra esse,

— si deve esaminare la causa probabile di decesso e il meccanismo d'azione prevalente (sistemico o locale),

— occorre fornire delle spiegazioni qualora sia stato necessario sottoporre ad eutanasia animali che manifestavano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente, in base ai criteri illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE citato in bibliografia al punto (3),

— occorre individuare gli organi bersaglio,

— occorre definire il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL) e il livello più basso al quale si osserva un effetto avverso (LOAEL).

BIBLIOGRAFIA:

(1) OCSE (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OCSE (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OCSE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pagg. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Sostanza chimica in esame: Qualsiasi sostanza o miscela testata secondo il presente metodo di prova.

▼M4

B.30. STUDI DI TOSSICITÀ CRONICA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 452 (2009). La prima linea guida 452 è stata adottata nel 1981. Si è ritenuto necessario sviluppare questa versione riveduta del metodo di prova B.30 alla luce dei recenti progressi nell'ambito del benessere animale e degli obblighi normativi (1) (2) (3) (4). L'aggiornamento del presente metodo di prova B.30 si è svolto in parallelo alle revisioni del capitolo B.32 del presente allegato, studi di cancerogenesi, e del capitolo B.33 del presente allegato, studi combinati di tossicità cronica/cancerogenesi, con l'obiettivo di integrare le informazioni in relazione agli animali usati nello studio e di fornire maggiori dettagli sulla scelta delle dosi. Il presente metodo di prova è concepito per testare un'ampia serie di sostanze chimiche, tra cui pesticidi e sostanze chimiche industriali.

2. La maggior parte degli studi di tossicità cronica è svolta su specie di roditori, pertanto il presente metodo di prova è destinato ad applicarsi in primo luogo agli studi che hanno ad oggetto queste specie. Se dovesse risultare necessario condurre tali studi sui non roditori, possono trovare applicazione, con le opportune modifiche, anche i principi e le procedure esposti nel presente metodo di prova, congiuntamente a quelli specificati al capitolo B.27 del presente allegato (Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori) (5), come indicato nel documento di orientamento n. 116 dell'OCSE — *Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (6).

3. Le tre vie principali di somministrazione usate in relazione alla tossicità cronica sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione è fatta in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza in esame e della più probabile via di esposizione degli esseri umani. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta della via di esposizione.

4. Questo metodo di prova è incentrato sull'esposizione per via orale, ossia la via più usata negli studi di tossicità cronica. Gli studi sulla tossicità cronica che prevedono un'esposizione per via cutanea o per inalazione possono essere necessari anche per la valutazione del rischio per la salute umana e/o possono essere richiesti da determinati quadri normativi, ma entrambe le vie di esposizione evidenziano una complessità considerevole sul piano tecnico. Questo tipo di studi dovrà essere impostato caso per caso, ma il metodo di prova qui esposto per la valutazione e l'esame della tossicità cronica con somministrazione orale potrebbe costituire la base di un protocollo per studi per inalazione e/o cutanei, per quanto riguarda le raccomandazioni per i periodi di trattamento, i parametri clinici e patologici ecc. L'OCSE ha pubblicato documenti di orientamento sulla somministrazione di sostanze chimiche in esame per inalazione (6) (7) e per via cutanea (6). Il capitolo B.8 del presente allegato (8) e il capitolo B.29 del presente allegato (9), insieme al documento di orientamento dell'OCSE — *Acute inhalation testing* (7) vanno consultati in particolare nell'impostazione di studi a lungo termine che prevedono l'esposizione per inalazione. Il capitolo B.9 del presente allegato (10) va consultato nel caso di prove svolte per via cutanea.

▼M4

5. Lo studio della tossicità cronica fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta nell'arco di un periodo considerevole della vita delle specie usate. Con questo studio sarà possibile ottenere informazioni sugli effetti tossici della sostanza chimica in esame, oltre ad indicare gli organi bersaglio e la possibilità di accumulo. Esso può inoltre fornire indicazioni sul cosiddetto *no-observed-adverse-effect level* (livello fino al quale non si osservano effetti dannosi) applicabile per la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione umana. Si sottolinea inoltre la necessità di sottoporre gli animali ad attente osservazioni cliniche, allo scopo di ottenere il maggior numero possibile di informazioni.

6. Tra gli obiettivi degli studi condotti con questo metodo di prova figurano:

— l'individuazione della tossicità cronica di una sostanza chimica in esame,

— l'individuazione degli organi bersaglio,

— la caratterizzazione del rapporto dose-risposta,

— l'individuazione di un *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL), ossia il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi, o di un punto di partenza per la determinazione di una dose di riferimento (BMD),

— la previsione degli effetti di tossicità cronica ai livelli di esposizione umana,

— la produzione di dati per verificare le ipotesi relative alle modalità di azione (6).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. Nella valutazione e nell'esame delle caratteristiche tossicologiche di una sostanza chimica in esame, prima di condurre lo studio i laboratori che eseguono la prova devono considerare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame al fine di orientare il disegno sperimentale nella maniera più efficiente per valutare il potenziale di tossicità cronica limitando al minimo necessario l'uso di animali. Tre le informazioni utili per il disegno sperimentale saranno considerate l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, le informazioni sulle modalità di azione, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, l'impiego o gli impieghi previsti per l'esposizione umana, dati (Q)SAR e i dati tossicologici disponibili in merito a sostanze chimiche di struttura affine, i dati tossicocinetici disponibili (dose unica e dose ripetuta, laddove disponibile) e i risultati di altri studi a dose ripetuta. La determinazione della tossicità cronica si effettua solamente una volta ottenuti i primi risultati delle prove di tossicità a dose ripetuta su 28 giorni e/o 90 giorni. È opportuno prendere in considerazione un approccio a tappe nello svolgimento delle prove di tossicità svolti nel quadro della valutazione generale degli effetti potenzialmente nocivi di una particolare sostanza chimica in esame (11) (12) (13) (14).

8. I metodi statistici più adeguati per l'analisi dei risultati, tenuto conto del disegno sperimentale e degli obiettivi, sono stabiliti prima dell'inizio dello studio. Occorre inoltre determinare se le statistiche debbano o meno tenere conto dell'aggiustamento in funzione della sopravvivenza e dell'analisi effettuata in caso di morte prematura degli animali di uno o più gruppi. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) e il documento di orientamento dell'OCSE n. 35 — *Analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (15) forniscono indicazioni sulle analisi statistiche appropriate e sui riferimenti fondamentali a metodi statistici riconosciuti a livello internazionale.

▼M4

9. Nella realizzazione di uno studio di tossicità cronica è opportuno seguire sempre i principi guida e le considerazioni specificati nel documento di orientamento dell'OCSE n. 19 — *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (16), in particolare nel paragrafo 62. Tale paragrafo precisa che negli studi che prevedono la somministrazione ripetuta di dosi, se un animale manifesta segnali clinici progressivi, che conducano a un ulteriore peggioramento delle sue condizioni, è necessario decidere con cognizione di causa se sottoporre l'animale ad eutanasia. In questa decisione va soppesato anche il valore delle informazioni che possono essere ottenute continuando a includere tale animale nello studio e il suo stato in generale. Se si decide di continuare a mantenere l'animale nello studio occorre aumentare la frequenza delle osservazioni, a seconda del caso. È anche possibile, senza pregiudicare il fine della prova, sospendere temporaneamente la somministrazione delle dosi se ciò allevia il dolore o riduce lo stress cui è sottoposto l'animale, oppure ancora ridurre le dosi.

10. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) e due pubblicazioni dell'International Life Sciences Institute (17) (18) forniscono ragguagli dettagliati in merito ai dibattiti sulla selezione delle dosi per gli studi di tossicità cronica e cancerogenesi. La strategia di base per la scelta delle dosi dipende dal o dagli obiettivi fondamentali dello studio (paragrafo 6). Nel selezionare il livello adeguato delle dosi sarebbe opportuno trovare un equilibrio tra, da un lato, l'individuazione dei rischi e, dall'altro, la caratterizzazione e la rilevanza delle risposte alle basse dosi. Ciò assume particolare importanza nella situazione in cui si deve svolgere uno studio combinato di tossicità cronica e di cancerogenesi (capitolo B.33 del presente allegato) (paragrafo 11).

11. È opportuno valutare l'opportunità di svolgere uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi (capitolo B.33 del presente allegato) piuttosto che eseguire in separata sede uno studio di tossicità cronica (il presente metodo di prova B.30) e uno studio di cancerogenesi (capitolo B.32 del presente allegato). La prova combinata è più efficiente sotto il profilo della gestione dei tempi e dei costi rispetto alla conduzione di due studi distinti, pur senza compromettere la qualità dei dati nella fase che verifica la cronicità e nella fase che verifica la cancerogenesi. Nello svolgimento di uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi (capitolo B.33 del presente allegato) occorre tuttavia tenere opportunamente in considerazione i principi della selezione delle dosi (paragrafi 9 e 20-25). È inoltre riconosciuto che determinati quadri normativi richiedono la conduzione di studi ben distinti.

12. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono specificate alla fine del capitolo e nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6).

PRINCIPIO DELLA PROVA

13. La sostanza chimica in esame è somministrata giornalmente in dosi graduali a diversi gruppi di animali sperimentali, di norma per un periodo di 12 mesi, ma a seconda degli obblighi normativi possono essere scelti anche periodi più lunghi o più corti (cfr. paragrafo 33). La durata scelta deve essere sufficientemente lunga da garantire la manifestazione degli effetti della tossicità cumulata senza che insorgano gli effetti distorsivi dei cambiamenti geriatrici. È opportuno che gli scostamenti da una durata di esposizione di 12 mesi siano giustificati, in particolare in caso di periodi di durata inferiore. La sostanza chimica in esame di norma è somministrata per via orale, ma può essere opportuno anche ricorrere alla via inalatoria o cutanea. Il disegno sperimentale può anche prevedere uno o più sacrifici intermedi, ad esempio dopo 3 e 6 mesi, e a tale fine possono essere introdotti nello studio ulteriori animali (cfr. paragrafo 19). Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necroscopia. Al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

▼M4

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

14. Il presente metodo di prova riguarda innanzitutto la valutazione e l'esame della tossicità cronica nei roditori (cfr. paragrafo 2), sebbene sia riconosciuto che determinati regimi normativi possano richiedere studi analoghi su non roditori. La scelta delle specie deve essere motivata. Il disegno e lo svolgimento di studi di tossicità cronica su specie di non roditori, se richieste, vanno basate sui principi indicati nel presente metodo di prova e in quelli specificati nel capitolo B.27 del presente allegato (Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori) (5). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta delle specie e del ceppo.

15. Nel presente metodo di prova la specie di roditore di elezione è il ratto, sebbene si possano utilizzare anche altre specie di roditori, come il topo. I ratti e i topi costituiscono i modelli sperimentali preferibili in ragione della loro aspettativa di vita relativamente breve, del loro uso diffuso in studi farmacologici e tossicologici, della loro sensibilità all'induzione di tumori e della disponibilità di ceppi sufficientemente caratterizzati. Viste queste caratteristiche, è disponibile una grande quantità di informazioni di carattere fisiologico e patologico. Occorre utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Lo studio di tossicità cronica va svolto su animali dello stesso ceppo e della medesima provenienza di quelli utilizzati in uno o più studi preliminari di tossicità di durata inferiore. Le femmine devono essere nullipare e non gravide.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

16. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. La sistemazione individuale va considerata soltanto se scientificamente giustificata (19) (20) (21). Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere almeno del 30 % e preferibilmente non superiore al 70 %; tranne durante la pulizia del laboratorio, con l'obiettivo del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua di abbeveraggio. La dieta deve corrispondere a tutti i requisiti nutrizionali delle specie in esame e il tenore di contaminanti dietetici, tra cui anche i residui di pesticidi, inquinanti organici persistenti, fitoestrogeni, metalli pesanti e micotossine, che potrebbero influenzare l'esito della prova, deve essere il più basso possibile. Le informazioni analitiche sui livelli di nutrienti e di contaminanti dietetici devono essere prodotte periodicamente, quantomeno all'inizio dello studio e in caso di cambio del lotto impiegato, e vanno riportate nella relazione finale. Analogamente, devono essere fornite anche informazioni analitiche sull'acqua di abbeveraggio usata nello studio. La scelta della dieta può essere condizionata dalla necessità di garantire una combinazione adeguata tra una data sostanza chimica in esame e l'esigenza di rispettare i requisiti nutrizionali degli animali nel momento in cui la sostanza chimica è somministrata con il cibo.

Preparazione degli animali

17. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 7 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Nel caso dei roditori, la somministrazione delle dosi agli animali deve iniziare il più presto possibile in seguito allo svezzamento e all'acclimatazione e preferibilmente prima che gli animali raggiungano le 8 settimane di età. Gli animali usati per la prova devono essere caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso ed età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali di

▼M4

ciascun sesso utilizzati deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio di tutti gli animali interessati dallo studio, operando un distinguo a seconda del sesso. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. In seguito all'assegnazione randomizzata, non dovrebbero esserci più differenze significative nel peso medio corporeo tra gruppi dello stesso sesso. Se sono presenti differenze statisticamente rilevanti, la fase di randomizzazione va ripetuta, nei limiti del possibile. Ad ogni animale va assegnato un numero di identificazione univoco, che sarà riportato sull'animale in maniera indelebile tramite tatuaggio, impianto di un microchip o un altro metodo analogo.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

18. È opportuno usare animali di entrambi i sessi. E necessario impiegare un numero di animali tale da consentire che alla fine dello studio sia disponibile una quantità di animali in ogni gruppo sufficiente per effettuare una valutazione biologica e statistica. Per quanto riguarda i roditori, per ciascun livello di dose di norma si usano almeno 20 esemplari per sesso in ogni gruppo, mentre per i non roditori si raccomanda un minimo di 4 esemplari per sesso in ciascun gruppo. Negli studi che prevedono la presenza di topi potrebbero essere necessari ulteriori animali in ciascun gruppo-dose per poter eseguire tutti gli esami ematologici del caso.

Disposizioni relative ai sacrifici intermedi, a gruppi satellite e ad animali sentinella

19. Lo studio può prevedere disposizioni relative ai sacrifici intermedi (almeno 10 animali/sesso/gruppo), ad esempio dopo 6 mesi, al fine di reperire informazioni sull'evoluzione di alterazioni tossicologiche e dati meccanicistici. Se tali informazioni sono già disponibili sulla base di studi sulla tossicità a dose ripetuta sulla sostanza chimica in esame, tali sacrifici intermedi possono non essere scientificamente giustificati. Ai fini del monitoraggio della reversibilità dei cambiamenti tossicologici indotti dalla sostanza chimica in esame possono essere previsti anche gruppi satellite. Tali gruppi di norma saranno limitati al livello di dose più elevato dello studio e ai gruppi di controllo. Al fine di monitorare lo stato della patologia, se necessario durante lo studio è possibile aggiungere un altro gruppo di animali sentinella (solitamente 5 esemplari per sesso) (22). Se sono previsti sacrifici intermedi o inclusioni di gruppi satellite o di animali sentinella, il numero di animali previsto dal disegno sperimentale va aumentato della quantità di animali che si intende sacrificare prima della conclusione dello studio. Gli animali interessati di norma sono sottoposti alle medesime osservazioni, tra cui il controllo del peso corporeo, il consumo di cibo/acqua, analisi ematologiche e biochimico-cliniche ed esami patologici degli animali coinvolti nella fase di esame della tossicità cronica dello studio principale, sebbene sia possibile disporre anche che (per i gruppi che saranno sacrificati nel corso dello studio) le osservazioni siano limitate a parametri essenziali specifici, come la neurotossicità o l'immunotossicità.

Gruppi-dose e dosaggi

20. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) fornisce indicazioni in merito a tutti gli aspetti legati alla scelta delle dosi e all'intervallo tra i livelli di dose. Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo parallelo, tranne quando si esegue una prova limite (cfr. paragrafo 27). I livelli di dose sono generalmente basati sui risultati di precedenti studi di durata inferiore con dosi ripetute o di determinazione degli intervalli di dose e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi alla sostanza chimica in esame o a sostanze chimiche analoghe.

▼M4

21. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza chimica in esame non impongano limiti in tal senso, il livello di dose più elevato di norma va scelto con l'obiettivo di individuare gli organi bersaglio e gli effetti tossici senza provocare sofferenza, tossicità grave, morbilità o morte. In considerazione dei fattori di cui al paragrafo 22 sottostante, il livello di dose più elevato è scelto per rendere manifesta la tossicità, ad esempio con un calo dell'aumento del peso (circa del 10 %).

22. Tuttavia, a seconda degli obiettivi dello studio (cfr. paragrafo 6), si può optare per una dose massima inferiore alla dose che renda manifesta la tossicità, ad esempio se una dose provoca un effetto indesiderato preoccupante che però ha un impatto lieve sull'aspettativa di vita o sul peso corporeo. La dose massima non può essere superiore a 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno (dose limite, cfr. paragrafo 27).

23. I livelli di dose e l'intervallo tra i livelli di dose possono essere scelti per stabilire un rapporto dose-risposta e un NOAEL o altri risultati attesi dello studio, ad esempio una dose di riferimento (BMD, *benchmark dose*, cfr. paragrafo 25) al livello di dose più basso. Tra i fattori da tenere in considerazione nella scelta delle dosi più basse rientrano anche la curva attesa del rapporto dose-risposta, le dosi alle quali possono subentrare dei cambiamenti nel metabolismo o nella modalità di azione tossica, il livello a cui si prevede una soglia o il livello che si prevede possa costituire un punto di partenza per un'estrapolazione a basse dosi.

24. L'intervallo tra i livelli di dose scelto dipenderà dalle caratteristiche della sostanza chimica di prova e non può essere imposto dal presente metodo di prova, ma di frequente fattori tra due e quattro forniscono buoni risultati delle prove se applicati per determinare dosi a livelli discendenti, mentre spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto distanziati (ad esempio oltre un fattore di circa 6-10) tra le dosi. In linea generale va evitato l'uso di fattori superiori a 10 e se vi si ricorre è opportuno giustificare tale scelta.

25. Come illustrato ulteriormente nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6), nella scelta della dose vanno tenuti in considerazione, tra l'altro, i seguenti aspetti:

— non linearità o punti di flesso presunti o riscontrati nella curva dose-risposta,

— aspetti tossicocinetici e range di dosi a cui subentra o meno induzione metabolica, saturazione o non linearità tra dosi esterne e interne,

— lesioni precursive, indicatori degli effetti o indicatori di processi biologici fondamentali sottostanti in corso,

— aspetti principali (o presunti) delle modalità di azione, ad esempio dosi alle quali inizia a subentrare citotossicità, i livelli ormonali sono perturbati, i meccanismi di omeostasi sono superati ecc.,

— regioni della curva dose-risposta per cui è necessaria una stima particolarmente precisa, ad esempio nell'ambito della dose di riferimento prevista o di una soglia ipotizzata,

— considerazione dei livelli previsti di esposizione umana.

▼M4

26. Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza chimica in esame. Salvo il trattamento con la sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato dei gruppi-dose. Se una sostanza chimica è somministrata con la dieta e comporta una riduzione dell'assunzione di cibo significativa a causa di una minore palatabilità, può essere utile aggiungere un ulteriore gruppo di controllo alimentato allo stesso modo che si presterà di più a tale scopo.

27. Se, basandosi sulle informazioni degli studi preliminari, è possibile prevedere che una prova a un livello di dose equivalente ad almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno probabilmente non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze chimiche strutturalmente affini, non si prevede tossicità, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere ritenuto necessario. Si può applicare un limite di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno eccetto nei casi in cui l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

Preparazione delle dosi e somministrazione della sostanza chimica in esame

28. La sostanza chimica in esame di norma viene somministrata con il cibo, l'acqua di abbeveraggio o per via intragastrica. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) fornisce ulteriori informazioni in merito alle vie e ai metodi di somministrazione. La via di somministrazione dipende dall'obiettivo dello studio, dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza chimica in esame, dalla sua biodisponibilità e dalla via e dal metodo predominanti di esposizione degli esseri umani. È necessario giustificare la scelta della via e del metodo di somministrazione. Nell'interesse della salute animale, la somministrazione mediante sonda orale di norma va scelta solo per le sostanze per cui questa via e questo metodo di somministrazione corrispondono ragionevolmente a una potenziale esposizione umana (ad esempio farmaci). Per le sostanze chimiche ingerite con gli alimenti o presenti nell'ambiente, inclusi i pesticidi, la somministrazione avviene solitamente con il cibo o l'acqua di abbeveraggio. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio nel caso dell'esposizione professionale, può essere opportuna la somministrazione per altre vie.

29. Ove necessario, la sostanza chimica di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. È opportuno tenere conto, a seconda del caso, delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sulla consumazione di cibo o acqua sullo stato nutrizionale degli animali. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Devono essere disponibili informazioni in merito alla stabilità della sostanza chimica in esame e all'omogeneità delle soluzioni o razioni di dosaggio (a seconda del caso) nelle condizioni di somministrazione (ad esempio dieta).

30. Per le sostanze chimiche somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza chimica in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. In studi a lungo termine che ricorrono alla somministrazione con la dieta, la concentrazione nel cibo della sostanza chimica in esame di norma non può superare la soglia massima del 5 % della dieta totale, al fine di evitare degli squilibri alimentari. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può ricorrere sia a una concentrazione alimentare costante (mg/kg di cibo o ppm), sia a dosi di livello costante in funzione del peso dell'animale (mg/kg di peso corporeo), con calcolo su base settimanale. La scelta di eventuali alternative va specificata.

▼M4

31. In caso di somministrazione per via orale, agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame (sette giorni la settimana), di norma per un periodo di 12 mesi (cfr. anche paragrafo 33), sebbene a seconda degli obblighi normativi possa essere richiesta una durata superiore. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio, ad esempio cinque giorni la settimana. In caso di somministrazione per via cutanea, di norma gli animali sono trattati con la sostanza chimica in esame per almeno 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, così come specificato nel capitolo B.9 del presente allegato (10), per un periodo di 12 mesi. L'esposizione per via inalatoria si protrae per 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, ma, se giustificata, può essere scelta un'esposizione di 5 giorni la settimana. La durata del periodo di somministrazione di norma è di 12 mesi. Se delle specie di roditori diverse dai ratti sono sottoposte a esposizione «a naso solo», è possibile adeguare la durata massima di esposizione per ridurre al minimo il loro stress. La scelta di una durata di esposizione inferiore a 6 ore al giorno deve essere debitamente motivata. Cfr. anche il capitolo B.8 del presente allegato (8).

32. Se la somministrazione della sostanza chimica in esame avviene per via intragastrica, deve avvenire per mezzo di una sonda gastrica o una cannula per intubazione ogni giorno all'incirca allo stesso orario. Di norma viene somministrata una dose singola una volta al giorno, ma laddove, ad esempio, la sostanza chimica in esame fosse un irritante locale, è possibile mantenere la dose giornaliera ripartendola su due momenti diversi (due volte al giorno). Il massimo volume di liquido che può essere somministrato in un'unica soluzione dipende dalle dimensioni dell'animale. Il volume deve essere limitato il più possibile e per i roditori non può superare, di norma, 1 ml/100 g di peso corporeo (22). La variabilità dei volumi somministrati va ridotta al minimo regolando la concentrazione in modo da assicurare un volume costante in tutti i livelli di dose. Sostanze chimiche potenzialmente corrosive o irritanti sono considerate un'eccezione e devono essere diluite per evitare effetti locali gravi. Va evitato lo svolgimento di prove con concentrazioni che rischiano di essere corrosive o irritanti per il tratto gastrointestinale.

Durata dello studio

33. Sebbene il presente metodo di prova sia impostato in primo luogo come uno studio di tossicità cronica della durata di 12 mesi, il disegno sperimentale rende possibile e può essere applicato anche a studi dalla durata più breve (ad esempio 6 o 9 mesi) o più lunga (ad esempio 18 o 24 mesi), a seconda delle disposizioni di regimi normativi specifici o dagli specifici fini meccanicistici. È opportuno che gli scostamenti da una durata di esposizione di 12 mesi siano giustificati, in particolare in caso di periodi di durata inferiore. I gruppi satellite inclusi nello studio per monitorare la reversibilità dei cambiamenti a livello tossicologico indotti dalla sostanza chimica in esame sono tenuti senza trattamento per un periodo non inferiore a 4 settimane e non oltre un terzo della durata dello studio una volta terminata l'esposizione. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (6) fornisce ulteriori indicazioni, tra cui considerazioni in merito alla sopravvivenza nello studio.

OSSERVAZIONI

34. Tutti gli animali vanno osservati per identificare segni di morbilità e mortalità, in genere all'inizio e alla fine della giornata, weekend e giorni festivi inclusi. Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione nel caso in cui questa avvenga per via intragastrica.

▼M4

35. Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, al termine della prima settimana dello studio e successivamente a cadenza mensile. Le osservazioni devono rispettare un protocollo che limiti al minimo indispensabile le differenze tra i singoli e non devono dipendere dai risultati del gruppo esaminato. Le osservazioni del caso vanno eseguite fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e all'incirca sempre allo stesso orario. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue la prova. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle membrane mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività del sistema nervoso autonomo (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Verranno inoltre registrate le modifiche osservate nel comportamento, nella postura e nella risposta alla manipolazione, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipi (per esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (per esempio automutilazione, marcia a ritroso) (24).

36. Tutti gli animali devono essere sottoposti a un esame oftalmologico con un oftalmoscopio o un altro dispositivo idoneo, prima della prima somministrazione della sostanza chimica in esame. Al termine dello studio, questo esame deve essere condotto preferibilmente su tutti gli animali, ma almeno sui gruppi ad alta dose e di controllo. Se si riscontrano alterazioni degli occhi correlate al trattamento è necessario esaminare tutti gli animali. Se da un'analisi strutturale o da altre informazioni si riscontra una tossicità oculare, la frequenza degli esami oculari va intensificata.

37. Per le sostanze chimiche per cui prove precedenti di tossicità a dose ripetuta a 28 giorni e/o a 90 giorni hanno indicato potenziali effetti neurotossici, possono essere svolte valutazioni facoltative della reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (24) (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (25), (26), (27), della forza di presa (28) e dell'attività motoria (29) prima dell'inizio dello studio e a cadenza trimestrale dopo l'inizio dello studio fino al 12° mese incluso, così come alla fine dello studio (se più lungo di 12 mesi). Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate anche procedure alternative non indicate nella bibliografia.

38. Le sostanze chimiche per cui prove di tossicità a dose ripetuta a 28 giorni e/o a 90 giorni hanno indicato effetti potenzialmente immunotossici, alla fine dello studio possono essere sottoposte ad ulteriori analisi facoltative di tale parametro.

Peso corporeo, consumo di cibo/acqua ed efficienza alimentare

39. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio del trattamento, almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Le misurazioni del consumo di cibo e dell'efficienza alimentare devono essere effettuati almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Se la sostanza chimica è somministrata con l'acqua di abbeveraggio, il consumo di acqua deve essere misurato almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. È utile tener conto della misurazione del consumo di acqua anche negli studi in cui quest'ultimo è alterato.

▼M4

Esami ematologici e biochimico-clinici

40. Negli studi che prevedono la presenza di roditori, vanno svolti esami ematologici su almeno 10 animali di sesso maschile e 10 animali di sesso femminile per gruppo, a 3, 6 e 12 mesi, così come alla fine dello studio (se di durata superiore a 12 mesi), sempre sugli stessi animali. Se sono previsti dei topi, può essere necessario prevedere animali satellite per poter eseguire tutti gli esami ematologici del caso (cfr. paragrafo 18). Negli studi con non roditori, saranno presi dei campioni da quantità minori di animali (ad esempio 4 animali per sesso per ciascun gruppo negli studi con cani), a stadi intermedi e alla fine dello studio, analogamente ai roditori. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono necessariamente essere condotte se non è stato riscontrato nessun effetto in base ai parametri ematologici in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico, ad esempio con punture cardiache o dal seno retro-orbitale, sotto anestesia.

41. Vanno esaminati i seguenti parametri (30): conteggio totale e differenziato dei leucociti, conteggio degli eritrociti, conteggio delle piastrine, ematocrito (volume sanguigno occupato dalla componente eritrocitaria), volume corpuscolare medio, emoglobina corpuscolare media, concentrazione di emoglobina corpuscolare media, tempo di prototrombina e tempo di tromboplastina parziale attivata. Possono essere misurati anche altri parametri ematologici come i corpi di Heinz o un'altra morfologia eritrocitaria atipica o metaemoglobina, se del caso, a seconda della tossicità della sostanza chimica in esame. Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza chimica in esame. Se la sostanza chimica in esame ha un effetto sul sistema ematopoietico, possono essere indicati anche il conteggio dei reticolociti e la citologia del midollo osseo, sebbene questi non siano necessariamente esami di routine.

42. Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, gli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da almeno 10 animali di sesso maschile e 10 animali di sesso femminile per gruppo, ai medesimi intervalli di tempo specificati per gli esami ematologici e sempre sugli stessi animali. Se sono previsti dei topi, può essere necessario prevedere animali satellite per poter eseguire tutte le determinazioni biochimiche cliniche del caso. Negli studi con non roditori, saranno presi dei campioni da quantità minori di animali (ad esempio 4 animali per sesso per ciascun gruppo negli studi con cani), a stadi intermedi e alla fine dello studio, analogamente ai roditori. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono essere necessariamente condotte se non è stato riscontrato nessun effetto in base ai parametri di biochimica clinica in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni (ad eccezione dei topi). Vanno esaminati i seguenti parametri (30): glucosio, urea (azoto ureico), creatinina, proteine totali, albumina, calcio, sodio, potassio, colesterolo totale, almeno due esami idonei alla valutazione epatocellulare (alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, glutammato deidrogenasi, acidi biliari totali) (31) e almeno due esami idonei alla valutazione epatobiliare (fosfatasi alcalina, gamma-glutamil transferasi, 5'-nucleotidasi, bilirubina totale, acidi biliari totali) (31). Se opportuno possono essere misurati anche altri parametri di chimica clinica, come i trigliceridi a digiuno, ormoni specifici e colinesterasi, a seconda della tossicità della sostanza chimica in esame. Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza chimica in esame.

▼M4

43. L'esame delle urine va effettuato su almeno 10 esemplari di sesso maschile e 10 esemplari di sesso femminile per gruppo sui campioni raccolti seguendo gli stessi intervalli applicati in ambito ematologico e di chimica clinica. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono essere necessariamente condotte se non è stato riscontrato nessun effetto sull'esame delle urine in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. I seguenti parametri sono stati inclusi in una raccomandazione di esperti su studi di patologia clinica (30): aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine totali e glucosio. Altre determinazioni riguardano il chetone, l'urobilinogeno, la bilirubina e il sangue occulto. Se necessario, per ampliare lo studio dell'effetto o degli effetti osservato/i è possibile impiegare ulteriori parametri.

44. Generalmente si considera necessario determinare le variabili di riferimento di natura ematologica e di biochimica clinica prima di iniziare un trattamento in studi che coinvolgono dei cani, ma ciò non è ritenuto necessario negli studi che prevedono l'uso di roditori (30). Tuttavia se non si dispone di dati storici di riferimento adeguati (cfr. paragrafo 50), si dovrebbe considerare di produrre tali dati.

Patologia

Necroscopia macroscopica

45. Di norma tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necroscopia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Tuttavia si può anche disporre (per i gruppi che saranno sacrificati nel corso dello studio o per i gruppi satellite) che le osservazioni siano limitate a parametri specifici essenziali, come la neurotossicità o l'immunotossicità (cfr. paragrafo 19). Gli animali in oggetto non devono necessariamente essere sottoposti ad autopsia e alle procedure successive descritte nei seguenti paragrafi. Per gli animali sentinella, valutando caso per caso può essere necessaria un'autopsia, a discrezione del responsabile scientifico dello studio.

46. Va misurato il peso degli organi di ciascun animale, tranne di quelli esclusi dall'ultima parte del paragrafo 45. Le ghiandole surrenali, il cervello, l'epididimo, il cuore, i reni, il fegato, le ovaie, la milza, i testicoli, la tiroide (pesata post-fissazione, con paratiroidi) e l'utero di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. In studi che prevedono l'uso di topi, la misurazione del peso delle ghiandole surrenali è facoltativa.

47. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per il previsto esame istopatologico successivo (32) (i tessuti tra parentesi quadre sono facoltativi):

tutte le lesioni macroscopiche	cuore	pancreas	stomaco (prestomaco, stomaco ghiandolare)
ghiandole surrenali	ileo	ghiandola paratiroidea	[denti]
aorta	digiuno	nervo periferico	testicoli
cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	reni	pituitaria	timo
intestino cieco	ghiandola lacrimale (esorbitale)	prostata	tiroide
cervice	fegato	retto	[lingua]

▼M4

ghiandola della coagulazione	polmone	ghiandola salivare	trachea
colon	linfonodi (superficiali e profondi)	vescicola seminale	vescica
duodeno	ghiandola mammaria (obbligatoria per esemplari di sesso femminile e, se visibile ai fini della la dissezione, anche per quelli di sesso maschile)	muscolo scheletrico	utero (cervice inclusa)
epididimo	[tratto respiratorio superiore, incluso il naso, i turbinati e i seni paranasali]	pelle	[uretere]
occhi (retina inclusa)	esofago	midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare)	[uretra]
[femore con articolazione]	[bulbo olfattivo]	milza	vagina
cistifellea (eccetto per i topi)	ovaia	[sterno]	sezione di midollo osseo e/o un aspirato di midollo osseo fresco
ghiandola di Harder			

In caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno conservati entrambi gli organi. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza chimica in esame. Negli studi che prevedono una somministrazione per via cutanea, vanno preservati gli organi di cui all'elenco riferito alla via orale. In particolare, sono essenziali il campionamento e la conservazione della pelle della zona di applicazione della sostanza. In studi che prevedono la via inalatoria come metodo di somministrazione, l'elenco dei tessuti da conservare ed esaminare in relazione al tratto respiratorio deve corrispondere alle raccomandazioni contenute nel capitolo B.8 del presente allegato (8) e del capitolo B.29 del presente allegato (9). Per altri organi/tessuti (oltre ai tessuti conservati specificamente del tratto respiratorio) va esaminato l'elenco degli organi relativo alla via orale.

Esame istopatologico

48. Sono disponibili orientamenti sulle buone pratiche nella conduzione di studi di patologia tossicologica (32). Come minimo, gli esami istopatologici devono prevedere quanto segue:

— tutti i tessuti dei gruppi ad alta dose e di controllo,

— tutti i tessuti degli animali che sono morti o sono stati sacrificati nel corso dello studio,

— tutti i tessuti che evidenziano anomalie macroscopiche,

— tessuti bersaglio o tessuti che hanno evidenziato cambiamenti legati al trattamento nel gruppo ad alta dose, di tutti gli animali in tutti gli altri gruppi-dose,

— in caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno esaminati entrambi gli organi.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Dati

49. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione. Le tabelle riassuntive dei dati devono fornire le medie e le deviazioni standard (per dati raccolti in via continuativa) relative agli animali che evidenziano effetti tossici o lesioni, oltre all'indicazione dell'entità delle lesioni.

50. I dati storici di controllo possono essere utili per interpretare i risultati dello studio, ad esempio quando i dati forniti da gruppi di controllo paralleli sembrano divergere significativamente da dati recenti relativi ad animali di controllo dello stesso centro di prova/della stessa colonia. Se valutati, i dati storici di controllo vanno trasmessi dallo stesso laboratorio e devono riferirsi ad animali della medesima età e dello stesso ceppo, nonché essere generati nei cinque anni che precedono lo studio in questione.

51. I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale (paragrafo 8). Questa scelta deve rendere possibili degli aggiustamenti in funzione del grado di sopravvivenza, se necessario.

Relazione sulla prova

52. La relazione sulla prova deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— origine della sostanza chimica,

— numero del lotto,

— certificazione dell'analisi chimica.

Veicolo (se del caso):

— giustificazione della scelta del veicolo (se diverso dall'acqua).

Animali sperimentali:

— specie/ceppo utilizzato e giustificazione della scelta effettuata,

— numero, età e sesso degli animali all'inizio della prova,

▼M4

— origine, condizioni di stabulazione, dieta ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio della prova.

Condizioni sperimentali:

— criteri di scelta della via di somministrazione e della dose,

— laddove opportuno, metodi statistici usati per analizzare i dati,

— dettagli sulla formulazione della sostanza chimica in esame/la preparazione della dieta,

— dati di analisi sulla concentrazione, la stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— via di somministrazione e relativi dettagli della sostanza chimica in esame,

— per gli studi che prevedono la somministrazione per via inalatoria, scelta tra esposizione «a naso solo» o «a corpo intero»,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/giorno) e, se del caso, fattore di conversione tra la concentrazione della sostanza chimica in esame nella dieta/acqua di abbeveraggio (mg/kg o ppm) e la dose effettiva,

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati (vanno indicati dati da presentare sotto forma di tabelle e dati individuali sugli animali):

— dati sulla sopravvivenza degli animali,

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo, calcoli sull'efficienza alimentare, se effettuati, nonché consumo di acqua, se del caso,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità,

— natura, incidenza (e, se classificata, la gravità) e durata dei segni clinici (temporanei o permanenti),

— esame oftalmologico,

— esami ematologici,

— esami di biochimica clinica,

— esame delle urine,

— risultati di tutti gli esami sulla neurotossicità o immunotossicità,

— peso corporeo finale,

— peso degli organi (anche in relazione al peso corporeo, se del caso),

— referti autoptici,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici relativi al trattamento,

— dati sull'assorbimento, se disponibili.

▼M4

Elaborazione statistica dei risultati, se del caso

Discussione dei risultati, compreso:

— rapporti dose-risposta,

— esame di tutte le informazioni sulle modalità di azione,

— discussione su tutti gli approcci di modellizzazione,

— determinazione BMD, NOAEL o LOAEL,

— dati storici di controllo,

— rilevanza per gli esseri umani.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Capitolo B.27 del presente allegato, Test di tossicità orale subcronica Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori.

(6) OCSE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Capitolo B.8 del presente allegato, Tossicità subacuta a dose ripetuta (28 giorni) per inalazione.

(9) Capitolo B.29 del presente allegato, Studio di tossicità subcronica a dose ripetuta (90 giorni) per inalazione

(10) Capitolo B.9 del presente allegato, Tossicità a dose ripetuta (28 giorni) per via cutanea.

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OCSE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OCSE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) 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).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼B

B.31. **STUDIO DI TOSSICITÀ PRENATALE**

1. **METODO**

Questo metodo corrisponde al TG 414 (2001) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo di test della tossicità prenatale è disegnato per fornire informazioni generiche riguardanti gli effetti dell'esposizione prenatale a determinate sostanze sia su femmine gravide che sull'organismo che si sta sviluppando nell'utero. Il test può comprendere la valutazione degli effetti sulla madre e delle cause della morte o di anomalie fisiche strutturali o alterazioni della crescita del feto. I deficit funzionali, per quanto costituiscano una parte importante dello sviluppo, non sono parte integrante del presente metodo e possono essere valutati in uno studio separato o come segmento aggiuntivo a questo studio, usando il metodo di test della neurotossicità nella fase di sviluppo. Per ottenere dati sull'analisi dei deficit funzionali e di altri effetti postnatali si rimanda, a seconda dei casi, al metodo di test per lo studio della tossicità sulla riproduzione in due generazioni o a quello sulla neurotossicità in fase di sviluppo.

Questo metodo di test può richiedere un adattamento particolare in alcuni casi, ad esempio in funzione delle conoscenze specifiche circa le proprietà fisico-chimiche o tossicologiche della sostanza di saggio. Tale adattamento è accettabile laddove, in base ad opportuni riscontri scientifici, risulti utile ai fini della raccolta di dati più specifici. In questo caso tali prove scientifiche vanno attentamente documentate nella relazione sullo studio.

1.2. DEFINIZIONI

Tossicologia prenatale: studio degli effetti negativi sull'organismo che si sta sviluppando che possono derivare dall'esposizione prima del concepimento, durante lo sviluppo prenatale o successivamente alla nascita fino al momento della maturazione sessuale. Le manifestazioni principali della tossicità sullo sviluppo comprendono 1) morte dell'organismo; 2) anomalia strutturale; 3) alterazione della crescita; e 4) deficit funzionali. L'espressione «tossicologia prenatale» ha soppiantato il termine «teratologia», utilizzato in passato.

Effetto negativo: qualsiasi alterazione rispetto al valore basale correlata al trattamento che riduca la capacità di un organismo di sopravvivere, riprodursi o adattarsi all'ambiente. Per quanto concerne la tossicologia prenatale, nel senso più ampio tale termine comprende qualunque effetto che interferisca con il normale sviluppo del concepito, sia prima che dopo la nascita.

Alterazione della crescita: alterazione di un organo o del peso corporeo o delle dimensioni della prole.

Alterazioni (anomalie): alterazioni strutturali dello sviluppo, comprendenti sia malformazioni che variazioni (28).

Malformazione/anomalia grave: modifica strutturale considerata dannosa per l'animale (può anche essere letale) e solitamente rara.

▼B

Variazione/anomalia non grave: modifica strutturale considerata scarsamente o per nulla dannosa per l'animale; può essere transitoria e può comparire con relativa frequenza nella popolazione di controllo.

Concepito: l'insieme dei derivati di un ovulo fertilizzato a qualsiasi stadio di sviluppo, dalla fecondazione fino alla nascita, comprendente le membrane extraembrionali nonché l'embrione o il feto.

Impianto (annidamento): attecchimento della blastocisti sul rivestimento epiteliale dell'utero, compresi la sua penetrazione attraverso l'epitelio uterino e il suo annidamento nell'endometrio.

Embrione: lo stadio precoce o di sviluppo di qualsiasi organismo, in particolare il prodotto in via di sviluppo della fecondazione di un uovo, dal momento in cui si individua l'asse longitudinale fino alla comparsa di tutte le strutture principali.

Embriotossicità: insieme di caratteristiche dannose per la struttura anatomica di un embrione, per il suo sviluppo, la crescita e/o la vitalità.

Feto: prodotto del concepimento nel periodo post-embrionale, prima della nascita.

Fetotossicità: insieme di caratteristiche dannose per la struttura anatomica di un feto, per il suo sviluppo, la crescita e/o la vitalità.

Aborto: espulsione prematura dall'utero dei prodotti del concepimento (ossia embrioni o feti non vitali).

Riassorbimento: un concepito che, dopo essersi impiantato nell'utero, muore e viene, o è stato, riassorbito.

Riassorbimento precoce: segni di avvenuto impianto in assenza di embrione o feto riconoscibili.

Riassorbimento tardivo: embrione o feto morto con alterazioni degenerative esterne.

NOAEL: abbreviazione di no-observed-adverse-effect level (livello al quale non si osservano effetti negativi) che indica la dose o il livello di esposizione massimi ai quali non si osservano effetti negativi correlati al trattamento.

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL TEST

Di norma la sostanza di saggio viene somministrata a femmine gravide di animali da laboratorio come minimo dal momento dell'impianto fino al giorno precedente la soppressione programmata, che deve avvenire quanto più in prossimità della normale data del parto, senza tuttavia rischiare di perdere utili dati a causa di un parto prematuro. Il metodo di test non è inteso a esaminare esclusivamente il periodo dell'organogenesi (cioè i giorni 5-15 nei roditori, e i giorni 6-18 nei conigli), bensì anche gli effetti antecedenti all'impianto, se di pertinenza, lungo tutto il periodo di gestazione fino al giorno precedente l'isterotomia con taglio cesareo. Poco prima dell'intervento le femmine vengono soppresse, il contenuto dell'utero viene esaminato e i feti vengono valutati alla ricerca di anomalie visibili esteriormente e di alterazioni dei tessuti molli e dello scheletro.

▼B

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI TEST

1.5.1. **Selezione delle specie animali**

Si raccomanda di effettuare il test sulle specie più adeguate e di utilizzare le specie e i ceppi da laboratorio solitamente impiegati per i test di tossicità prenatale. La specie di roditori di elezione è il ratto, mentre tra i non roditori si preferirà il coniglio. In caso di utilizzo di un'altra specie è necessario motivarne la scelta.

1.5.2. **Condizioni di stabulazione e alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ºC (± 3º) per i roditori e 18 ºC (± 3º) per i conigli. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

Le procedure di accoppiamento vanno effettuate in gabbie adeguate allo scopo. Sebbene sia preferibile alloggiare singolarmente gli animali accoppiati, è accettabile anche che vengano alloggiati in piccoli gruppi nella stessa gabbia.

1.5.3. **Preparazione degli animali**

Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Gli animali sottoposti al test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. Gli animali di tutti i gruppi del test devono essere, per quanto praticamente possibile, di età e peso uniformi. Per ciascun livello di dose vanno usate giovani femmine adulte nullipare. Le femmine vanno fatte accoppiare con maschi della stessa specie e dello stesso ceppo, evitando l'accoppiamento fra consanguinei della stessa generazione. Nei roditori il giorno 0 di gestazione è il giorno in cui si osserva un tappo vaginale e/o la presenza di spermatozoi; nei conigli il giorno 0 è in genere il giorno del coito o dell'inseminazione artificiale, qualora venga utilizzata questa tecnica. Le femmine accoppiate vanno assegnate a random ai gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie vanno sistemate in modo da ridurre al minimo i possibili effetti dovuti alla loro posizione nell'ambiente. A ciascun animale va assegnato un numero identificativo unico. Se le femmine vengono fatte accoppiare in lotti, gli individui di ciascun lotto vanno equamente distribuiti nei vari gruppi. Analogamente, le femmine fecondate dallo stesso maschio vanno equamente distribuite tra i vari gruppi.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Numero e sesso degli animali**

Ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve contenere un numero sufficiente di femmine da fornire all'incirca 20 femmine con siti di impianto all'autopsia. Gruppi con meno di 16 femmine che presentano siti di impianto potrebbero risultare inadeguati. La mortalità delle femmine gravide non invalida necessariamente lo studio, a condizione che non superi il 10 % circa.

▼B

1.6.2. **Preparazione delle dosi**

Qualora per facilitare il dosaggio si impiegasse un veicolo o un altro additivo, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo e ritenzione o escrezione della sostanza di saggio; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di saggio che possono alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali. Il veicolo non deve avere effetti tossici sullo sviluppo, né influire sulla riproduzione.

1.6.3. **Dosaggio**

Di norma la sostanza di saggio va somministrata quotidianamente dal momento dell'impianto (ad esempio il giorno 5 dopo l'accoppiamento) fino al giorno precedente l'isterotomia. Se studi preliminari, ove disponibili, non indicano un alto potenziale di perdita preimpianto, il trattamento può comprendere l'intero periodo di gestazione, dall'accoppiamento fino al giorno precedente la soppressione. È noto che la manipolazione inadeguata delle femmine gravide o la loro esposizione a stress può provocare la perdita del feto o dell'embrione. Per evitare aborti dovuti a fattori non correlati al trattamento occorre maneggiare le femmine gravide solo se strettamente necessario, proteggendole da stress causati da fattori esterni (ad esempio il rumore).

Si somministrano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo corrispondente. Gli animali sani vanno assegnati per randomizzazione ai gruppi di controllo e di trattamento. I livelli di dose vanno distanziati in modo che gli effetti tossici siano graduali. A meno che la natura fisico-chimica o le proprietà biologiche della sostanza di saggio non impongano limiti in tal senso, il livello della dose più elevata va scelto con l'obiettivo di indurre un determinato grado di tossicità sullo sviluppo dei feti e/o di tossicità materna (segni clinici oppure riduzione del peso corporeo), senza tuttavia provocarne il decesso o arrecare loro gravi sofferenze. Almeno un livello intermedio di dose deve produrre effetti tossici minimi osservabili. Il livello della dose minima non deve produrre segni di tossicità né nella madre, né nel feto. I livelli di dose devono essere selezionati in sequenza decrescente allo scopo di dimostrare la correlazione tra il dosaggio e la risposta e determinare il NOAEL. Per fissare le dosi a livelli decrescenti è utile utilizzare fattori compresi tra due e quattro; spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di trattamento piuttosto che utilizzare intervalli molto distanziati (ad esempio un fattore superiore a 10) fra i dosaggi. Sebbene l'obiettivo sia determinare il NOAEL nelle femmine gravide, sono ritenuti comunque validi anche gli studi che non stabiliscono tale livello (1).

I livelli di dose vanno selezionati tenendo conto di eventuali dati esistenti sulla tossicità, oltre alle informazioni sul metabolismo e sulla tossicocinetica della sostanza di saggio o di sostanze ad essa correlate. Tali dati contribuiscono altresì a dimostrare l'adeguatezza del regime di dosaggio.

Occorre utilizzare al contempo un gruppo di controllo che va sottoposto a trattamento simulato oppure, qualora si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza di saggio, un gruppo che va trattato col solo veicolo. La quantità della sostanza di saggio o del veicolo da somministrare a tutti i gruppi deve essere uguale. Gli animali di controllo devono essere manipolati esattamente come quelli sottoposti al test. La quantità del veicolo da somministrare ai gruppi di controllo deve essere equivalente a quella più elevata utilizzata (come nel gruppo di trattamento con dosaggio più basso).

▼B

1.6.4. **Test limite**

Se, a seguito di somministrazione orale di un unico livello di dose di almeno 1 000 mg/kg peso corporeo/die, usando le procedure descritte nel presente studio, non si osservano effetti tossici nelle femmine gravide o nella loro progenie e qualora, sulla base di dati esistenti (ad esempio relativi a sostanze stutturalmente simili e/o metabolicamente correlate) non si preveda alcun effetto, lo studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario. Il livello probabile di esposizione umana può suggerire la necessità di utilizzare un livello di dose orale più elevata nel test limite. Per altre vie di somministrazione (ad es. inalazione o applicazione cutanea) sono spesso le proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio a indicare e limitare il massimo livello di esposizione raggiungibile (ad esempio l'applicazione cutanea non deve provocare grave tossicità locale).

1.6.5. **Somministrazione delle dosi**

La sostanza di saggio o il veicolo vengono normalmente somministrati oralmente per intubazione. Volendo utilizzare un'altra via di somministrazione occorre motivare e argomentare tale scelta; in tal caso potrebbe essere necessario modificare opportunamente il protocollo sperimentale (2)(3)(4). La sostanza di saggio va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora.

La dose somministrata ai singoli animali deve normalmente essere basata sulla determinazione più recente del peso corporeo individuale. Occorre tuttavia prestare particolare attenzione nel regolare la dose durante l'ultimo periodo della gravidanza. Nel selezionare le dosi è utile ricorrere a dati disponibili per evitare il rischio di provocare una eccessiva tossicità materna. Comunque, gli animali in cui si dovessero osservare effetti di eccessiva tossicità vanno soppressi con metodi non cruenti. Se diverse femmine gravide mostrano segni di eccessiva tossicità, occorre prendere in considerazione l'opportunità di sopprimere l'intero gruppo corrispondente alla dose in questione. Quando la sostanza viene somministrata mediante sonda, va data di preferenza in un'unica dose mediante sondino gastrico od opportuna cannula da intubazione. Il massimo volume di liquido che può essere somministrato in un'unica volta dipende dalle dimensioni dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Se si utilizza olio di semi di mais come veicolo il volume non deve superare 0,4 ml/100 g di peso corporeo. La variabilità dei volumi somministrati va ridotta al minimo regolando le concentrazioni in modo da assicurare un volume costante in tutti i livelli di dose.

1.6.6. **Osservazione delle femmine gravide**

Le osservazioni cliniche vanno eseguite e registrate almeno una volta al giorno e preferibilmente alla stessa ora, tenendo conto della finestra di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Si registrano le condizioni degli animali, compresi mortalità, agonia, alterazioni pertinenti del comportamento e qualunque segno di evidente tossicità.

1.6.7. **Peso corporeo e consumo di cibo**

Le femmine vanno pesate il giorno 0 della gestazione o comunque entro il giorno 3 della gestazione, nel caso si tratti di animali accoppiati in una data prestabilita forniti da un allevatore esterno, oltre che il primo giorno di somministrazione, almeno ogni 3 giorni durante il periodo di somministrazione e il giorno della soppressione.

▼B

Il consumo di cibo va registrato a intervalli di tre giorni, in coincidenza dei giorni in cui si determina il peso corporeo.

1.6.8. **Esame autoptico**

Le femmine vanno soppresse un giorno prima della data prevista del parto. Le femmine che presentano segni di aborto o parto prematuro prima della soppressione programmata vanno soppresse e sottoposte a esame macroscopico completo.

Al momento della soppressione o del decesso durante lo studio le femmine vanno esaminate macroscopicamente alla ricerca di eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche. Per garantire la completa imparzialità nell'interpretazione dei dati è preferibile che la valutazione delle femmine durante l'isterotomia e le successive analisi dei feti siano effettuate senza conoscere il gruppo di trattamento.

1.6.9. **Esame del contenuto uterino**

Immediatamente dopo la soppressione o appena possibile dopo il decesso occorre asportare l'utero e accertare lo stato di gravidanza degli animali. Gli uteri che non risultino gravidi vanno ulteriormente esaminati (ad esempio con colorazione mediante solfuro di ammonio per i roditori e colorazione di Salewski o un metodo alternativo adeguato per i conigli) per confermare l'assenza di una gravidanza (5).

Si procede a pesatura degli uteri gravidi e del collo cervicale. Il peso degli uteri gravidi non va invece rilevato per gli animali trovati morti durante lo studio.

Nelle femmine gravide occorre determinare il numero di corpi lutei.

Il contenuto uterino va esaminato per determinare il numero di embrioni o feti, sia morti che vitali. Occorre descrivere il grado di riassorbimento allo scopo di stimare il momento relativo della morte del concepito (vedi sezione 1.2).

1.6.10. **Esame dei feti**

È necessario determinare sesso e peso corporeo di ciascun feto.

Ciascun feto va esaminato alla ricerca di alterazioni esteriori (6).

L'esame dei feti deve essere teso a individuare alterazioni scheletriche e dei tessuti molli (ad esempio, variazioni e malformazioni o anomalie) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)-(22)(23)(24). La classificazione delle alterazioni fetali in categorie è preferibile ma non indispensabile. Quando si effettua tale classificazione occorre specificare con chiarezza i criteri utilizzati per la definizione di ciascuna categoria. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttore, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo.

Per quanto concerne i roditori, circa la metà di ciascuna nidiata va preparata ed esaminata alla ricerca di alterazioni scheletriche. I restanti piccoli vanno preparati ed esaminati per l'analisi dei tessuti molli mediante sezionamento seriale secondo metodi adeguati o accettati oppure procedendo con cautela alla dissezione macroscopica dei tessuti.

▼B

Per quanto riguarda i non roditori, ad esempio i conigli, tutti i feti vanno sottoposti ad analisi sia dei tessuti molli che dello scheletro. I corpi di questi feti vanno esaminati mediante cauta dissezione alla ricerca di eventuali alterazioni dei tessuti molli, compresa, ove opportuno, la struttura cardiaca interna (25). Di metà dei feti esaminati in questo modo è necessario rimuovere la testa e trattarla per analizzare ulteriormente i tessuti molli (compresi occhi, cervello, cavità nasali e lingua) con metodi di sezionamento seriale standard (26) o un metodo altrettanto sensibile. I corpi di questi feti, nonché i restanti feti intatti, vanno trattati ed esaminati alla ricerca di alterazioni scheletriche, utilizzando gli stessi metodi descritti per i roditori.

2. DATI

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati vanno riportati individualmente per ciascuna femmina gravida e per la loro prole e riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del test, il numero di animali trovati morti durante il test o soppressi per motivi umanitari, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità di eventuali effetti tossici, i tipi di osservazioni embrio/fetali, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le figliate.

È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato, usando la nidiata come unità di base per l'analisi dei dati. Occorre utilizzare un metodo statistico generalmente accettato; i metodi statistici vanno selezionati come parte del disegno sperimentale e devono essere giustificati. Occorre riportare anche i dati sugli animali che non sono sopravvissuti fino alla soppressione programmata, che peraltro possono essere inclusi nel calcolo delle medie del gruppo, se pertinenti. La pertinenza dei dati ottenuti da tali animali, e pertanto l'inclusione o l'esclusione dal calcolo delle medie del gruppo, va motivata e giudicata singolarmente.

2.2. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio di tossicità sullo sviluppo prenatale vanno valutati in base agli effetti osservati. La valutazione deve includere le seguenti informazioni:

— risultati dei test sulle femmine gravide e sui feti/embrioni, ivi compresa la valutazione del rapporto, o la sua assenza, fra l'esposizione degli animali alla sostanza di saggio e l'incidenza e la gravità di tutti gli effetti,

— criteri applicati per l'eventuale suddivisione in categorie delle alterazioni fetali esteriori, a carico dei tessuti molli e dello scheletro,

▼B

— se pertinenti, dati storici di controllo per una migliore interpretazione dei risultati dello studio,

— numeri utilizzati per il calcolo delle percentuali o degli indici

— adeguata analisi statistica dei reperti dello studio, se di pertinenza; dati sul metodo di analisi per consentire ad un revisore/esperto di statistica indipendente di rivalutare e ricostruire l'analisi.

In assenza di effetti tossici a conclusione di uno studio occorre prendere in considerazione l'opportunità di eseguire ulteriori indagini per determinare l'assorbimento e la biodisponibilità della sostanza di saggio.

2.3. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uno studio della tossicità sullo sviluppo prenatale deve fornire informazioni sugli effetti dell'esposizione ripetuta ad una sostanza durante la gravidanza, sulle femmine gravide e sullo sviluppo intrauterino della prole. I risultati dello studio vanno interpretati insieme ai dati derivanti da studi subcronici, sulla riproduzione, di tossicocinetica e altri studi disponibili. Poiché l'enfasi viene posta sia sulla tossicità generale, in termini di tossicità materna, che sugli endpoint di tossicità sullo sviluppo, i risultati dello studio consentiranno in parte di discriminare fra gli effetti sullo sviluppo che si verificano in assenza di tossicità generale e quelli che sono indotti solo a livelli che risultano tossici anche per le madri (27).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni specifiche:

Sostanza di saggio:

— natura fisica e, ove pertinenti, proprietà fisico-chimiche,

— identificazione, compreso numero CAS se noto/stabilito,

— purezza.

Veicolo (se pertinente):

— giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

— specie e ceppo,

— numero ed età degli animali,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso individuale degli animali all'inizio del test.

Condizioni del test:

— motivazione per la selezione del livello delle dosi,

— dettagli sulla formulazione/preparazione della sostanza di saggio somministrata nella dieta, concentrazioni ottenute, stabilità e omogeneità della preparazione,

▼B

— dettagli sulla somministrazione della sostanza di saggio,

— conversione dalla concentrazione della sostanza di saggio in dieta/acqua potabile (ppm) alla dose vera e propria (mg/kg peso corporeo/die), se pertinente,

— condizioni ambientali,

— dettagli circa la qualità di cibo e acqua.

Risultati:

Dati sulla tossicità materna in funzione della dose (elenco non esaustivo):

— numero di animali all'inizio del test, numero di animali sopravvissuti, numero di gravide e numero di femmine che hanno abortito, numero di femmine che hanno partorito precocemente,

— giorno del decesso durante lo studio o indicazione del fatto che gli animali sono sopravvissuti fino alla soppressione programmata,

— i dati sugli animali non sopravvissuti fino alla soppressione programmata vanno riportati ma non inclusi nelle analisi statistiche di confronto fra i gruppi,

— giorno di osservazione di ciascun segno clinico anomalo e suo successivo decorso,

— peso corporeo, modifica del peso corporeo e peso dell'utero gravido, compresa, facoltativamente, modifica del peso corporeo corretta in base al peso dell'utero gravido,

— consumo di cibo ed eventualmente di acqua,

— reperti autoptici, compreso il peso dell'utero,

— valori di NOAEL in riferimento agli effetti sulle genitrici e sullo sviluppo.

Endpoint relativi allo sviluppo per ciascuna dose e nidiata (con impianti) ed inoltre:

— numero di corpi lutei,

— numero di impianti, numero e percentuale di feti vivi e morti e di riassorbimenti,

— numero e percentuale di perdite pre- e post-impianto.

Endpoint relativi allo sviluppo per ciascuna dose e figliata (con feti vivi) ed inoltre:

— numero e percentuale di piccoli vivi,

— rapporto fra i sessi,

— peso corporeo fetale, preferibilmente per sesso e con i sessi combinati,

— malformazioni esteriori, dei tessuti molli e scheletriche e altre alterazioni di rilievo,

— criteri per la suddivisione in categorie, se pertinenti,

▼B

— numero totale e percentuale di feti e nidiate con eventuali alterazioni esteriori, dei tessuti molli o scheletriche, oltre ai tipi e all'incidenza delle singole anomalie e di altre alterazioni rilevanti.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Marmai,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH- Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, andMutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of' Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. STUDI DI CANCEROGENESI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 451 (2009). La prima linea guida n. 451 sugli studi di carcinogenesi è stata adottata nel 1981. Si è ritenuto necessario sviluppare questa versione riveduta del metodo di prova B.32 alla luce dei recenti progressi nell'ambito del benessere animale e degli obblighi normativi (2) (3) (4) (5) (6). L'aggiornamento del presente metodo di prova B.32 si è svolto in parallelo alle revisioni del capitolo B.30 del presente allegato, studi di tossicità cronica, e del capitolo B.33 del presente allegato, studi combinati di tossicità cronica/cancerogenesi, con l'obiettivo di integrare le informazioni in relazione agli animali usati nello studio e di fornire maggiori dettagli sulla scelta delle dosi. Il presente metodo di prova B.32 è concepito per testare un'ampia serie di sostanze chimiche, tra cui pesticidi e sostanze chimiche industriali. Va tuttavia specificato che alcuni dettagli e requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici (cfr. Conferenza internazionale sull'armonizzazione, *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).

2. La maggior parte degli studi di cancerogenesi è svolta su specie di roditori, pertanto il presente metodo di prova è destinato ad applicarsi in primo luogo agli studi che hanno ad oggetto queste specie. Se dovesse risultare necessario condurre tali studi sui non roditori, possono trovare applicazione, con le opportune modifiche, anche i principi e le procedure esposti nel presente metodo di prova, congiuntamente a quelli specificati al capitolo B.27 del presente allegato (Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori) (6). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 — *Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* fornisce ulteriori orientamenti al riguardo (7).

3. Le tre vie principali di somministrazione negli studi di cancerogenesi sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione è fatta in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza in esame e della più probabile via di esposizione degli esseri umani. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta della via di esposizione.

4. Questo metodo di prova è incentrato sull'esposizione per via orale, ossia la via più usata negli studi di cancerogenesi. Gli studi sulla cancerogenesi che prevedono un'esposizione per via cutanea o per inalazione possono essere necessari anche per la valutazione del rischio per la salute umana e/o possono essere richiesti da determinati regimi normativi, ma entrambe le vie di esposizione evidenziano una complessità considerevole sul piano tecnico. Questo tipo di studi dovrà essere impostato caso per caso, ma il metodo di prova qui esposto per la valutazione e l'esame della cancerogenesi con somministrazione orale potrebbe costituire la base di un protocollo per studi per inalazione e/o cutanei, per quanto riguarda le raccomandazioni per i periodi di trattamenti, i parametri clinici e patologici ecc. L'OCSE ha pubblicato documenti di orientamento sulla somministrazione delle sostanze chimiche in esame per via cutanea (7) e per inalazione (7) (8). Il capitolo B.8 del presente allegato (9) e il capitolo B.29 del presente allegato (10), insieme al documento di orientamento dell'OCSE — *Acute inhalation testing* (8) vanno consultati in particolare nell'impostazione di studi a lungo termine che prevedono l'esposizione per inalazione. Il capitolo B.9 del presente allegato (11) va consultato nel caso di prove svolte per via cutanea.

▼M4

5. Lo studio della cancerogenesi fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta nell'arco di un periodo che può estendersi fino all'intero ciclo di vita delle specie usate. Con questo studio sarà possibile ottenere informazioni sugli effetti tossici della sostanza chimica in esame, tra cui la potenziale cancerogenesi, oltre a dare indicazioni su organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo. Esso può inoltre fornire indicazioni sul cosiddetto *no-observed-adverse-effect level* (livello fino al quale non si osservano effetti dannosi) per gli effetti tossici e, nel caso di cancerogeni non genotossici, per le risposte tumorali, consentendo la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione umana. Si sottolinea inoltre la necessità di sottoporre gli animali ad attente osservazioni cliniche, allo scopo di ottenere il maggior numero possibile di informazioni.

6. Tra gli obiettivi degli studi di cancerogenesi condotti con questo metodo di prova figurano:

— l'individuazione delle proprietà cancerogene di una sostanza chimica in esame, che risultano in una maggiore incidenza di neoplasmi, una più grande proporzione di neoplasmi maligni o una riduzione nei tempi di latenza di neoplasmi, il tutto in confronto a gruppi di controllo,

— l'individuazione di uno o più organi bersaglio di cancerogenesi,

— l'individuazione dei tempi di latenza di neoplasmi,

— la caratterizzazione del rapporto dose-risposta al tumore,

— l'individuazione di un NOAEL (*no-observed-adverse-effect level* — livello fino al quale non si osservano effetti dannosi), o di un punto di partenza per la determinazione di una dose di riferimento (BMD),

— l'estrapolazione di effetti cancerogeni relativi a un'esposizione umana a basse dosi,

— la produzione di dati per verificare le ipotesi relative alle modalità di azione (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. Nella valutazione e nell'esame della potenziale cancerogenesi di una sostanza chimica in esame, prima di condurre lo studio, i laboratori che eseguono la prova devono considerare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame al fine di orientare il disegno sperimentale nella maniera più efficiente per valutare il potenziale di tossicità cronica limitando al minimo necessario l'uso di animali. Le informazioni e considerazioni relative alle modalità di azione di una presunta sostanza cancerogena (2) (7) (12) (13) (14) (15) sono particolarmente importanti, poiché l'impostazione ottimale potrebbe variare a seconda del fatto che una sostanza chimica sia una sostanza cancerogena genotossica nota o presunta. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori indicazioni, tra cui considerazioni in merito alle modalità di azione.

8. Tra le informazioni utili per il disegno sperimentale saranno considerate l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, incluse delle prove di genotossicità, l'impiego o gli impieghi previsti per l'esposizione umana, dati (Q)SAR, di mutagenesi/genotossicità, cancerogenesi e altri dati tossicologici disponibili in merito a sostanze chimiche di struttura affine; i dati tossicocinetici disponibili (dose unica e dose ripetuta, laddove disponibile) e i risultati di altri studi a dose ripetuta. La valutazione della cancerogenesi si effettua una volta ottenuti i primi risultati delle prove

▼M4

di tossicità a dose ripetuta su 28 giorni e/o 90 giorni. Anche prove di iniziazione-promozione di tumori a breve termine possono fornire informazioni utili. È opportuno prendere in considerazione un approccio a tappe nello svolgimento delle prove di cancerogenesi svolte nel quadro della valutazione generale degli effetti potenzialmente nocivi di una particolare sostanza chimica in esame (16) (17) (18) (19).

9. I metodi statistici più adeguati per l'analisi dei risultati, tenuto conto del disegno sperimentale e degli obiettivi, sono stabiliti prima dell'inizio dello studio. Occorre inoltre determinare se le statistiche debbano o meno tenere conto dell'aggiustamento in funzione della sopravvivenza, dell'analisi dei rischi cumulati di tumore legati al tempo di sopravvivenza, dell'analisi dei tempi di latenza del tumore e dell'analisi effettuata in caso di morte prematura degli animali di uno o più gruppi. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) e il documento di orientamento dell'OCSE n. 35 — *Analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (20) forniscono indicazioni sulle analisi statistiche appropriate e sui riferimenti fondamentali a metodi statistici riconosciuti a livello internazionale.

10. Nella realizzazione di uno studio di cancerogenesi è opportuno seguire sempre i principi guida e le considerazioni specificati nel documento di orientamento dell'OCSE n. 19 — *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (21), in particolare nel paragrafo 62. Tale paragrafo precisa che negli studi che prevedono la somministrazione ripetuta di dosi, se un animale manifesta segnali clinici progressivi, che conducano a un ulteriore peggioramento delle sue condizioni, è necessario decidere con cognizione di causa se sottoporre l'animale ad eutanasia. In questa decisione va anche soppesato il valore delle informazioni che possono essere ottenute continuando a includere tale animale nello studio e il suo stato in generale. Se si decide di continuare a mantenere l'animale nello studio occorre aumentare la frequenza delle osservazioni, a seconda del caso. È anche possibile, senza pregiudicare il fine della prova, sospendere temporaneamente la somministrazione delle dosi se ciò allevia il dolore o riduce lo stress cui è sottoposto l'animale, oppure ancora ridurre le dosi.

11. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) e due pubblicazioni dell'International Life Sciences Institute (22) (23) forniscono ragguagli dettagliati in merito ai dibattiti sui principi nella scelta delle dosi per gli studi di tossicità cronica e cancerogenesi. La strategia di base per la scelta delle dosi dipende dall'obiettivo o dagli obiettivi fondamentali dello studio (paragrafo 6). Nel selezionare il livello adeguato delle dosi sarebbe opportuno trovare un equilibrio tra, da un lato, l'individuazione dei rischi e, dall'altro, la caratterizzazione e la rilevanza delle risposte alle basse dosi. Ciò assume particolare importanza nella situazione in cui si deve svolgere uno studio combinato di tossicità cronica e di cancerogenesi (capitolo B.33 del presente allegato) (paragrafo 12).

12. È opportuno valutare l'opportunità di svolgere uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi (capitolo B.33 del presente allegato) piuttosto che eseguire in separata sede uno studio di tossicità cronica (il capitolo B.30 del presente allegato) e uno studio di cancerogenesi (il presente metodo di prova B.32). La prova combinata è più efficiente sotto il profilo della gestione dei tempi e dei costi rispetto alla conduzione di due studi distinti, pur senza compromettere la qualità dei dati nella fase che verifica la cronicità e nella fase che verifica la cancerogenesi. Nello svolgimento di uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenicità (capitolo B.33 del presente alleato) occorre tuttavia tenere opportunamente in considerazione i principi della selezione delle dosi (paragrafi 11 e 22-25). È inoltre riconosciuto che determinati quadri normativi richiedono la conduzione di studi ben distinti.

▼M4

13. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono specificate alla fine del capitolo e nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7).

PRINCIPIO DELLA PROVA

14. La sostanza chimica in esame è somministrata giornalmente in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento per la maggior parte della loro vita, di norma per via orale. Può essere opportuna anche la somministrazione per inalazione o per via cutanea. Gli animali sono sottoposti ad attenta osservazione per accertare eventuali sintomi di tossicità e lo sviluppo di lesioni neoplastiche. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necroscopia. Al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

15. Il presente metodo di prova è dedicato innanzitutto alla valutazione e all'esame della cancerogenesi nei roditori (paragrafo 2). L'uso di specie di non roditori può essere considerato se i dati disponibili indicano che ciò sia più appropriato per prevedere gli effetti sulla salute umana. La scelta della specie deve essere motivata. La specie di elezione tra i roditori è il ratto, sebbene si possano utilizzare anche altre specie di roditori, come il topo. Nonostante l'uso di topi possa avere un'utilità limitata nelle prove di cancerogenesi (24), (25) (26), nel quadro di alcuni programmi di natura normativa le prove di cancerogenesi sui tipi sono tuttora previste, salvo nei casi in cui è stato appurato che una tale prova non è necessaria dal punto di vista scientifico. I ratti e i topi costituiscono i modelli sperimentali preferibili in ragione della loro aspettativa di vita relativamente breve, del loro uso diffuso in studi farmacologici e tossicologici, della loro sensibilità all'induzione di tumori e della disponibilità di ceppi sufficientemente caratterizzati. Viste queste caratteristiche, è disponibile una grande quantità di informazioni di carattere fisiologico e patologico. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta delle specie e del ceppo.

16. Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Lo studio di cancerogenesi andrebbe preferibilmente condotto su animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza rispetto a quelli utilizzati per studi preliminari di tossicità di durata inferiore. Ciononostante, se è appurato che animali dello stesso ceppo e della medesima provenienza presentano problemi nel soddisfare i criteri di sopravvivenza normalmente riconosciuti per studi a lungo termine [cfr. il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7)] si dovrebbe considerare l'utilizzo di un ceppo di animali che evidenzia un tasso di sopravvivenza accettabile per uno studio a lungo termine. Le femmine devono essere nullipare e non gravide.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. La sistemazione individuale va considerata soltanto se scientificamente giustificata (27) (28) (29). Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 C (± 3 C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua di abbeveraggio. La dieta deve corrispondere a tutti i requisiti nutrizionali delle specie in esame e il tenore di contaminanti dietetici, tra cui anche i residui di pesticidi, inquinanti

▼M4

organici persistenti, fitoestrogeni, metalli pesanti e micotossine, che potrebbero influenzare l'esito della prova, deve essere il più basso possibile. Le informazioni analitiche sui livelli di nutrienti e di contaminanti dietetici devono essere prodotte periodicamente, quantomeno all'inizio dello studio e in caso di cambio del lotto impiegato, e vanno riportate nella relazione finale. Analogamente, devono essere fornite anche informazioni analitiche sull'acqua di abbeveraggio usata nello studio. La scelta della dieta può essere condizionata dalla necessità di garantire una combinazione adeguata tra una data sostanza chimica in esame e l'esigenza di rispettare i requisiti nutrizionali degli animali nel momento in cui la sostanza chimica è somministrata con il cibo.

Preparazione degli animali

18. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 7 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Nel caso dei roditori, la somministrazione delle dosi agli animali deve iniziare il più presto possibile in seguito allo svezzamento e all'acclimatazione e preferibilmente prima che gli animali raggiungano le 8 settimane di età. Gli animali del test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali di ciascun sesso utilizzati deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio di tutti gli animali interessati dallo studio, operando un distinguo a seconda del sesso. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. In seguito all'assegnazione randomizzata, non dovrebbero esserci più differenze significative nel peso medio corporeo tra gruppi dello stesso sesso. Se sono presenti differenze statisticamente rilevanti, la fase di randomizzazione va ripetuta, nei limiti del possibile. Ad ogni animale va assegnato un numero di identificazione univoco, che sarà riportato sull'animale in maniera indelebile tramite tatuaggio, impianto di un microchip o un altro metodo analogo.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

19. È opportuno usare animali di entrambi i sessi. È opportuno utilizzare un numero sufficiente di animali, in modo tale da poter valutare in maniera approfondita l'evoluzione dei dati dal punto di vista biologico e statistico. Ogni gruppo-dose e gruppo di controllo parallelo devono pertanto essere composti da almeno 50 animali per sesso. A seconda della finalità dello studio, si può aumentare la potenza statistica delle stime principali ripartendo gli animali in maniera disomogenea tra i vari gruppi-dose, assegnando oltre 50 animali ai gruppi a bassa dose, ad esempio per stimare il potenziale cancerogeno a basse dosi. Tuttavia va riconosciuto che un aumento moderato della dimensione dei gruppi comporterà un aumento relativamente esiguo della potenza statistica dello studio. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito al disegno statistico dello studio e alla scelta dei livelli di dose per sfruttare al massimo la potenza statistica.

Disposizioni relative sacrifici intermedi e ai gruppi satellite (sentinella)

20. Lo studio può prevedere disposizioni relative ai sacrifici intermedi, ad esempio dopo 12 mesi, al fine di reperire informazioni sull'evoluzione di alterazioni neoplastiche e dati meccanicistici, se scientificamente giustificato. Se tali informazioni sono già disponibili sulla base di studi sulla tossicità a dose ripetuta sulla sostanza chimica in esame, tali sacrifici intermedi possono non essere scientificamente giustificati. Se il disegno sperimentale prevede dei sacrifici intermedi, il numero di animali in ciascun gruppo-dose previsto a tale scopo sarà, di norma, pari a 10 animali per sesso e il numero complessivo di animali previsti dal disegno sperimentale dovrà aumentare del numero di animali che saranno sacrificati prima della conclusione dello studio. Al fine di monitorare lo stato della patologia, se necessario durante lo studio è possibile aggiungere un altro gruppo di animali sentinella (solitamente 5 esemplari per sesso) (30). Ulteriori elementi sono forniti nel documento di orientamento OCSE n. 116 (7).

▼M4

Gruppi-dose e dosaggi

21. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce indicazioni in merito a tutti gli aspetti legati alla scelta delle dosi e all'intervallo tra i livelli di dose. Si somministrano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo parallelo. I livelli di dose sono generalmente basati sui risultati di precedenti studi di durata inferiore con dosi ripetute o di determinazione degli intervalli di dose e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi alla sostanza chimica in esame o a sostanze chimiche analoghe.

22. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza chimica in esame non impongano limiti in tal senso, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di individuare gli organi bersaglio e gli effetti tossici senza provocare sofferenza, tossicità grave, morbilità o morte. In considerazione dei fattori di cui al paragrafo 23 sottostante, il livello di dose più elevato di norma è scelto per rendere manifesta la tossicità, ad esempio con un calo dell'aumento del peso (circa del 10 %). Tuttavia, a seconda degli obiettivi dello studio (cfr. paragrafo 6), si può optare per una dose massima inferiore alla dose che renda manifesta la tossicità, ad esempio se una dose provoca un effetto indesiderato preoccupante che però ha un impatto lieve sull'aspettativa di vita o sul peso corporeo.

23. I livelli di dose e l'intervallo tra i livelli di dose possono essere scelti per stabilire un rapporto dose-risposta e, a seconda delle modalità di azione della sostanza chimica in esame, un NOAEL o altri risultati attesi dello studio, ad esempio una dose di riferimento (BMD, *benchmark dose*, cfr. paragrafo 25) al livello di dose più basso. Tra i fattori da tenere in considerazione nella scelta delle dosi più basse rientrano anche la curva attesa del rapporto dose-risposta, le dosi alle quali possono subentrare dei cambiamenti nel metabolismo o nella modalità di azione tossica, il livello a cui si prevede una soglia o il livello che si prevede possa costituire un punto di partenza per un'estrapolazione a basse dosi.

24. L'intervallo tra i livelli di dose scelto dipenderà dalle caratteristiche della sostanza chimica di prova e non può essere imposto dal presente metodo di prova, ma di frequente fattori tra due e quattro forniscono buoni risultati delle prove per determinare dosi a livelli discendenti, mentre spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto distanziati (ad esempio oltre un fattore di circa 6-10) tra le dosi. In linea generale va evitato l'uso di fattori superiori a 10 e se vi si ricorre è opportuno giustificare tale scelta.

25. Come precisato ulteriormente nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7), nella scelta della dose vanno tenuti in considerazione, tra l'altro, i seguenti aspetti:

— non linearità o punti di flesso presunti o riscontrati nella curva dose-risposta,

— aspetti tossicocinetici e range di dosi a cui subentra o meno induzione metabolica, saturazione o non linearità tra dosi esterne e interne,

— lesioni precursive, indicatori degli effetti o indicatori di processi biologici fondamentali sottostanti in corso,

— aspetti principali (o presunti) delle modalità di azione, ad esempio dosi alle quali inizia a subentrare citotossicità, i livelli ormonali sono perturbati, i meccanismi di omeostasi sono superati ecc.,

▼M4

— regioni della curva dose-risposta per cui è necessaria una stima particolarmente precisa, ad esempio nell'ambito della dose di riferimento prevista o di una soglia ipotizzata,

— considerazione dei livelli previsti di esposizione umana.

26. Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza chimica in esame. Salvo il trattamento con la sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato dei gruppi-dose. Se una sostanza chimica è somministrata con la dieta e comporta una riduzione dell'assunzione di cibo significativa a causa di una minore palatabilità, può essere utile aggiungere un ulteriore gruppo di controllo alimentato allo stesso modo che si presterà di più a tale scopo.

Preparazione delle dosi e somministrazione della sostanza chimica in esame

27. La sostanza chimica in esame di norma viene somministrata con il cibo, l'acqua di abbeveraggio o per via intragastrica. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alle vie e ai metodi di somministrazione. La via di somministrazione dipende dall'obiettivo dello studio, dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza chimica in esame, dalla sua biodisponibilità e dalla via e dal metodo predominanti di esposizione degli esseri umani. È necessario giustificare la scelta della via e del metodo di somministrazione. Nell'interesse della salute animale, la somministrazione mediante sonda orale di norma è scelta solo per le sostanze per cui questa via e questo metodo di somministrazione corrispondono ragionevolmente a una potenziale esposizione umana (ad esempio farmaci). Per le sostanze chimiche ingerite con gli alimenti o presenti nell'ambiente, inclusi i pesticidi, la somministrazione avviene solitamente con il cibo o l'acqua di abbeveraggio. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio nel caso dell'esposizione professionale, può essere opportuna la somministrazione per altre vie.

28. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. È opportuno tenere conto, a seconda del caso, delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sulla consumazione di cibo o acqua sullo stato nutrizionale degli animali. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Devono essere disponibili informazioni in merito alla stabilità della sostanza chimica in esame e all'omogeneità delle soluzioni o razioni di dosaggio (a seconda del caso) nelle condizioni di somministrazione (ad esempio dieta).

29. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. In studi a lungo termine che ricorrono alla somministrazione con la dieta, la concentrazione nel cibo della sostanza chimica in esame di norma non può superare la soglia massima del 5 % della dieta totale, al fine di evitare degli squilibri alimentari. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può ricorrere sia a una concentrazione alimentare costante (mg/kg di cibo o ppm), sia a dosi di livello costante in funzione del peso dell'animale (mg/kg di peso corporeo), con calcolo su base settimanale. La scelta di eventuali alternative va specificata.

▼M4

30. In caso di somministrazione per via orale, agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame (sette giorni la settimana), di norma per un periodo di 24 mesi (cfr. anche paragrafo 32) per i roditori. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio, ad esempio cinque giorni la settimana. In caso di somministrazione per via epidermica, di norma gli animali sono trattati con la sostanza chimica in esame per almeno 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, così come specificato nel capitolo B.9 del presente allegato (11), per un periodo di 24 mesi. L'esposizione per via inalatoria si protrae per 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, ma, se giustificata, può essere scelta un'esposizione di 5 giorni la settimana. La durata del periodo di somministrazione di norma è di 24 mesi. Se delle specie di roditori diverse dai ratti sono sottoposte a esposizione «a naso solo», è possibile adeguare la durata massima di esposizione per ridurre al minimo il loro stress. La scelta di una durata di esposizione inferiore a 6 ore al giorno deve essere debitamente motivata. Cfr. anche il capitolo B.8 del presente allegato (9).

31. Se la somministrazione della sostanza chimica in esame avviene per via intragastrica, deve avvenire per mezzo di una sonda o una cannula per intubazione ogni giorno all'incirca allo stesso orario. Di norma viene somministrata una dose singola una volta al giorno, ma laddove, ad esempio, la sostanza chimica in esame fosse un irritante locale, è possibile mantenere la dose giornaliera ripartendola su due momenti diversi (due volte al giorno). Il massimo volume di liquido che può essere somministrato in un'unica soluzione dipende dalle dimensioni dell'animale. Il volume deve essere limitato il più possibile e per i roditori non può superare, di norma, 1 ml/100 g di peso corporeo (31). La variabilità dei volumi somministrati va ridotta al minimo regolando le concentrazioni in modo da assicurare un volume costante in tutti i livelli di dose. Sostanze chimiche potenzialmente corrosive o irritanti sono considerate un'eccezione e devono essere diluite per evitare effetti locali gravi. Va evitato lo svolgimento di prove con concentrazioni che rischiano di essere corrosive o irritanti per il tratto gastrointestinale.

Durata dello studio

32. Per i roditori la durata della prova di norma è di 24 mesi, il che corrisponde alla maggior parte della vita normale degli animali sperimentali. La durata degli studi può essere più lunga o più breve a seconda della durata di vita del ceppo delle specie animali previste per lo studio, ma deve essere giustificata. Per determinati ceppi di topi, ad esempio AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, può essere più appropriata una durata di 18 mesi. Qui di seguito saranno forniti alcuni orientamenti relativi alla durata e alla conclusione dello studio e alla sopravvivenza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 — *Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7) fornisce ulteriori orientamenti in materia, tra cui le considerazioni sull'accettabilità di ritenere negativo uno studio di cancerogenesi in relazione alla sopravvivenza degli animali.

— Va vagliata la possibilità di concludere lo studio quando la quantità di animali sopravvissuti nei gruppi a dose più bassa o del gruppo di controllo è più bassa del 25 %

— Lo studio non va concluso in caso di morti premature dovute alla tossicità limitate al gruppo ad alta dose

— Nella valutazione della sopravvivenza si deve distinguere a seconda del sesso degli animali

— Lo studio non si deve prolungare oltre il momento in cui i dati resi disponibili in questo contesto non sono più sufficienti per giungere a una valutazione valida dal punto di vista statistico.

▼M4

OSSERVAZIONI

33. Tutti gli animali vanno osservati per identificare segni di morbilità e mortalità, in genere all'inizio e alla fine della giornata, weekend e giorni festivi inclusi. Inoltre gli animali devono essere sottoposti a un controllo quotidiano dei segni di rilevanza tossicologica, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione nel caso in cui questa avvenga per via intragastrica. Si dedicherà speciale attenzione all'insorgenza dei tumori: si registrerà la data di inizio, la posizione, le dimensioni, l'aspetto e la progressione di ogni tumore macroscopicamente visibile o palpabile.

Peso corporeo, consumo di cibo/acqua ed efficienza alimentare

34. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio del trattamento, almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Le misurazioni del consumo di cibo e dell'efficienza alimentare devono essere effettuati almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con l'acqua di abbeveraggio, il consumo di acqua deve essere misurato almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. È utile tener conto della misurazione del consumo di acqua anche negli studi in cui quest'ultimo è alterato.

Ematologia, biochimica clinica e altre misurazioni

35. Al fine di sfruttare al massimo le informazioni ottenute dallo studio, soprattutto per quando riguarda le considerazioni legate alle modalità di azione, a discrezione del responsabile scientifico dello studio è possibile effettuare dei prelievi di sangue ai fini di analisi ematologiche e di biochimica clinica. Potrebbe essere utile anche effettuare l'esame delle urine. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori indicazioni sul valore di tali campionamenti nel quadro di uno studio di cancerogenesi. Se lo si ritiene opportuno, si può effettuare un campionamento del sangue per determinazioni ematologiche e di chimica clinica nonché per l'esame delle urine nel quadro di un sacrificio intermedio (paragrafo 20) e al termine dello studio, effettuandolo su un minimo di 10 animali per sesso e per gruppo. Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico, ad esempio con punture cardiache o dal seno retro-orbitale, sotto anestesia. Tali campioni vanno conservati, se del caso, in condizioni idonee. Per l'esame possono essere preparati anche degli strisci di sangue, in particolare se il midollo osseo sembra rientrare tra gli organi bersaglio, sebbene il valore di tale esame ai fini della valutazione del potenziale cancerogeno/oncogeno non sia indiscusso (32).

PATOLOGIA

Necroscopia macroscopica

36. Tutti gli animali dello studio, ad eccezione degli animali sentinella (cfr. paragrafo 20) e altri animali satellite dovranno essere sottoposti ad una necroscopia dettagliata completa, che comprende un accurato esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi, della cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Per gli animali sentinella e altri animali satellite, valutando caso per caso può essere necessaria un'autopsia, a discrezione del responsabile scientifico dello studio. Il peso degli organi di norma non rientra nello studio di cancerogenesi, poiché i cambiamenti geriatrici prima, e in fasi successive lo sviluppo di tumori hanno un effetto distorsivo sull'utilità dei relativi dati. Il peso degli organi potrebbe essere tuttavia importante ai fini della valutazione della forza probante dei dati e in particolare per considerazioni sulle modalità di azione. Se tali dati sono rilevati nel quadro di uno studio satellite, vanno raccolti a distanza di non oltre un anno dall'inizio dello studio.

▼M4

37. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per il previsto esame istopatologico successivo (33) (i tessuti tra parentesi quadre sono facoltativi).

tutte le lesioni macroscopiche	cuore	pancreas	stomaco (prestomaco, stomaco ghiandolare
ghiandole surrenali	ileo	ghiandola paratiroidea	[denti]
aorta	digiuno	nervo periferico	testicoli
cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	reni	pituitaria	timo
intestino cieco	ghiandola lacrimale (esorbitale)	prostata	tiroide
cervice	fegato	retto	[lingua]
ghiandola della coagulazione	polmone	ghiandola salivare	trachea
colon	Linfonodi (superficiali e profondi)	vescicola seminale	vescica
duodeno	ghiandola mammaria (obbligatoria per esemplari di sesso femminile e, se visibile ai fini della la dissezione, anche per quelli di sesso maschile)	muscolo scheletrico	utero (cervice inclusa)
epididimo	[tratto respiratorio superiore, incluso il naso, i turbinati e i seni paranasali]	pelle	[uretere]
occhi (retina inclusa)	esofago	midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare)	[uretra]
[femore con articolazione]	[bulbo olfattivo]	milza	vagina
cistifellea (eccetto per i topi)	ovaia	[sterno]	sezione di midollo osseo e/o un aspirato di midollo osseo fresco
ghiandola di Harder			

In caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno conservati entrambi gli organi. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame. Negli studi che prevedono una somministrazione per via epidermica, vanno preservati gli organi di cui all'elenco riferito alla via orale. In particolare, sono essenziali il campionamento e la conservazione della pelle della zona di applicazione della sostanza. In studi che prevedono la via inalatoria come metodo di somministrazione, l'elenco dei tessuti da conservare ed esaminare in relazione al tratto respiratori deve corrispondere alle raccomandazioni contenute nei capitoli B.8 e B.29 del presente allegato. Per altri organi/tessuti (oltre ai tessuti conservati specificamente del tratto respiratorio) va esaminato l'elenco degli organi relativo alla via orale.

▼M4

Esame istopatologico

38. Sono disponibili orientamenti sulle buone pratiche nella conduzione di studi di patologia tossicologica (33). Come minimo, vanno esaminati i seguenti tessuti:

— tutti i tessuti dei gruppi ad alta dose e di controllo,

— tutti i tessuti degli animali che sono morti o sono stati sacrificati nel corso dello studio,

— tutti i tessuti che evidenziano anomalie macroscopiche, tumori compresi,

— se si osservano dei cambiamenti istopatologici in relazione al trattamento nel gruppo ad alta dose, tali tessuti vanno esaminati in ogni animale di tutti gli altri gruppi-dose,

— in caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno esaminati entrambi gli organi.

DATI E RELAZIONE

Dati

39. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante la prova o sottoposti ad eutanasia e il momento di tutti i decessi/eutanasie, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione. Tabelle riassuntive dei dati devono fornire le medie e le deviazioni standard (per dati raccolti in via continuativa) relative agli animali che evidenziano effetti tossici o lesioni, oltre all'indicazione dell'entità delle lesioni.

40. I dati storici di controllo possono essere utili per interpretare i risultati dello studio, ad esempio quando i dati forniti da gruppi di controllo paralleli sembrano divergere significativamente da dati recenti relativi ad animali di controllo dello stesso centro di prova/della stessa colonia. Se valutati, i dati storici di controllo vanno trasmessi dallo stesso laboratorio e devono riferirsi ad animali della medesima età e dello stesso ceppo, nonché essere generati nei cinque anni che precedono lo studio in questione.

41. I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale. Questa scelta deve rendere possibili degli aggiustamenti in funzione del grado di sopravvivenza, se necessario.

Relazione sulla prova

42. La relazione sulla prova deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

▼M4

— origine della sostanza chimica,

— numero del lotto,

— certificazione dell'analisi chimica.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

— specie/ceppo utilizzato e giustificazione della scelta effettuata,

— numero, età e sesso degli animali all'inizio della prova,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio della prova.

Condizioni sperimentali:

— criteri di scelta della via di somministrazione e della dose,

— laddove opportuno, metodi statistici usati per analizzare i dati,

— dettagli sulla formulazione della sostanza chimica in esame/la preparazione della dieta,

— dati di analisi sulla concentrazione, la stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— via di somministrazione e relativi dettagli della sostanza chimica in esame,

— per gli studi che prevedono la somministrazione per via inalatoria, scelta tra esposizione «a naso solo» o «a corpo intero»,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/giorno) e, se del caso, fattore di conversione tra la concentrazione della sostanza chimica in esame nella dieta/acqua di abbeveraggio (mg/kg o ppm) e la dose effettiva,

— dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati (vanno indicati dati da presentare sotto forma di tabelle e dati individuali sugli animali)

Dati generali:

— dati sulla sopravvivenza degli animali,

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo, calcoli sull'efficienza alimentare, se effettuati, nonché consumo di acqua, se del caso,

— dati tossicocinetici (se disponibili),

— dati oftalmoscopici (se disponibili),

— esami ematologici (se disponibili),

— esami di chimica clinica (se disponibili).

▼M4

Risultati clinici:

— segni di tossicità,

— incidenza (e, se classificata, la gravità) di eventuali anomalie,

— natura, gravità e durata dei segni clinici (transitori o permanenti).

Dati necroscopici:

— peso corporeo finale,

— peso degli organi (anche in relazione al peso corporeo, se del caso),

— reperti necroscopici; incidenza e gravità delle anomalie.

Esame istopatologico.

— reperti istopatologici non neoplastici,

— reperti istopatologici neoplastici,

— correlazione tra reperti macroscopici e microscopici,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici relativi al trattamento, inclusi i livelli di gravità,

— relazioni su eventuali esami inter pares dei vetrini.

Elaborazione statistica dei risultati, se del caso

Discussione dei risultati, compreso:

— discussione su tutti gli approcci di modellizzazione,

— rapporti dose-risposta,

— dati storici di controllo,

— esame di tutte le informazioni sulle modalità di azione,

— determinazione BMD, NOAEL o LOAEL,

— rilevanza per gli esseri umani.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Capitolo B.27 del presente allegato, Test di tossicità orale subcronica Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori.

(7) OCSE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolo B.8 del presente allegato, Tossicità subacuta a dose ripetuta (28 giorni) per inalazione.

(10) Capitolo B.29 del presente allegato, Studio di tossicità subcronica a dose ripetuta (90 giorni) per inalazione.

(11) Capitolo B.9 del presente allegato, Tossicità a dose ripetuta (28 giorni) per via cutanea.

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OCSE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OCSE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Direttiva 2010/63/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).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼M4

B.33. **STUDI COMBINATI DI TOSSICITÀ CRONICA/CANCEROGENESI**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 453 (2009) La prima linea guida 453 è stata adottata nel 1981. Si è ritenuto necessario sviluppare questa versione aggiornata del metodo di prova B.33 alla luce dei recenti progressi nell'ambito del benessere animale e degli obblighi normativi (1) (2) (3) (4) (5). L'aggiornamento del presente metodo di prova B.33 si è svolto in parallelo alle revisioni del capitolo B.32 del presente allegato, studi di cancerogenesi, e del capitolo B.30 del presente allegato, studi di tossicità cronica, con l'obiettivo di integrare le informazioni in relazione agli animali usati nello studio e di fornire maggiori dettagli sulla scelta delle dosi. Il presente metodo di prova è concepito per testare un'ampia serie di sostanze chimiche, tra cui pesticidi e sostanze chimiche industriali. Va tuttavia specificato che alcuni dettagli e requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici (cfr. Conferenza internazionale sull'armonizzazione, *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).

2. La maggior parte degli studi di tossicità cronica e cancerogenesi è svolta su specie di roditori, pertanto il presente metodo di prova è destinato ad applicarsi in primo luogo agli studi che hanno ad oggetto queste specie. Se dovesse risultare necessario condurre tali studi sui non roditori, possono trovare applicazione, con le opportune modifiche, anche i principi e le procedure esposti nel presente metodo di prova, congiuntamente a quelli specificati al capitolo B.27 del presente allegato (studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori) (6), come indicato nel documento di orientamento dell'OCSE — *Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).

3. Le tre vie principali di somministrazione usate in relazione alla tossicità cronica/cancerogenesi sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione è fatta in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza in esame e della più probabile via di esposizione degli esseri umani. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta della via di esposizione.

4. Questo metodo di prova è incentrato sull'esposizione per via orale, ossia la via più usata negli studi di tossicità cronica e di cancerogenesi. Gli studi a lungo termine che prevedono un'esposizione per via cutanea o per inalazione possono essere necessari anche per la valutazione del rischio per la salute umana e/o possono essere richiesti da determinati regimi normativi, ma entrambe le vie di esposizione evidenziano una complessità considerevole sul piano tecnico. Questo tipo di studi dovrà essere concepito caso per caso, ma il metodo di prova qui esposto per la valutazione e l'esame della tossicità cronica e della cancerogenesi con somministrazione orale potrebbe costituire la base di un protocollo per studi per inalazione e/o cutanei, per quanto riguarda le raccomandazioni per i periodi di trattamenti, i parametri clinici e patologici ecc. L'OCSE ha pubblicato documenti di orientamento sulla somministrazione delle sostanze chimiche in esame per via cutanea (7) e per inalazione (7) (8). Il capitolo B.8 del presente allegato (9) e il capitolo B.29 del presente allegato (10), insieme al documento di orientamento dell'OCSE — *Acute inhalation testing* (8) vanno consultati in particolare nell'impostazione di studi a lungo termine che prevedono l'esposizione per inalazione. Il capitolo B.9 del presente allegato (11) va consultato nel caso di prove svolte per via cutanea.

▼M4

5. Lo studio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta nell'arco di un periodo che può estendersi fino all'intero ciclo di vita delle specie usate. Con questo studio sarà possibile ottenere informazioni sugli effetti tossici della sostanza chimica in esame, tra cui la potenziale cancerogenesi, e dare indicazioni su organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo. Esso può inoltre fornire indicazioni sul cosiddetto *no-observed-adverse-effect level* (livello fino al quale non si osservano effetti dannosi) per gli effetti tossici e, nel caso di cancerogeni non genotossici, per le risposte tumorali, consentendo la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione umana. Si sottolinea inoltre la necessità di sottoporre gli animali ad attente osservazioni cliniche, allo scopo di ottenere il maggior numero possibile di informazioni.

6. Tra gli obiettivi degli studi di tossicità cronica/cancerogenesi condotti con questo metodo di prova figurano:

— l'individuazione delle proprietà cancerogene di una sostanza chimica in esame, che risultano in una maggiore incidenza di neoplasmi, una più grande proporzione di neoplasmi maligni o una riduzione nei tempi di latenza di neoplasmi, il tutto in confronto a gruppi di controllo,

— l'individuazione dei tempi di latenza di neoplasmi,

— l'individuazione della tossicità cronica della sostanza chimica in esame,

— l'individuazione di uno o più organi bersaglio di tossicità cronica e cancerogenesi,

— la caratterizzazione del rapporto dose-risposta,

— l'individuazione di un *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL), ossia il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi o di un punto di partenza per la determinazione di una dose di riferimento (BMD),

— l'estrapolazione di effetti cancerogeni relativi a un'esposizione umana a basse dosi,

— la previsione degli effetti di tossicità cronica ai livelli di esposizione umana,

— la produzione di dati per verificare le ipotesi relative alle modalità di azione (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. Nella valutazione e nell'esame della potenziale cancerogenesi e tossicità cronica di una sostanza chimica in esame, prima di condurre lo studio, i laboratori che eseguono la prova devono considerare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame al fine di orientare il disegno sperimentale nella maniera più efficiente per valutare il potenziale di tossicità cronica limitando al minimo necessario l'uso di animali. Le informazioni e considerazioni relative alle modalità di azione di una presunta sostanza cancerogena (2) (7) (12) (13) (14) (15) sono particolarmente importanti, poiché il disegno ottimale potrebbe variare a seconda del fatto che una sostanza chimica sia una sostanza cancerogena genotossica nota o presunta. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori indicazioni, tra cui considerazioni in merito alle modalità di azione.

8. Tre le informazioni utili per il disegno sperimentale saranno considerate l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, le informazioni sulle modalità di azione, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, incluse delle prove di genotossicità; l'impiego o gli impieghi previsti per l'esposizione umana, dati (Q)SAR, di mutagenesi/genotossicità, cancerogenesi e altri dati tossicologici disponibili in merito a sostanze chimiche di struttura affine; i dati

▼M4

tossicocinetici disponibili (dose unica e dose ripetuta, laddove disponibile) e i risultati di altri studi a dose ripetuta. La determinazione della tossicità cronica/cancerogenesi si effettua solamente una volta ottenuti i primi risultati delle prove di tossicità a dose ripetuta su 28 giorni e/o 90 giorni. Anche prove di iniziazione-promozione di tumori a breve termine possono fornire informazioni utili. È opportuno prendere in considerazione un approccio a tappe nello svolgimento delle prove di cancerogenesi svolte nel quadro della valutazione generale degli effetti potenzialmente nocivi di una particolare sostanza chimica in esame (16) (17) (18) (19).

9. I metodi statistici più adeguati per l'analisi dei risultati, tenuto conto del disegno sperimentale e degli obiettivi, sono stabiliti prima dell'inizio dello studio. Occorre inoltre determinare se le statistiche debbano o meno tenere conto dell'aggiustamento in funzione della sopravvivenza, dell'analisi dei rischi cumulati di tumore legati al tempo di sopravvivenza, dell'analisi dei tempi di latenza del tumore e dell'analisi effettuata in caso di morte prematura degli animali di uno o più gruppi. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) e il documento di orientamento dell'OCSE n. 35 — *Analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (20) forniscono indicazioni sulle analisi statistiche appropriate e sui riferimenti fondamentali a metodi statistici riconosciuti a livello internazionale.

10. Nella realizzazione di uno studio di cancerogenesi è opportuno seguire sempre i principi guida e le considerazioni specificati nel documento di orientamento dell'OCSE n. 19 — *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (21), in particolare nel paragrafo 62. Tale paragrafo precisa che negli studi che prevedono la somministrazione ripetuta di dosi, se un animale manifesta segnali clinici progressivi, che conducano a un ulteriore peggioramento delle sue condizioni, è necessario decidere con cognizione di causa se sottoporre l'animale ad eutanasia. In questa decisione va anche soppesato il valore delle informazioni che possono essere ottenute continuando a includere tale animale nello studio e il suo stato in generale. Se si decide di continuare a mantenere l'animale nello studio occorre aumentare la frequenza delle osservazioni, a seconda del caso. È anche possibile, senza pregiudicare il fine della prova, sospendere temporaneamente la somministrazione delle dosi se ciò allevia il dolore o riduce lo stress cui è sottoposto l'animale, oppure ancora ridurre le dosi.

11. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) e due pubblicazioni dell'International Life Sciences Institute (22) (23) forniscono ragguagli dettagliati in merito ai dibattiti sulla selezione delle dosi per gli studi di tossicità cronica e cancerogenesi. La strategia di base per la scelta delle dosi dipende dal o dagli obiettivi fondamentali dello studio (paragrafo 6). Nel selezionare il livello adeguato delle dosi sarebbe opportuno trovare un equilibrio tra, da un lato, l'individuazione dei rischi e, dall'altro, la caratterizzazione e la rilevanza delle risposte alle basse dosi. Ciò assume particolare rilevanza nel caso del presente studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi.

12. È opportuno valutare l'opportunità di svolgere il presente studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi piuttosto che eseguire in separata sede uno studio di tossicità cronica (capitolo B.30 del presente allegato) e uno studio di cancerogenesi (capitolo B.32 del presente allegato). La prova combinata è più efficiente sotto il profilo della gestione dei tempi e dei costi nonché di un numero minore di animali utilizzati rispetto alla conduzione di due studi distinti, pur senza compromettere la qualità dei dati nella fase che verifica la cronicità e nella fase che verifica la cancerogenesi. Nello svolgimento di uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi occorre tuttavia tenere opportunamente in considerazione i principi della selezione delle dosi (paragrafi 11 e 22-26). È inoltre riconosciuto che determinati quadri normativi richiedono la conduzione di studi ben distinti. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori orientamenti sul disegno dello studio combinato di tossicità cronica e cancerogenesi al fine di ottenere la massima efficacia negli studi in termini di possibilità di riduzione dell'uso di animali e di armonizzazione delle varie procedure sperimentali.

▼M4

13. Le definizioni usate nel contesto del presente metodo di prova sono specificate alla fine del presente capitolo e nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7).

PRINCIPIO DELLA PROVA

14. Il disegno sperimentale prevede due fasi parallele, una relativa alla cronicità, l'altra relativa alla cancerogenesi (per la durata delle fasi si rimanda rispettivamente ai paragrafi 34 e 35). La sostanza chimica in esame di norma è somministrata per via orale, ma può essere opportuno anche ricorrere alla via inalatoria o cutanea. Per la fase relativa alla cronicità, la sostanza chimica in esame è somministrata giornalmente in dosi graduali a diversi gruppi di animali, con un livello di dose per gruppo, di norma per un periodo di 12 mesi, ma a seconda degli obblighi normativi possono essere scelti anche periodi più lunghi o più corti (cfr. paragrafo 34). La durata scelta deve essere sufficientemente lunga da garantire la manifestazione degli effetti della tossicità cumulata senza che insorgano gli effetti distorsivi dei cambiamenti geriatrici. Il disegno sperimentale può anche prevedere uno o più sacrifici intermedi, ad esempio dopo 3 e 6 mesi, e a tale fine possono essere introdotti nello studio ulteriori animali (cfr. paragrafo 20). Per la fase relativa alla cancerogenesi, la sostanza chimica in esame è somministrata giornalmente a vari gruppi di animali per la maggior parte della loro vita. In entrambe le fasi gli animali sono sottoposti ad attenta osservazione per accertare eventuali sintomi di tossicità e lo sviluppo di lesioni neoplastiche. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necroscopia. Al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

15. Il presente metodo di prova è dedicato innanzitutto alla valutazione e all'esame della tossicità cronica e della cancerogenesi nei roditori (paragrafo 2). L'uso di specie di non roditori può essere considerato se i dati disponibili indicano che ciò sia più appropriato per prevedere gli effetti sulla salute umana. La scelta del veicolo deve essere motivata. La specie di elezione è il ratto, sebbene si possano utilizzare anche altre specie di roditori, come il topo. Nonostante l'uso di topi possa avere un'utilità limitata nelle prove di cancerogenesi (24), (25) (26), nel quadro di alcuni programmi di natura normativa le prove di cancerogenesi sui tipi sono tuttora previste, salvo nei casi in cui è stato appurato che una tale prova non è necessaria dal punto di vista scientifico. I ratti e i topi costituiscono i modelli sperimentali preferibili in ragione della loro aspettativa di vita relativamente breve, del loro uso diffuso in studi farmacologici e tossicologici, della loro sensibilità all'induzione di tumori e della disponibilità di ceppi sufficientemente caratterizzati. Viste queste caratteristiche, è disponibile una grande quantità di informazioni di carattere fisiologico e patologico. Il disegno e lo svolgimento di studi di tossicità cronica/cancerogenesi su specie di non roditori, se richieste, vanno basate sui principi indicati nel presente metodo di prova e in quelli specificati nel capitolo B.27 del presente allegato (Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori) (6). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alla scelta delle specie e del ceppo.

16. Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Lo studio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi andrebbe condotto su animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza rispetto a quelli utilizzati per studi preliminari di tossicità di durata inferiore. Ciononostante, se è appurato che animali dello stesso ceppo e della medesima provenienza presentano problemi nel soddisfare i criteri di sopravvivenza normalmente riconosciuti per studi a lungo termine [cfr. il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7)] si dovrebbe considerare l'utilizzo di un ceppo di animali che evidenzia un tasso di sopravvivenza accettabile per uno studio a lungo termine. Le femmine devono essere nullipare e non gravide.

▼M4

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. La sistemazione individuale va considerata soltanto se scientificamente giustificata (27) (28) (29). Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua di abbeveraggio. La dieta deve corrispondere a tutti i requisiti nutrizionali delle specie in esame e il tenore di contaminanti dietetici, tra cui anche i residui di pesticidi, inquinanti organici persistenti, fitoestrogeni, metalli pesanti e micotossine, che potrebbero influenzare l'esito della prova, deve essere il più basso possibile. Le informazioni analitiche sui livelli di nutrienti e di contaminanti dietetici devono essere prodotte periodicamente, quantomeno all'inizio dello studio e in caso di cambio del lotto impiegato, e vanno riportate nella relazione finale. Analogamente, devono essere fornite anche informazioni analitiche sull'acqua di abbeveraggio usata nello studio. La scelta della dieta può essere condizionata dalla necessità di garantire una combinazione adeguata tra una data sostanza chimica in esame e l'esigenza di rispettare i requisiti nutrizionali degli animali nel momento in cui la sostanza chimica è somministrata con il cibo.

Preparazione degli animali

18. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 7 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Nel caso dei roditori, la somministrazione delle dosi agli animali deve iniziare il più presto possibile in seguito allo svezzamento e all'acclimatazione e preferibilmente prima che gli animali raggiungano le 8 settimane di età. Gli animali del test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali di ciascun sesso utilizzati deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio di tutti gli animali interessati dallo studio, operando un distinguo a seconda del sesso. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. In seguito all'assegnazione randomizzata, non dovrebbero esserci più differenze significative nel peso medio corporeo tra gruppi dello stesso sesso. Se sono presenti differenze statisticamente rilevanti, la fase di randomizzazione va ripetuta, nei limiti del possibile. Ad ogni animale va assegnato un numero di identificazione univoco, che sarà riportato sull'animale in maniera indelebile tramite tatuaggio, impianto di un microchip o un altro metodo analogo.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

19. È opportuno usare animali di entrambi i sessi. È opportuno utilizzare un numero sufficiente di animali, in modo tale da poter valutare in maniera approfondita l'evoluzione dei dati dal punto di vista biologico e statistico. Per i roditori, ogni gruppo-dose (come illustrato al paragrafo 22) e ogni gruppo di controllo parallelo previsti per la fase dello studio relativa alla cancerogenesi devono pertanto essere composti da almeno 50 animali per sesso. A seconda della finalità dello studio, si può aumentare la potenza statistica delle stime principali ripartendo gli animali in maniera in maniera disomogenea tra i vari gruppi-dose, assegnando oltre 50 animali ai gruppi a bassa dose, ad esempio per valutare il potenziale cancerogeno a basse dosi. Tuttavia va riconosciuto che un aumento moderato della dimensione dei

▼M4

gruppi comporterà un aumento relativamente esiguo della potenza statistica dello studio. Per i roditori, ogni gruppo-dose (come illustrato al paragrafo 22) e ogni gruppo di controllo parallelo previsti per la fase dello studio relativa alla tossicità cronica devono essere composti da almeno 10 animali per sesso. Si fa presente che questo numero è inferiore a quello degli studi relativi alla tossicità cronica (capitolo B.30 del presente allegato). L'interpretazione dei dati rilevati con un numero ridotto di animali per gruppo nella fase relativa alla tossicità cronica di questo studio combinato sarà tuttavia avallata dai dati rilevati con un numero maggiore di animali nella fase dedicata alla cancerogenesi. Negli studi che prevedono la presenza di topi, nella fase relativa alla tossicità cronica potrebbero essere necessari ulteriori animali in ciascun gruppo-dose al fine di poter eseguire tutti gli esami ematologici del caso. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito al disegno statistico dello studio e alla scelta dei livelli di dose per sfruttare al massimo la potenza statistica.

Disposizioni relative ai sacrifici intermedi, a gruppi satellite e ad animali sentinella

20. Lo studio può prevedere disposizioni relative ai sacrifici intermedi, ad esempio dopo 6 mesi nella fase relativa alla tossicità cronica, al fine di reperire informazioni sull'evoluzione di alterazioni non neoplastiche e dati meccanicistici, se scientificamente giustificato. Se tali informazioni sono già disponibili sulla base di studi sulla tossicità a dose ripetuta sulla sostanza chimica in esame, tali sacrifici intermedi possono non essere scientificamente giustificati. Gli animali usati nella fase relativa alla tossicità cronica dello studio, di norma dalla durata di 12 mesi (paragrafo 34) forniscono dati sui sacrifici intermedi per la fase dello studio relativa alla cancerogenesi, riducendo pertanto il numero totale di animali usati nello studio. Nella fase relativa alla tossicità cronica dello studio, ai fini del monitoraggio della reversibilità dei cambiamenti tossicologici indotti dalla sostanza chimica in esame possono essere previsti anche gruppi satellite. Tali gruppi possono essere limitati al livello di dose più elevato dello studio e ai gruppi di controllo. Al fine di monitorare lo stato della patologia, se necessario durante lo studio è possibile aggiungere un altro gruppo di animali sentinella (solitamente 5 esemplari per sesso) (30). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori indicazioni sul disegno sperimentale al fine di includere i sacrifici intermedi, gli animali satellite e sentinella, riducendo al contempo il numero di animali usati complessivamente.

21. Se il disegno sperimentale prevede animali satellite e/o sacrifici intermedi, il numero di animali in ciascun gruppo-dose previsto a tale scopo sarà, di norma, pari a 10 animali per sesso e il numero complessivo di animali previsti dal disegno sperimentale dovrà aumentare del numero di animali che si prevede di sopprimere prima della conclusione dello studio. Gli animali oggetto di sacrifici intermedi e gli animali satellite di norma sono sottoposti alle medesime osservazioni, tra cui il controllo del peso corporeo, il consumo di cibo/acqua, analisi ematologiche e biochimico-cliniche ed esami patologici degli animali coinvolti nella fase di esame della tossicità cronica dello studio principale, sebbene sia possibile disporre anche che (per i gruppi che saranno sacrificati nel corso dello studio) le osservazioni siano limitate a parametri chiave specifici come la neurotossicità o l'immunotossicità.

Gruppi-dose e dosaggi

22. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce indicazioni in merito a tutti gli aspetti legati alla scelta delle dosi e all'intervallo tra i livelli di dose. Si somministrano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo parallelo, sia per la fase relativa alla cronicità, sia a quella relativa alla cancerogenesi. I livelli di dose sono generalmente basati sui risultati di precedenti studi di durata inferiore con dosi ripetute o di determinazione degli intervalli di dose e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi alla sostanza chimica in esame o a sostanze chimiche analoghe.

▼M4

23. Per la fase relativa dello studio relativa alla tossicità cronica, si può non considerare necessario eseguire uno studio completo utilizzando tre livelli di dose qualora si possa prevedere che una prova svolta con un livello di dose, equivalente ad almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, probabilmente non produrrà effetti avversi. Tale decisione si deve basare sui risultati di studi preliminari e su una probabile assenza di tossicità in base a dati relativi a sostanze chimiche di struttura affine. Si può applicare un limite di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno eccetto nei casi in cui l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

24. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza chimica in esame non impongano limiti in tal senso, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di individuare gli organi bersaglio e gli effetti tossici senza provocare sofferenza, tossicità grave, morbilità o morte. Il livello di dose più elevato di norma è scelto per rendere manifesta la tossicità, ad esempio con un calo dell'aumento del peso (circa del 10 %). Tuttavia, a seconda degli obiettivi dello studio (cfr. paragrafo 6), si può optare per una dose massima inferiore alla dose che renda manifesta la tossicità, ad esempio se una dose provoca un effetto indesiderato preoccupante che però ha un impatto lieve sull'aspettativa di vita o sul peso corporeo.

25. I livelli di dose e l'intervallo tra i livelli di dose possono essere scelti per stabilire un rapporto dose-risposta e, a seconda delle modalità di azione della sostanza chimica in esame, un NOAEL o altri risultati attesi dello studio, ad esempio una dose di riferimento (BMD, *benchmark dose*, cfr. paragrafo 27). Tra i fattori da tenere in considerazione nella scelta delle dosi più basse rientrano anche la curva attesa del rapporto dose-risposta, le dosi alle quali possono subentrare dei cambiamenti nel metabolismo o nella modalità di azione tossica, il livello a cui si prevede una soglia o il livello che si prevede possa costituire un punto di partenza per un'estrapolazione a basse dosi. L'obiettivo principale di uno studio combinato di cancerogenesi/tossicità cronica è di ottenere informazioni ai fini della valutazione del rischio di cancerogenesi, mentre ottenere informazioni sulla cronicità tossica di norma è un obiettivo secondario. Questo aspetto va tenuto in considerazione nella scelta dei livelli di dose e dell'intervallo tra i livelli di dose per lo studio.

26. L'intervallo tra i livelli di dose scelto dipenderà dagli obiettivi dello studio e dalle caratteristiche della sostanza chimica in esame e non può essere imposto in ogni suo dettaglio dal presente metodo di prova, ma di frequente fattori tra due e quattro forniscono buoni risultati delle prove se applicati per determinare dosi a livelli discendenti, mentre spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto distanziati (ad esempio oltre un fattore di circa 6-10) tra le dosi. In linea generale va evitato l'uso di fattori superiori a 10 e se vi si ricorre è opportuno giustificare tale scelta.

27. Come precisato ulteriormente nel documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7), nella scelta della dose vanno tenuti in considerazione, tra l'altro, i seguenti aspetti:

— non linearità o punti di flesso presunti o riscontrati nella curva dose-risposta,

— aspetti tossicocinetici e range di dosi a cui subentra o meno induzione metabolica, saturazione o non linearità tra dosi esterne e interne,

— lesioni precursive, indicatori degli effetti o indicatori di processi biologici fondamentali sottostanti in corso,

▼M4

— aspetti principali (o presunti) delle modalità di azione, ad esempio dosi alle quali inizia a subentrare citotossicità, i livelli ormonali sono perturbati, i meccanismi di omeostasi sono superati ecc.,

— regioni della curva dose-risposta per cui è necessaria una stima particolarmente precisa, ad esempio nell'ambito della dose di riferimento prevista o di una soglia ipotizzata,

— considerazione dei livelli previsti di esposizione umana, soprattutto nella scelta delle dosi intermedie e basse.

28. Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza chimica in esame. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato dei gruppi-dose. Se una sostanza chimica è somministrata con la dieta e comporta una riduzione dell'assunzione di cibo significativa a causa di una minore palatabilità, può essere utile aggiungere un ulteriore gruppo di controllo alimentato allo stesso modo che si presterà di più a tale scopo.

Preparazione delle dosi e somministrazione della sostanza chimica in esame

29. La sostanza chimica in esame di norma viene somministrata con il cibo, l'acqua di abbeveraggio o per via intragastrica. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori informazioni in merito alle vie e ai metodi di somministrazione. La via di somministrazione dipende dall'obiettivo dello studio, dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza chimica in esame, dalla sua biodisponibilità e dalla via e dal metodo predominanti di esposizione degli esseri umani. È necessario giustificare la scelta della via e del metodo di somministrazione. Nell'interesse della salute animale, la somministrazione mediante sonda orale di norma è scelta solo per le sostanze per cui questa via e questo metodo di somministrazione corrispondono ragionevolmente a una potenziale esposizione umana (ad esempio farmaci). Per le sostanze chimiche ingerite con gli alimenti o presenti nell'ambiente, inclusi i pesticidi, la somministrazione avviene solitamente con il cibo o l'acqua di abbeveraggio. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio nel caso dell'esposizione professionale, può essere opportuna la somministrazione per altre vie.

30. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. È opportuno tenere conto, a seconda del caso, delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sulla consumazione di cibo o acqua sullo stato nutrizionale degli animali. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Devono essere disponibili informazioni in merito alla stabilità della sostanza chimica in esame e all'omogeneità delle soluzioni o razioni di dosaggio (a seconda del caso) nelle condizioni di somministrazione (ad esempio dieta).

31. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. In studi a lungo termine che ricorrono alla somministrazione con la dieta, la concentrazione nel cibo della sostanza chimica in esame di norma non può superare la soglia massima del 5 % della dieta totale, al fine di evitare degli squilibri alimentari. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può ricorrere sia a una concentrazione alimentare costante (mg/kg di cibo o ppm), sia a dosi di livello costante in funzione del peso dell'animale (mg/kg di peso corporeo), con calcolo su base settimanale. La scelta di eventuali alternative va specificata.

▼M4

32. In caso di somministrazione per via orale è prevista una dose giornaliera della sostanza chimica in esame (sette giorni la settimana) per un periodo di 12 mesi (fase relativa alla cronicità) o 24 mesi (fase relativa alla cancerogenesi), cfr. anche paragrafi 33 e 34. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio, ad esempio cinque giorni la settimana. In caso di somministrazione per via cutanea, di norma gli animali sono trattati con la sostanza chimica in esame per almeno 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, così come specificato nel capitolo B.9 del presente allegato (11), per un periodo di 12 mesi (fase relativa alla cronicità) o 24 mesi (fase relativa alla cancerogenesi). L'esposizione per via inalatoria si protrae per 6 ore al giorno, 7 giorni la settimana, ma, se giustificata, può essere scelta un'esposizione di 5 giorni la settimana. La durata del periodo di somministrazione di norma è di 12 mesi (fase relativa alla cronicità) o 24 mesi (fase relativa alla cancerogenesi). Se per l'esposizione «a naso solo» s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è si possono adeguare le durate massime di esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. La scelta di una durata di esposizione inferiore a 6 ore al giorno deve essere debitamente motivata. Cfr. anche il capitolo B.8 del presente allegato (9).

33. Se la somministrazione della sostanza chimica in esame avviene per via intragastrica, deve avvenire per mezzo di una sonda gastrica o una cannula per intubazione ogni giorno all'incirca allo stesso orario. Di norma viene somministrata una dose singola una volta al giorno, ma laddove, ad esempio, la sostanza chimica in esame fosse un irritante locale, è possibile mantenere la dose giornaliera ripartendola su due momenti diversi (due volte al giorno). Il massimo volume di liquido che può essere somministrato in un'unica soluzione dipende dalle dimensioni dell'animale. Il volume deve essere limitato il più possibile e per i roditori non può superare, di norma, 1 ml/100 g di peso corporeo (31). La variabilità dei volumi somministrati va ridotta al minimo regolando le concentrazioni in modo da assicurare un volume costante in tutti i livelli di dose. Sostanze chimiche potenzialmente corrosive o irritanti sono considerate un'eccezione e devono essere diluite per evitare effetti locali gravi. Va evitato lo svolgimento di prove con concentrazioni che rischiano di essere corrosive o irritanti per il tratto gastrointestinale.

Durata dello studio

34. Il periodo di esposizione e la durata della fase relativa alla cronicità del presente studio di norma sono pari a 12 mesi, ma il disegno sperimentale rende possibile e può essere applicato anche a studi dalla durata più breve (ad esempio 6 o 9 mesi) o più lunga (ad esempio 18 o 24 mesi), a seconda delle disposizioni di regimi normativi specifici o dagli specifici fini meccanicistici. È opportuno che gli scostamenti da una durata di esposizione di 12 mesi siano giustificati, in particolare in caso di periodi di durata inferiore. Tutti i gruppi-dose previsti per questa fase saranno conclusi nel momento previsto ai fini della valutazione della tossicità cronica e della patologia non neoplastica. Una volta terminata l'esposizione, ai gruppi satellite previsti per controllare la reversibilità di eventuali alterazioni tossicologiche indotte dalla sostanza chimica in esame non sarà somministrata alcuna dose per un periodo non inferiore di 4 settimane e non superiore a un terzo della durata totale dello studio.

35. La durata della fase del presente studio relativa alla cancerogenesi per i roditori di norma sarà pari a 24 mesi, un periodo che si estende per la maggior parte della durata di vita normale degli animali utilizzati. La durata degli studi può essere più lunga o più breve a seconda della durata di vita del ceppo delle specie animali previste per lo studio, ma deve essere giustificata. Per determinati ceppi di topi, ad esempio AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, può essere più appropriata una durata di 18 mesi. Qui di seguito saranno forniti alcuni orientamenti relativi alla durata e al termine dello studio e alla sopravvivenza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori orientamenti in materia, tra cui le considerazioni sull'accettabilità di uno studio di cancerogenesi negativo in relazione alla sopravvivenza degli animali.

▼M4

— Va considerata la decisione di concludere lo studio se il numero di animali sopravvissuti nei gruppi a dose più bassa è inferiore al 25 %

— Lo studio non va concluso in caso di morti premature dovute alla tossicità limitate al gruppo ad alta dose

— Le valutazioni relative alla sopravvivenza vanno effettuate distinguendo tra i due sessi

— Lo studio non si deve prolungare oltre il momento in cui i dati resi disponibili in questo contesto non sono più sufficienti per giungere a una valutazione valida dal punto di vista statistico.

OSSERVAZIONI (FASE RELATIVA ALLA CRONICITÀ TOSSICA)

36. Tutti gli animali vanno osservati per identificare segni di morbilità e mortalità, in genere all'inizio e alla fine della giornata, weekend e giorni festivi inclusi. Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione nel caso in cui questa avvenga per via intragastrica.

37. Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, al termine della prima settimana dello studio e successivamente a cadenza mensile. Le osservazioni devono rispettare un protocollo che limiti al minimo indispensabile le differenze tra i singoli e non devono dipendere dai risultati del gruppo esaminato. Le osservazioni del caso vanno eseguite fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'incirca allo stesso orario. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue la prova. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle membrane mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività del sistema nervoso autonomo (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Verranno inoltre registrate le modifiche osservate nel comportamento, nella postura e nella risposta alla manipolazione, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipi (per esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (per esempio automutilazione, marcia a ritroso) (32).

38. Tutti gli animali vanno sottoposti a un esame oftalmologico con un oftalmoscopio o un altro dispositivo idoneo, prima della prima somministrazione della sostanza chimica in esame. Al termine dello studio, questo esame va condotto preferibilmente su tutti gli animali, ma almeno sui gruppi ad alta dose e di controllo. Se si riscontrano alterazioni degli occhi correlate al trattamento è necessario esaminare tutti gli animali. Se da un'analisi strutturale o da altre informazioni si riscontra una tossicità oculare, la frequenza degli esami oculari va intensificata.

39. Per le sostanze chimiche per cui prove precedenti di tossicità a dose ripetuta a 28 giorni e/o a 90 giorni hanno indicato potenziali effetti neurotossici, possono essere svolte valutazioni facoltative della reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (32) (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (33) (34) (35), della forza di presa (36) e dell'attività motoria (37) prima dell'inizio dello studio e a cadenza trimestrale dopo l'inizio dello studio fino al 12° mese incluso, così come alla fine dello studio (se più lungo di 12 mesi). Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate anche procedure alternative non indicate nella bibliografia.

▼M4

40. Le sostanze chimiche per cui prove di tossicità a dose ripetuta a 28 giorni e/o a 90 giorni hanno indicato potenziali effetti immunotossici, alla fine dello studio possono essere sottoposte ad ulteriori analisi facoltative di tale parametro.

Peso corporeo, consumo di cibo/acqua ed efficienza alimentare

41. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio del trattamento, almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Le misurazioni del consumo di cibo e dell'efficienza alimentare devono essere effettuati almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese Se la sostanza chimica in esame è somministrata con l'acqua di abbeveraggio, il consumo di acqua deve essere misurato almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. È utile tener conto della misurazione del consumo di acqua anche negli studi in cui quest'ultimo è alterato.

Esami ematologici e biochimici clinici

42. Negli studi che prevedono la presenza di roditori, vanno svolti esami ematologici su tutti gli animali sperimentali (10 animali di sesso maschile e 10 animali di sesso femminile per gruppo), a 3, 6 e 12 mesi, così come alla fine dello studio (se di durata superiore a 12 mesi). Se sono previsti dei topi, può essere necessario prevedere animali satellite per poter eseguire tutti gli esami ematologici del caso (cfr. paragrafo 19). Negli studi con non roditori, saranno presi dei campioni da quantità minore di animali (ad esempio 4 animali per sesso per ciascun gruppo negli studi con cani), a stadi intermedi e alla fine dello studio, analogamente ai roditori. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono necessariamente essere condotte se non è stato riscontrato nessun effetto in base ai parametri ematologici in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico, ad esempio con punture cardiache o dal seno retro-orbitale, sotto anestesia.

43. Vanno esaminati i seguenti parametri (38): conteggio totale e differenziato dei leucociti, conteggio degli eritrociti, conteggio delle piastrine, ematocrito (volume sanguigno occupato dalla componente eritrocitaria), volume corpuscolare medio, emoglobina corpuscolare media, concentrazione di emoglobina corpuscolare media, tempo di prototrombina e tempo di tromboplastina parziale attivata. Possono essere misurati anche altri parametri ematologici come i corpi di Heinz o un'altra morfologia eritrocitaria atipica o metaemoglobina, se del caso, a seconda della tossicità della sostanza chimica in esame. Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza chimica in esame. Se la sostanza chimica in esame ha un effetto sul sistema ematopoietico, possono essere indicati anche il conteggio dei reticolociti e la citologia del midollo osseo, sebbene questi non siano necessariamente esami di routine.

44. Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, gli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da almeno 10 animali di sesso maschile e 10 animali di sesso femminile per gruppo, ai medesimi intervalli di tempo specificati per gli esami ematologici e sempre sugli stessi animali. Se sono previsti dei topi, può essere necessario prevedere animali satellite per poter eseguire tutte le determinazioni biochimiche cliniche del caso. Negli studi con non roditori, saranno presi dei campioni da quantità minore di animali (ad esempio 4 animali per sesso per ciascun gruppo negli studi con cani), a stadi intermedi e alla fine dello studio, analogamente ai roditori. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono essere necessariamente condotte se non è stato riscontrato nessun effetto in base ai

▼M4

parametri di biochimica clinica in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni (ad eccezione dei topi) ([1]). Vanno esaminati i seguenti parametri (38): glucosio, urea (azoto ureico), creatinina, proteine totali, albumina, calcio, sodio, potassio, colesterolo totale, almeno due esami idonei alla valutazione epatocellulare (alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, glutammato deidrogenasi, acidi biliari totali (39) e almeno due esami idonei alla valutazione epatobiliare (fosfatasi alcalina, gamma-glutamil transferasi, 5'-nucleotidasi, bilirubina totale, acidi biliari totali) (39). Se opportuno possono essere misurati anche altri parametri di chimica clinica, come i trigliceridi a digiuno, ormoni specifici e colinesterasi, a seconda della tossicità della sostanza chimica in esame. Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

45. L'esame delle urine va effettuato su tutti gli animali sperimentali (10 animali di sesso maschile e 10 animali di sesso femminile per gruppo) sui campioni raccolti seguendo gli stessi intervalli applicati in ambito ematologico e di chimica clinica. Le misurazioni a 3 mesi, sia per i roditori, sia per i non roditori, non devono essere necessariamente condotte se non è stato riscontrato nessun effetto sull'esame delle urine in uno studio precedente della durata di 90 giorni condotto con livelli di dose comparabili. I seguenti parametri sono stati inclusi in una raccomandazione di esperti su studi di patologia clinica (38): aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine totali e glucosio. Altre determinazioni riguardano il chetone, l'urobilinogeno, la bilirubina e il sangue occulto. Se necessario, per ampliare lo studio dell'effetto o degli effetti osservato/i è possibile impiegare ulteriori parametri.

46. Generalmente si considera necessario determinare le variabili di riferimento di natura ematologica e di biochimica clinica prima di iniziare un trattamento in studi che coinvolgono dei cani, ma ciò non è ritenuto necessario negli studi che prevedono l'uso di roditori (38). Se tuttavia non si dispone di dati storici di riferimento adeguati (cfr. paragrafo 58), si dovrebbe considerare di produrre tali dati.

PATOLOGIA

Necroscopia macroscopica

47. Tutti gli animali dello studio di norma vanno sottoposti a completa e dettagliata necroscopia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Tuttavia si può anche disporre (per i gruppi che saranno sacrificati nel corso dello studio o per i gruppi satellite) che le osservazioni siano limitate a parametri specifici e fondamentali, come la neurotossicità o l'immunotossicità (cfr. paragrafo 21). Gli animali in oggetto non devono necessariamente essere sottoposti ad autopsia e alle procedure successive descritte nei seguenti paragrafi. Per gli animali sentinella, valutando caso per caso può essere necessaria un'autopsia, a discrezione del responsabile scientifico dello studio.

([1]) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, è preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. D'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza in esame. Tutti gli animali valutati dovrebbero essere nella stessa situazione fisiologica e pertanto esami approfonditi di tipo neurologico dovrebbero essere svolti in un giorno diverso dai campionamenti biochimico-clinici.

▼**M4**

48. Si deve misurare il peso degli organi di ciascun animale, tranne di quelli esclusi dall'ultima parte del paragrafo 47. Fegato, reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, utero, ovaie, timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

49. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per il previsto esame istopatologico successivo (40) (i tessuti tra parentesi quadre sono facoltativi):

tutte le lesioni macroscopiche	cuore	pancreas	stomaco (prestomaco, stomaco ghiandolare)
ghiandole surrenali	ileo	ghiandola paratiroidea	[denti]
aorta	digiuno	nervo periferico	testicoli
cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	reni	pituitaria	Timo
intestino cieco	ghiandola lacrimale (esorbitale)	prostata,	tiroide
cervice	fegato	retto	[lingua]
ghiandola della coagulazione	polmone	ghiandola salivare	trachea
colon	linfonodi (superficiali e profondi)	vescicola seminale	vescica
duodeno	ghiandola mammaria (obbligatoria per esemplari di sesso femminile e, se visibile ai fini della la dissezione, anche per quelli di sesso maschile	muscolo scheletrico	utero (cervice inclusa)
epididimo	[tratto respiratorio superiore, incluso il naso, i turbinati e i seni paranasali]	pelle	[uretere]
occhi (retina inclusa)	esofago	midollo spinale (a tre livelli: Cervicale, mediotoracico e lombare)	[uretra]
[femore con articolazione]	[bulbo olfattivo]	milza	vagina
cistifellea (eccetto per i topi)	ovaia	[sterno]	sezione di midollo osseo e/o un aspirato di midollo osseo fresco
ghiandola di Harder			

▼M4

In caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno conservati entrambi gli organi. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame. Negli studi che prevedono una somministrazione per via epidermica, vanno preservati gli organi di cui all'elenco riferito alla via orale. In particolare, è necessario procedere al campionamento e alla conservazione della pelle della zona di applicazione della sostanza. In studi che prevedono la via inalatoria come metodo di somministrazione, l'elenco dei tessuti da conservare ed esaminare in relazione al tratto respiratorio deve corrispondere alle raccomandazioni contenute nel capitolo B.8 del presente allegato (8) e del capitolo B.29 del presente allegato (9). Per altri organi/tessuti (oltre ai tessuti conservati specificamente del tratto respiratorio) va esaminato l'elenco degli organi relativo alla via orale.

Esame istopatologico

50. Sono disponibili orientamenti sulle buone pratiche nella conduzione di studi di patologia tossicologica (40). Come minimo, gli esami istopatologici prevedono quanto segue:

— tutti i tessuti dei gruppi ad alta dose e di controllo,

— tutti i tessuti degli animali che sono morti o sono stati sacrificati nel corso dello studio,

— tutti i tessuti che evidenziano anomalie macroscopiche,

— tessuti bersaglio o tessuti che hanno evidenziato cambiamenti legati al trattamento nel gruppo ad alta dose, di tutti gli animali in tutti gli altri gruppi-dose,

— in caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno esaminati entrambi gli organi.

OSSERVAZIONI (FASE RELATIVA ALLA CANCEROGENESI)

51. Tutti gli animali vanno osservati per identificare segni di morbilità e mortalità, in genere all'inizio e alla fine della giornata, weekend e giorni festivi inclusi. Inoltre gli animali devono essere sottoposti a un controllo quotidiano dei segni di rilevanza tossicologica. Negli studi che prevedono una somministrazione per via intragastrica, gli animali devono essere controllati nel periodo immediatamente successivo alla somministrazione della dose. Va prestata particolare attenzione allo sviluppo di tumori e si registrerà la data di inizio, la posizione, le dimensioni, l'aspetto e la progressione di ogni tumore grossolanamente visibile o palpabile.

52. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio del trattamento, almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Le misurazioni del consumo di cibo e dell'efficienza alimentare devono essere effettuati almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con l'acqua di abbeveraggio, il consumo di acqua deve essere misurato almeno una volta la settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta al mese. È utile tener conto della misurazione del consumo di acqua anche negli studi in cui quest'ultimo è alterato.

▼M4

Ematologia, biochimica clinica e altre misurazioni

53. Al fine di sfruttare al massimo le informazioni ottenute dallo studio, soprattutto per quando riguarda le considerazioni legate alle modalità di azione è possibile effettuare dei prelievi di sangue ai fini di analisi ematologiche e di biochimica clinica, ma la scelta è a discrezione del responsabile scientifico dello studio. Potrebbe essere utile anche effettuare l'esame delle urine. I dati sugli animali usati nella fase relativa alla tossicità cronica dello studio, di norma dalla durata di 12 mesi (paragrafo 34) forniscono informazioni su questi parametri. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 116 (7) fornisce ulteriori indicazioni sul valore di tali campionamenti nel quadro di uno studio di cancerogenesi. Se alla fine del test si raccolgono campioni di sangue, ciò deve avvenire alla fine del periodo di prova, subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali. Occorre che i campioni siano prelevati da un sito specifico, ad esempio con punture cardiache o dal seno retro-orbitale, sotto anestesia. Per l'esame possono essere preparati anche degli strisci di sangue, in particolare se si presume che il midollo osseo rientri tra gli organi bersaglio, sebbene il valore di tale esame degli strisci di sangue nella fase relativa alla cancerogenesi ai fini della valutazione del potenziale cancerogeno/oncogeno non sia indiscusso (38).

PATOLOGIA

Necroscopia macroscopica

54. Tutti gli animali dello studio, ad eccezione degli animali sentinella e di altri animali satellite (cfr. paragrafo 20), dovranno essere sottoposti ad una necroscopia completa, comprendente un accurato esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi, della cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Per gli animali sentinella e altri animali satellite, valutando caso per caso può essere necessaria un'autopsia, a discrezione del responsabile scientifico dello studio. Il peso degli organi di norma non rientra nello studio di cancerogenesi, poiché i cambiamenti geriatrici prima, e in fasi successive lo sviluppo di tumori hanno un effetto distorsivo sull'utilità dei relativi dati. Il peso degli organi potrebbe essere tuttavia importante ai fini della valutazione della forza probante dei dati e in particolare per considerazioni sulle modalità di azione. Se tali dati sono rilevati nel quadro di uno studio satellite, vanno raccolti a distanza di non oltre un anno dall'inizio dello studio.

55. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per il previsto esame istopatologico successivo (40) (i tessuti tra parentesi quadre sono facoltativi):

tutte le lesioni macroscopiche	cuore	pancreas	stomaco (prestomaco, stomaco ghiandolare)
ghiandole surrenali	ileo	ghiandola paratiroidea	[denti]
aorta	digiuno	nervo periferico	testicoli
cervello (incluse le sezioni di cervello, cervelletto, bulbo/ponte)	reni	pituitaria	timo
intestino cieco	ghiandola lacrimale (esorbitale)	prostata,	tiroide
cervice	fegato	retto	[lingua]
ghiandola della coagulazione	polmone	ghiandola salivare	trachea
colon	linfonodi (superficiali e profondi)	vescicola seminale	vescica

▼M4

duodeno	ghiandola mammaria (obbligatoria per esemplari di sesso femminile e, se visibile ai fini della la dissezione, anche per quelli di sesso maschile)	muscolo scheletrico	utero (cervice inclusa)
epididimo	[tratto respiratorio superiore, incluso il naso, i turbinati e i seni paranasali]	pelle	[uretere]
occhi (retina inclusa)	esofago	midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare)	[uretra]
[femore con articolazione]	[bulbo olfattivo]	milza	vagina
cistifellea (eccetto per i topi)	ovaia	[sterno]	sezione di midollo osseo e/o un aspirato di midollo osseo fresco
ghiandola di Harder			

In caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno conservati entrambi gli organi. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame. Negli studi che prevedono una somministrazione per via epidermica, vanno preservati gli organi di cui all'elenco riferito alla via orale. In particolare, è necessario procedere al campionamento e alla conservazione della pelle della zona di applicazione della sostanza. In studi che prevedono la via inalatoria come metodo di somministrazione, l'elenco dei tessuti da conservare ed esaminare in relazione al tratto respiratori deve corrispondere alle raccomandazioni contenute nel capitolo B.8 del presente allegato (8) e del capitolo B.29 del presente allegato (9). Per altri organi/tessuti (oltre ai tessuti conservati specificamente del tratto respiratorio) va esaminato l'elenco degli organi relativo alla via orale.

Esame istopatologico

56. Sono disponibili orientamenti sulle buone pratiche nella conduzione di studi di patologia tossicologica (40). Come minimo, vanno esaminati i seguenti tessuti:

— tutti i tessuti dei gruppi ad alta dose e di controllo;

— tutti i tessuti degli animali che sono morti o sono stati sacrificati nel corso dello studio;

— tutti i tessuti che evidenziano anomalie macroscopiche, tumori compresi;

— se si osservano dei cambiamenti istopatologici in relazione al trattamento nel gruppo ad alta dose, tali tessuti vanno esaminati in ogni animale di tutti gli altri gruppi-dose;

— in caso di organi pari, ad esempio i reni o le ghiandole surrenali, vanno esaminati entrambi gli organi.

▼M4

DATI E RELAZIONE (CANCEROGENESI E TOSSICITÀ CRONICA)

Dati

57. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione. Tabelle riassuntive dei dati devono fornire le medie e le deviazioni standard (per dati raccolti in via continuativa) relative agli animali che evidenziano effetti tossici o lesioni, oltre all'indicazione dell'entità delle lesioni.

58. I dati storici di controllo possono essere utili per interpretare i risultati dello studio, ad esempio quando i dati forniti da gruppi di controllo paralleli sembrano divergere significativamente da dati recenti relativi ad animali di controllo dello stesso centro di prova/della stessa colonia. Se valutati, i dati storici di controllo vanno trasmessi dallo stesso laboratorio e devono riferirsi ad animali della medesima età e dello stesso ceppo, nonché essere generati nei cinque anni che precedono lo studio in questione.

59. I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale. Questa scelta deve rendere possibili degli aggiustamenti in funzione del grado di sopravvivenza, se necessario.

60. La relazione sulla prova deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— origine della sostanza chimica,

— numero del lotto,

— certificazione dell'analisi chimica.

Veicolo (se del caso):

— giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali.

— specie/ceppo utilizzato e giustificazione della scelta effettuata,

— numero, età e sesso degli animali all'inizio della prova,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

▼**M4**

Condizioni sperimentali:

— criteri di scelta della via di somministrazione e della dose,

— laddove opportuno, metodi statistici usati per analizzare i dati,

— dettagli sulla formulazione della sostanza chimica in esame/la preparazione della dieta,

— dati di analisi sulla concentrazione, la stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— via di somministrazione e relativi dettagli della sostanza chimica in esame,

— per gli studi che prevedono la somministrazione per via inalatoria, scelta tra esposizione «a naso solo» o «a corpo intero»,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/giorno) e, se del caso, fattore di conversione tra la concentrazione della sostanza chimica in esame nella dieta/acqua di abbeveraggio (mg/kg o ppm) e la dose effettiva,

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati (vanno indicati dati da presentare sotto forma di tabelle e dati individuali sugli animali)

Dati generali:

— dati sulla sopravvivenza degli animali,

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo, calcoli sull'efficienza alimentare, se effettuati, nonché consumo di acqua, se del caso,

— dati tossicocinetici, se disponibili,

— dati oftalmoscopici (se disponibili),

— esami ematologici (se disponibili),

— esami di chimica clinica (se disponibili).

Risultati clinici:

— segni di tossicità,

— incidenza (e, se classificata, la gravità) di eventuali anomalie,

— natura, gravità e durata dei segni clinici (reversibili o meno).

Dati necroscopici:

— peso corporeo finale,

— peso degli organi (anche in relazione al peso corporeo, se del caso),

— reperti necroscopici; incidenza e gravità delle anomalie.

Esame istopatologico:

— reperti istopatologici non neoplastici,

— qualsiasi altro reperto istopatologico,

▼M4

— correlazione tra reperti macroscopici e microscopici,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici relativi al trattamento, inclusi i livelli di gravità,

— relazioni su eventuali esami inter pares dei vetrini.

Elaborazione statistica dei risultati, se del caso

Discussione dei risultati:

— discussione su tutti gli approcci di modellizzazione,

— rapporti dose-risposta,

— dati umani storici,

— esame di tutte le informazioni sulle modalità di azione,

— determinazione BMD, NOAEL o LOAEL,

— rilevanza per gli esseri umani.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Capitolo B.27 del presente allegato, Test di tossicità orale subcronica Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 90 giorni sui non roditori.

(7) OCSE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolo B.8 del presente allegato, Tossicità subacuta a dose ripetuta (28 giorni) per inalazione.

(10) Capitolo B.29 del presente allegato, Studio di tossicità subcronica a dose ripetuta (90 giorni) per inalazione.

(11) Capitolo B.9 del presente allegato, Tossicità a dose ripetuta (28 giorni) per via cutanea.

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OCSE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OCSE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

(27) 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)

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼B

B.34. **SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza sperimentale è somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di animali maschi e femmine. I maschi dovrebbero essere sottoposti a dosaggio durante la crescita e per almeno un ciclo spermatogenico completo (approssimativamente 56 giorni per il topo e 70 giorni per il ratto) per provocare qualsiasi tipo di effetto avverso da parte della sostanza di saggio sulla spermatogenesi.

Le femmine della generazione P dovrebbero essere sottoposte a dosaggio per almeno due cicli estrali completi per suscitare qualsiasi tipo di effetto contrario della sostanza in esame sull'estro. Gli animali sono poi accoppiati. La sostanza in esame viene somministrata ad entrambi i sessi durante il periodo di accoppiamento ed in seguito soltanto alle femmine durante la gravidanza e per la durata del periodo di allattamento. Per la somministrazione della sostanza in esame per via inalatoria, il metodo richiederà modifiche.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Prima del saggio gli animali giovani e sani sono mescolati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi trattati e di controllo. Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Si raccomanda di somministrare la sostanza in esame nella dieta o nell'acqua da bere. Sono accettabili anche altre vie di somministrazione. Il dosaggio per tutti gli animali dovrebbe essere fatto con lo stesso metodo durante l'appropriato periodo dell'esperimento. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovranno notoriamente produrre effetti tossici. Il dosaggio dovrà essere fatto su una base di sette giorni per settimana.

▼B

Animali da esperimento

Scelta della specie

Il ratto o il topo sono le specie preferite. Si dovrebbero utilizzare animali sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Non si dovrebbero utilizzare ceppi a bassa fecondità. Gli animali di saggio dovrebbero essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età.

Per una valutazione adeguata della fertilità, si dovrebbero studiare sia i maschi sia le femmine. Tutti gli animali per il saggio e i controlli dovrebbero essere svezzati prima dell'inizio del dosaggio.

Numero e sesso

Ogni gruppo trattato e di controllo dovrebbe contenere un numero sufficiente di animali per avere circa 20 femmine incinte prossime a partorire o quasi al termine della gravidanza.

L'obiettivo è di avere sufficienti gravidanze e figliate per assicurare una valutazione significativa del potenziale della sostanza di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza e sul comportamento materno negli animali della generazione P, e sul lattante, sulla crescita e sullo sviluppo della figliata F, dal concepimento allo svezzamento.

Condizioni di saggio

Il cibo e l'acqua dovrebbero essere forniti ad libitum. Nell'imminenza del parto, le femmine incinte dovrebbero essere messe in gabbie separate o in gabbie apposite per il parto e possono essere rifornite di materiale per la costruzione della tana.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, il gruppo di controllo dovrebbe ricevere il veicolo al livello di dose più alto usato. Se una sostanza in esame provoca una riduzione dell'ingestione o dell'utilizzazione della dieta, si potrebbe considerare necessario l'uso di un gruppo di controllo parallelo. Idealmente, a meno che non sia limitato dalla natura fisico/-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato dovrebbe indurre effetti tossici, ma non mortalità nei genitori P. La(e) dose(i) intermedia(e) dovrebbe indurre effetti tossici minimi attribuibili alla sostanza in esame e la dose più bassa non dovrebbe indurre alcun effetto osservabile sui genitori o sulla prole. Quando somministrato con sonda o in capsula, il dosaggio di ogni animale dovrebbe essere basato sul peso corporeo del singolo animale e regolato settimanalmente per tener conto dei cambiamenti del peso corporeo. Per le femmine gravide, i dosaggi possono essere basati sul peso corporeo nel giorno 0 o al 6° giorno di gravidanza.

Saggio limite

Nel caso di sostanze a bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce evidenza di interferenza con la funzione riproduttiva, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari. Se uno studio preliminare con un livello di dose elevato, con evidenza precisa di tossicità materna, non evidenzia effetti avversi sulla fertilità, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari.

▼B

Svolgimento del saggio

Programmi sperimentali

Il dosaggio giornaliero dei genitori maschi P dovrebbe cominciare a circa cinque-nove settimane di età, dopo svezzamento e acclimatazione per almeno 5 giorni, Nei ratti, il dosaggio viene continuato per dieci settimane prima del periodo di accoppiamento (per i topi, otto settimane). I maschi dovrebbero essere sacrificati ed esaminati sia alla fine del periodo di accoppiamento oppure, alternativamente, essi possono essere mantenuti con la dieta sperimentale per la possibile produzione di una seconda figliata e dovrebbero essere sacrificati un po' prima della fine dello studio. Per le femmine genitrici P il dosaggio dovrebbe cominciare dopo almeno 5 giorni di acclimatazione e continuare per almeno due settimane prima dell'accoppiamento. Il dosaggio giornaliero delle femmine P dovrebbe continuare durante il periodo di accoppiamento di tre settimane, la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F_1. Si dovrebbe dare attenzione a modifiche del programma di dosaggio sulla base di altre informazioni disponibili sulla sostanza in esame, quali l'induzione del suo metabolismo o bioaccumulazione.

Procedura di accoppiamento

Negli studi degli effetti tossici sulla riproduzione si possono usare i seguenti sistemi di accoppiamento: 1:1 (un maschio e una femmina), oppure 1:2 (un maschio e due femmine).

Usando il sistema di accoppiamento 1:1 si dovrebbe mettere una femmina con lo stesso maschio finché la femmina non rimanga gravida o finché non siano trascorse tre settimane. Ogni mattina le femmine dovrebbero essere esaminate per la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 di gravidanza è definito come il giorno in cui si trova un tappo vaginale oppure lo sperma.

Le coppie che non riescono ad accoppiarsi dovrebbero essere studiate per determinare la causa della sterilità apparente.

Questo può comportare procedure quali, ad esempio, quella di fornire opportunità supplementari di accoppiamento con altri maschi o femmine provati, esame microscopico degli organi riproduttori, e esame del ciclo estrale o della spermatogenesi.

Dimensioni della figliata

Gli animali sottoposti a dosaggio durante lo studio di fertilità vengono lasciati partorire normalmente ed allevare liberamente la prole fino alla fase di svezzamento.

Se si effettua una standardizzazione si suggerisce la seguente procedura. Tra il 1° ed il 4° giorno dopo la nascita, la dimensione di ogni figliata può essere regolata eliminando i piccoli in più, in modo da avere, nella misura del possibile, quattro maschi e quattro femmine per figliata.

Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere quattro animali di ogni sesso per figliata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, cinque maschi e tre femmine). La standardizzazione non è applicabile alle figliate di meno di otto piccoli.

▼B

Osservazioni

Durante tutto il periodo di saggio, ogni animale dovrebbe essere sottoposto ad osservazione almeno una volta al giorno. Si dovrebbero registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato, e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Nei periodi precedenti e durante l'accoppiamento, il consumo alimentare può essere misurato quotidianamente. Dopo il parto e durante l'allattamento, le misurazioni del consumo di alimento (e del consumo dell'acqua quando la sostanza sperimentale è somministrata in acqua potabile) dovrebbero essere effettuate nello stesso giorno della pesatura delle figliate. I maschi e le femmine P dovrebbero essere pesati nel primo giorno del dosaggio e in seguito settimanalmente. Queste osservazioni dovrebbero essere registrate individualmente per ogni animale adulto.

La durata della gestazione dovrebbe essere calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni figliata dovrebbe essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero ed il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e la presenza di grosse anomalie.

I piccoli morti e quelli sacrificati al 4° giorno dovrebbero essere conservati e studiati per la constatazione di possibili difetti. I piccoli vivi dovrebbero essere contati e le figliate pesate al mattino dopo la nascita, al 4° giorno e al 7° e settimanalmente fino alla conclusione dello studio, quando gli animali dovrebbero essere pesati individualmente.

Le anomalie fisiche o comportamentali osservate nei ceppi o nella prole dovrebbero essere registrate.

Patologia

Necroscopia

Al momento del sacrificio o della morte durante lo studio, gli animali della generazione P dovrebbero essere esaminati macroscopicamente per l'individuazione di tutte le anomalie strutturali o mutamenti patologici, prestando particolare attenzione agli organi del sistema riproduttivo. I piccoli morti o moribondi dovrebbero essere esaminati per individuare eventuali difetti.

Istopatologia

Le ovaie, l'utero, il collo dell'utero, la vagina, i testicoli, l'epididimo, le vescichette seminali, la prostata, la ghiandola della coagulazione, la ghiandola pituitaria e l'organo(i)-bersaglio di tutti gli animali P dovrebbero essere conservati per l'esame microscopico. Nel caso in cui questi organi non siano stati esaminati in altri studi con dosi multiple, essi dovrebbero essere esaminati microscopicamente in tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e di controllo e negli animali che muoiono durante l'esperimento, quando fattibile.

Gli organi di questi animali che mostrano anomalie dovrebbero quindi essere esaminati in tutti gli altri animali P. In questi casi, si dovrebbe eseguire l'esame microscopico di tutti i tessuti che mostrano alterazioni patologiche macroscopiche. Come suggerito per le procedure di accoppiamento, gli organi riproduttivi degli animali sospetti di sterilità possono essere sottoposti all'esame microscopico.

▼B

2. **DATI**

I dati possono essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di maschi fertili, il numero di femmine incinte, i tipi di cambiamenti e la percentuale degli animali che mostrano ciascun tipo di cambiamento.

Quando possibile, i risultati numerici dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico generalmente riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie/ceppo usato,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresa la fertilità, la gestazione normale e la vitalità,

— tempo di morte durante lo studio o, se gli animali sono sopravvissuti fino al tempo previsto per il sacrificio, alla conclusione dello studio,

— tabella indicante i pesi di ogni figliata, il peso medio dei piccoli ed i pesi individuali dei piccoli a termine,

— effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale,

— data di osservazione di ogni segno anomalo e decorso successivo,

— dati sul peso corporeo degli animali P,

— risultati della microscopia,

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati degli esami microscopici,

— elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼B

B.35. STUDIO DI TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA A DUE GENERAZIONI

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 416 (2001) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo di test della capacità riproduttiva a due generazioni è in grado di fornire dati generici riguardanti gli effetti di una sostanza sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile, compresi funzione delle gonadi, ciclo estrale, comportamento nell'accoppiamento, concepimento, gestazione, parto, allattamento e svezzamento, nonché crescita e sviluppo della prole. Lo studio può inoltre fornire informazioni sugli effetti della sostanza circa la morbilità e la mortalità neonatale, nonché dati preliminari sulla tossicità a carico dello sviluppo prenatale e postnatale, e servire da guida per test successivi. Oltre a studiare la crescita e lo sviluppo della generazione F_1, questo metodo di test è inteso a valutare l'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile, nonché la crescita e lo sviluppo della generazione F_2. Per ottenere ulteriori dati inerenti alla tossicità sullo sviluppo e ai deficit funzionali è possibile incorporare nel presente protocollo parti di altri studi attingendo eventualmente ai metodi per la tossicità e/o la neurotossicità in fase evolutiva; alternativamente gli stessi endpoint possono essere esaminati in studi separati, mediante adeguati metodi di test.

1.2. PRINCIPIO DEL TEST

La sostanza di saggio viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi della generazione P la sostanza va somministrata durante la crescita e per almeno un ciclo completo di spermatogenesi (all'incirca 56 giorni nel topo e 70 giorni nel ratto) con l'obiettivo di provocare eventuali effetti avversi sulla spermatogenesi. Gli effetti sugli spermatozoi si rilevano in base a svariati parametri (tra cui la morfologia e la motilità degli spermatozoi) nonché mediante preparazione tissutale e dettagliato esame istopatologico. Nel caso siano disponibili dati sulla spermatogenesi provenienti da un precedente studio a dosi ripetute di durata sufficiente, come ad esempio uno studio di 90 giorni, non occorre includere nella valutazione i maschi della generazione P. Si raccomanda tuttavia di conservare campioni o registrazioni digitali degli spermatozoi della generazione P, per consentirne la valutazione in un momento successivo. Alle femmine della generazione P la sostanza va somministrata durante la crescita e per diversi cicli estrali completi con l'obiettivo di provocare eventuali effetti avversi sulla normalità del ciclo estrale. La sostanza di saggio viene somministrata agli animali della generazione parentale (P) durante l'accoppiamento, durante la gravidanza e per tutto lo svezzamento della loro prole della generazione F_1. Allo svezzamento, si prosegue la somministrazione della sostanza da saggiare alla prole della generazione F_1 durante la crescita e successivamente l'età adulta, l'accoppiamento e la produzione di una generazione F_2, continuando fino allo svezzamento della generazione F_2.

Tutti gli animali vanno sottoposti a osservazioni cliniche e valutazione anatomopatologica per individuare eventuali segni di tossicità, in particolare gli effetti sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile e sulla crescita e sullo sviluppo della prole.

▼B

1.3. DESCRIZIONE DEL METODO

1.3.1. **Selezione delle specie animali**

La specie d'elezione per l'esecuzione del test è il ratto. In caso di utilizzo di altre specie, occorre giustificare tale scelta e apportare adeguate modifiche al protocollo. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio di ciascun sesso.

1.3.2. **Condizioni di stabulazione e alimentazione**

La temperatura nella stanza degli animali sperimentali deve essere di 22 ºC (± 3º). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie della stanza, è bene puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di buio. Per quanto concerne l'alimentazione si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di assicurare un'adeguata miscelazione della sostanza di saggio, quando somministrata con il presente metodo.

Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. Le procedure di accoppiamento vanno effettuate in gabbie adeguate per tale scopo. Dopo comprovata copulazione, le femmine accoppiate vanno isolate in gabbie da parto o maternità. Anche i ratti accoppiati possono essere tenuti in piccoli gruppi, ma vanno separati uno o due giorni prima del parto. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire agli animali materiali specifici adeguati per la costruzione del nido.

1.3.3. **Preparazione degli animali**

Devono essere utilizzati animali giovani sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Gli animali del test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. È necessario conoscere eventuali relazioni di consanguineità in modo da evitare l'accoppiamento tra individui fratelli. Gli animali vanno assegnati a random ai gruppi di controllo e di trattamento (si raccomanda la stratificazione per peso corporeo). Le gabbie vanno sistemate in modo da ridurre al minimo i possibili effetti dovuti alla loro posizione. A ciascun animale va assegnato un numero identificativo unico. Per la generazione P l'assegnazione del numero identificativo deve avvenire prima dell'inizio della somministrazione delle dosi. Per la generazione F_1 l'assegnazione va fatta allo svezzamento degli animali selezionati per l'accoppiamento. È necessario conservare la registrazione indicante la nidiata di origine per tutti gli animali F_1 selezionati. Inoltre, si raccomanda l'identificazione individuale dei piccoli non appena possibile dopo la nascita nel caso si preveda la pesatura individuale degli stessi o l'esecuzione di eventuali test funzionali.

All'inizio della somministrazione delle dosi gli animali della generazione parentale P devono avere 5-9 settimane di età. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto praticamente possibile, di età e peso uniformi.

▼B

1.4. PROCEDURA

1.4.1. **Numero e sesso degli animali**

Ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve comprendere un numero sufficiente di animali da fornire idealmente non meno di 20 femmine gravide al parto o prossime al termine. Ciò può risultare impossibile in caso di somministrazione di sostanze che causano effetti indesiderati correlati al trattamento (ad esempio sterilità o eccessiva tossicità a dose elevata). L'obiettivo è di produrre un numero di gravidanze tale da assicurare un'analisi significativa del potenziale della sostanza in termini di effetti sulla fertilità, la gravidanza e il comportamento materno, oltre che la suzione, la crescita e lo sviluppo della prole F_1, dal concepimento e fino alla maturità, per proseguire poi con gli effetti sullo sviluppo della prole della successiva generazione F_2 fino allo svezzamento. Comunque, il mancato ottenimento del numero desiderato di femmine gravide (± 20) non invalida necessariamente lo studio e va valutato caso per caso.

1.4.2. **Preparazione delle dosi**

Si raccomanda di somministrare la sostanza di prova per via orale (assieme alla dieta o all'acqua potabile o mediante sonda gastrica), a meno che non si consideri più adeguata un'altra via di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione).

Se necessario la sostanza di prova va disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. È necessario determinare la stabilità della sostanza di prova nel veicolo.

1.4.3. **Dosaggio**

Si utilizzano almeno tre livelli di dose e un controllo corrispondente. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza di prova non impongano limiti in tal senso, il livello della dose più elevata va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità ma non provocare il decesso o gravi sofferenze. Di norma gli studi con un tasso di mortalità imprevista inferiore a circa il 10 % degli animali parentali P sono comunque accettabili. Per dimostrare eventuali effetti correlati al dosaggio e individuare il livello al quale non si osservano effetti avversi (NOAEL) occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose. In genere, per determinare i livelli decrescenti delle dosi risultano ottimali fattori compresi tra due e quattro e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto ampi (ad esempio un fattore superiore a 10) fra i dosaggi. Per gli studi con somministrazione nella dieta, l'intervallo fra le dosi non deve superare un fattore di 3. I livelli delle dosi vanno selezionati tenendo conto di eventuali dati sulla tossicità già disponibili, e in particolar modo dei risultati di studi con dosi ripetute. Occorre inoltre tenere conto di eventuali informazioni già disponibili sul metabolismo e la cinetica della sostanza di prova o di sostanze correlate. Questi dati contribuiranno altresì a dimostrare l'adeguatezza del regime di dosaggio.

▼B

Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza di saggio. Tranne per la somministrazione della sostanza di saggio, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in maniera identica ai soggetti del gruppo di trattamento. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato in uso nel test. Se una sostanza di prova viene somministrata mediante la dieta e causa una riduzione dell'apporto o dell'utilizzo degli alimenti, può diventare necessario l'impiego di un gruppo di controllo pair-fed. In alternativa è possibile usare i dati da studi controllati disegnati per valutare gli effetti della diminuzione del consumo di cibo sui parametri della riproduzione al posto di un gruppo di controllo pair-fed concomitante.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; infine, effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.4.4. **Test limite**

Se uno studio orale a un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg per peso corporeo/die o, per somministrazione tramite l'alimentazione o l'acqua potabile, a una percentuale equivalente nella dieta o nell'acqua potabile secondo le procedure descritte per questo studio non produce effetti tossici osservabili, sia negli animali parentali sia nella prole e se, sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente e/o metabolicamente correlate, non ci si attende tossicità, allora può non essere considerato necessario uno studio completo con livelli di dosi differenti. Si applica il test limite, tranne quando l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dose orale più elevato. Per altri tipi di somministrazione, quali l'inalazione o l'applicazione cutanea, sono spesso le proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio, come la solubilità, a indicare e limitare il livello massimo di esposizione raggiungibile.

1.4.5. **Somministrazione delle dosi**

Occorre somministrare la sostanza di prova agli animali per 7 giorni alla settimana, di preferenza per via orale (dieta, acqua potabile o sonda gastrica). In caso di utilizzo di un'altra via di somministrazione, occorre giustificare tale scelta ed eventualmente apportare modifiche adeguate al test. Tutti gli animali saranno trattati per la stessa via di somministrazione nel corso di un periodo sperimentale adeguato. Se la sostanza di saggio viene somministrata mediante sonda, deve trattarsi di una sonda gastrica. Il volume di liquidi somministrati in una volta non deve superare 1 ml/l00 g di peso corporeo (0,4 ml/100 g di peso corporeo è il massimo per l'olio di semi di mais), tranne che nel caso di soluzioni acquose in cui è consentito usare 2 ml/100 g. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che generalmente manifestano effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume di prova, regolando la concentrazione, in modo da assicurare un volume costante a tutti i livelli di dose. Negli studi con sonda gastrica normalmente i piccoli ricevono la sostanza solo indirettamente, attraverso il latte, finché non comincia il dosaggio diretto al momento dello svezzamento. Negli studi che prevedono la somministrazione nella dieta o nell'acqua potabile in genere i piccoli ricevono la sostanza di saggio anche direttamente quando cominciano ad alimentarsi da soli durante l'ultima settimana del periodo di allattamento.

▼B

Per quanto concerne le sostanze somministrate tramite il cibo o l'acqua potabile, è importante fare in modo che le quantità di sostanza di saggio impiegate non interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio idrico. Se la sostanza di saggio viene somministrata con la dieta, è possibile usare una concentrazione alimentare costante (ppm) o un livello costante di dosi rispetto al peso corporeo degli animali; occorre specificare l'opzione utilizzata. Nel caso di sostanze somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca negli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali. Nel regolare le dosi per la sonda gastrica in base al peso occorre tenere conto dei dati sulla distribuzione nella placenta.

1.4.6. **Programma sperimentale**

La somministrazione giornaliera delle dosi ai maschi e alle femmine della generazione parentale P deve iniziare a 5-9 settimane di età. La somministrazione giornaliera ai maschi e alle femmine F_1 deve iniziare allo svezzamento; occorre ricordare che, in caso di somministrazione della sostanza di saggio tramite la dieta o l'acqua potabile, l'esposizione diretta dei piccoli F_1 alla sostanza di saggio può avvenire già durante il periodo dell'allattamento. Per entrambi i sessi di entrambe le generazioni (P e F1) la somministrazione proseguirà per almeno 10 settimane prima del periodo di accoppiamento e andrà continuata, in entrambi i sessi, durante le 2 settimane del periodo di accoppiamento. I maschi vanno sacrificati con metodi non cruenti ed esaminati quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. Per quanto riguarda le femmine parentali P, il dosaggio va continuato per tutta la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F_1. Occorre eventualmente modificare il programma di somministrazione sulla base delle informazioni disponibili circa la sostanza di saggio, compresi dati già esistenti di tossicità, induzione del metabolismo o bioaccumulo. Di norma la dose somministrata a ciascun animale deve essere basata sulla più recente determinazione individuale del peso corporeo. Occorre tuttavia usare cautela nel regolare la dose durante l'ultimo periodo della gravidanza.

Il trattamento di maschi e femmine delle generazioni P e F_1 va proseguito fino alla soppressione. Tutti i maschi e le femmine adulti P e F_1 vanno sacrificati con metodi non cruenti quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. La prole F_1 non selezionata per l'accoppiamento e tutta la prole F_2 vanno sacrificate con metodi non cruenti dopo lo svezzamento.

1.4.7. **Procedura di accoppiamento**

1.4.7.1. *Accoppiamento parentale (P)*

Per ogni accoppiamento, ciascuna femmina viene posta insieme a un unico maschio dello stesso livello di dose (accoppiamento 1:1) finché non avviene la copulazione o finché non sono trascorse 2 settimane. Occorre esaminare ogni giorno le femmine alla ricerca di spermatozoi o tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si rileva la presenza di un tappo vaginale o di spermatozoi. Nel caso l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo. Le coppie in cui è avvenuta la copulazione vanno identificate chiaramente in sede di registrazione dei dati. Occorre evitare l'accoppiamento fra consanguinei.

▼B

1.4.7.2. *Accoppiamento della generazione F_1*

Per l'accoppiamento della prole F_1 occorre selezionare, allo svezzamento, almeno un maschio e una femmina da ciascuna nidiata per farli accoppiare con altri piccoli dello stesso livello di dose, ma di una nidiata diversa, allo scopo di produrre la generazione F_2. Se non si osservano differenze significative nel peso corporeo o nell'aspetto dei potenziali partner, la selezione dei piccoli da ciascuna nidiata va effettuata a random. Nel caso in cui si osservino differenze, vanno selezionati i migliori rappresentanti di ciascuna nidiata. Di prassi, il modo migliore per farlo è basarsi sul peso corporeo, sebbene l'aspetto possa risultare un parametro più adeguato. La prole F_1 non va fatta accoppiare prima del raggiungimento della piena maturità sessuale.

Le coppie senza progenie vanno analizzate per determinare la causa apparente dell'infertilità. In tal caso può rendersi necessario ricorrere a determinate procedure, tra cui la ripetizione dell'accoppiamento con altri maschi o femmine di comprovata capacità riproduttiva, l'esame microscopico degli organi riproduttori e l'esame dei cicli estrali o della spermatogenesi.

1.4.7.3. *Secondo accoppiamento*

Qualora si riscontri una deviazione dalla norma nel numero di esemplari di una nidiata correlabile al trattamento o qualora si osservino effetti inusitati nel corso del primo accoppiamento, si raccomanda di far accoppiare una seconda volta gli adulti delle generazioni P o F_1 per produrre una seconda nidiata. Per le femmine o i maschi che non hanno prodotto piccoli è consigliabile il riaccoppiamento con riproduttori comprovati del sesso opposto. Se si ritiene necessaria la produzione di una seconda nidiata da parte di una delle generazioni, gli animali vanno fatti riaccoppiare all'incirca una settimana dopo lo svezzamento della nidiata precedente.

1.4.7.4 *Dimensioni della nidiata*

Occorre permettere agli animali di figliare normalmente e di allevare la prole fino allo svezzamento. La standardizzazione del numero di individui delle nidiate è facoltativa. Nel caso venga eseguita, occorre descrivere in modo particolareggiato il metodo utilizzato.

1.5. OSSERVAZIONI

1.5.1. **Osservazioni cliniche**

Occorre eseguire ogni giorno osservazioni cliniche generali e, nel caso di somministrazione mediante sonda gastrica, tale esame va programmato tenendo conto del previsto periodo di picco degli effetti dopo la somministrazione. Sono da registrare i cambiamenti del comportamento, i segni di parto difficoltoso o prolungato e tutti i segni di tossicità. È necessario eseguire un ulteriore esame più dettagliato su ciascun animale a intervalli almeno settimanali, ad esempio da svolgersi in occasione di una pesatura dell'animale. Due volte al giorno, o eventualmente una volta al giorno durante il fine settimana, occorre valutare tutti gli animali in relazione alla morbilità e alla mortalità.

▼B

1.5.2. **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua degli animali parentali**

Gli animali delle generazioni parentali (P e F_1) vanno pesati il primo giorno della somministrazione e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Le femmine parentali (P e F_1) vanno pesate almeno nei giorni 0, 7, 14 e 20 o 21 di gestazione, nonché durante l'allattamento negli stessi giorni di pesatura dei cuccioli e nel giorno della soppressione degli animali. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto. Durante il periodo precedente all'accoppiamento e quello di gestazione il consumo di cibo va registrato con cadenza almeno settimanale. Se la sostanza di saggio viene somministrata nell'acqua, il consumo di acqua va registrato con cadenza almeno settimanale.

1.5.3. **Ciclo estrale**

La lunghezza e la normalità del ciclo estrale vanno valutate nelle femmine P e F_1 mediante striscio vaginale prima dell'accoppiamento, nonché facoltativamente durante l'accoppiamento, finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Durante il prelievo delle cellule vaginali/-cervicali occorre prestare attenzione a non arrecare disturbo alla mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (1).

1.5.4. **Parametri relativi agli spermatozoi**

Al momento della soppressione occorre registrare il peso di testicoli ed epididimi di tutti i maschi P e F_1, riservando un esemplare di ciascun organo per l'esame istopatologico (vedi sezioni 1.5.7 e 1.5.8.1). In una subserie di almeno dieci maschi di ciascun gruppo di maschi delle generazioni P e F_1, i testicoli e gli epididimi restanti sono da utilizzare rispettivamente per la conta degli spermatidi resistenti all'omogeneizzazione e delle riserve di spermatozoi nella coda dell'epididimo. Per la stessa subserie di maschi occorre raccogliere gli spermatozoi dalla coda dell'epididimo o dal vaso deferente allo scopo di valutarne la motilità e la morfologia. Se si osservano effetti correlati al trattamento o se da altri studi emergono prove di possibili effetti sulla spermatogenesi, la valutazione degli spermatozoi va eseguita su tutti i maschi di ciascun gruppo; diversamente, è possibile limitare la conta ai maschi P e F_1 di controllo e del gruppo di trattamento alla dose più elevata.

È necessario contare il numero totale degli spermatidi testicolari resistenti all'omogeneizzazione e degli spermatozoi della coda dell'epididimo (2)(3). Le riserve caudali di spermatozoi possono essere calcolate in base alla concentrazione e al volume degli spermatozoi nella sospensione usata per eseguire le valutazioni qualitative e in base al numero di spermatozoi rinvenuti mediante successiva triturazione e/o omogeneizzazione del restante tessuto caudale. La conta va eseguita sulla subserie selezionata di maschi di tutti i gruppi di dosaggio immediatamente dopo la soppressione degli animali, a meno che non si eseguano registrazioni video o digitali o salvo in caso di congelamento degli esemplari per esame successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo alla dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad esempio effetti sulla conta, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo che ha ricevuto la dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

▼B

La motilità degli spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente) va valutata o videoregistrata immediatamente dopo aver sacrificato gli animali. Occorre recuperare gli spermatozoi riducendo al minimo il danno e diluirli, per l'analisi della motilità, usando metodi accettabili (4). La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili va determinata soggettivamente od oggettivamente. Se si esegue l'analisi computerizzata del movimento (5)(6)(7)(8)(9)(10) il calcolo della mobilità progressiva si basa su soglie definite dall'utente per la velocità media sul percorso e l'avanzamento in linea retta o indice lineare. Se si esegue una videoregistrazione dei campioni (11) o le immagini vengono registrate in altro modo al momento dell'autopsia, è sufficiente procedere solo all'analisi dei maschi P e F_1 di controllo e della dose più elevata, a meno che non si osservino effetti correlati al trattamento; in tal caso vanno esaminati anche i gruppi delle dosi inferiori. In assenza di immagini video o digitali, vanno analizzati mediante autopsia tutti i campioni di tutti i gruppi di trattamento.

È necessario eseguire una valutazione morfologica di un campione di spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente). Gli spermatozoi (ad esempio 200) vanno esaminati come preparazioni fisse e umide (12) e classificati come normali o anomali. Esempi di anomalie morfologiche degli spermatozoi sono fusione, teste isolate e malformazioni di testa e/o coda. La valutazione va eseguita sulla subserie selezionata dei maschi di ciascun gruppo di dose subito dopo la soppressione degli animali o, in caso di registrazioni video o digitali, in un secondo momento. Gli strisci, una volta fissati, possono anch'essi essere letti in un momento successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo della dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad esempio effetti sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo della dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

Qualora uno o più parametri di valutazione degli spermatozoi di cui sopra siano già stati esaminati nell'ambito di uno studio sulla tossicità sistemica della durata di almeno 90 giorni, non occorre ripeterli nello studio su due generazioni. Si raccomanda, tuttavia, di conservare campioni o registrazioni digitali degli spermatozoi della generazione P per consentire un'eventuale valutazione successiva.

1.5.5. **Prole**

Ciascuna nidiata va esaminata non appena possibile dopo il parto (giorno di allattamento 0) per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, distinguere gli individui nati morti da quelli nati vivi e individuare eventuali anomalie macroscopiche. I piccoli trovati morti il giorno 0 dovrebbero, se non sono in stato di decomposizione, essere esaminati alla ricerca di possibili difetti e della causa del decesso e preparati per la conservazione. I piccoli vivi dovrebbero essere contati e pesati individualmente alla nascita (giorno di allattamento 0) o il giorno 1, e successivamente ad intervalli regolari, ad esempio nei giorni 4, 7, 14 e 21 dell'allattamento. È importante registrare eventuali anomalie fisiche o comportamentali osservate nelle madri o nella prole.

▼B

Lo sviluppo fisico della prole va registrato soprattutto in termini di aumento del peso corporeo. Altri parametri fisici (ad esempio l'apertura di orecchie e occhi, l'eruzione dei denti, la crescita del pelo) possono fornire informazioni supplementari, ma è preferibile valutare questo tipo di dati alla luce di quelli sulla maturazione sessuale (ad esempio età e peso corporeo all'apertura vaginale o alla separazione balano-prepuziale) (13). Si raccomanda di eseguire indagini sulla funzionalità in generale (ad esempio attività motoria, funzioni sensoriali, ontogenesi dei riflessi) della prole F_1 prima e/o dopo lo svezzamento, in particolare per le funzioni correlate alla maturazione sessuale, se tali indagini non sono comprese in studi separati. Degli animali F_1 svezzati e selezionati per l'accoppiamento occorre determinare l'età al momento dell'apertura vaginale e della separazione prepuziale. La distanza anogenitale va misurata al giorno 0 dalla nascita nei piccoli F_2, se ciò risulta indicato per la presenza di alterazioni nel rapporto tra i due sessi o nei tempi di maturazione sessuale della generazione F_1.

Le osservazioni sulla funzionalità possono essere omesse nei gruppi che rivelano altri chiari segni di effetti negativi (ad esempio un rallentamento significativo dell'aumento ponderale, ecc.). Se effettuate, le indagini sulla funzionalità non devono riguardare i piccoli selezionati per l'accoppiamento.

1.5.6. **Esame autoptico macroscopico**

Al momento della soppressione o dell'eventuale decesso di esemplari nel corso dello studio è necessario eseguire un esame autoptico macroscopico per determinare eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche su tutti gli animali parentali (P e F_1), tutti i piccoli con anomalie visibili o segni clinici, oltre che su un piccolo di ciascun sesso di ogni nidiata selezionato a random, sia della generazione F_1 che della F_2. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttore. I piccoli moribondi che vengono sacrificati con modalità non cruente e i piccoli deceduti, quando non in stato di decomposizione, vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e/o della causa del decesso e successivamente conservati.

Occorre esaminare l'utero di tutte le femmine primipare, evitando di compromettere l'esame istopatologico, per determinare la presenza e il numero dei siti di impianto.

1.5.7. **Peso degli organi**

Al momento della soppressione occorre determinare il peso corporeo e il peso dei seguenti organi di tutti gli animali delle generazioni parentali P e F_1 (gli organi pari vanno pesati individualmente):

— utero, ovaie,

— testicoli, epididimi (totali e coda),

— prostata,

— vescicole seminali con ghiandole della coagulazione e i relativi liquidi oltre che la prostata (come un'unica unità),

— cervello, fegato, reni, milza, ghiandole pituitaria, tiroide e surrenali e organi bersaglio noti.

Al momento della soppressione dei piccoli F_1 e F_2 selezionati per l'esame autoptico si procede alla determinazione del peso corporeo raggiunto alla fine dell'esperimento (vedi sezione 1.5.6). Di ciascun piccolo, di entrambi i sessi da ciascuna nidiata selezionato a random, alla pesatura dei seguenti organi: cervello, milza e timo.

▼B

I risultati dell'autopsia macroscopica e della pesatura degli organi vanno valutati, quando possibile, in rapporto alle osservazioni fatte in altri studi con dose ripetuta.

1.5.8. **Istopatologia**

1.5.8.1. *Animali parentali*

I seguenti organi e tessuti degli animali delle generazioni parentali (P e F_1), o loro campioni rappresentativi, devono essere fissati e conservati in un mezzo adeguato per l'esame istopatologico:

— vagina, utero con cervice e ovaie (conservati in un fissativo appropriato),

— un testicolo (conservato in soluzione di Bouin o in un fissativo analogo), un epididimo, vescicole seminali, prostata e ghiandola della coagulazione,

— organi bersaglio precedentemente identificati di tutti gli animali P e F_1 selezionati per l'accoppiamento.

L'esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti conservati sopra elencati va eseguito su tutti gli animali P e F_1 della dose elevata e di controllo selezionati per l'accoppiamento. L'esame delle ovaie degli animali P è facoltativo. Gli organi che evidenziano alterazioni correlate al trattamento vanno esaminati anche nei gruppi alla dose bassa ed intermedia, allo scopo di contribuire alla determinazione del NOAEL. Inoltre, vanno sottoposti ad esame istopatologico gli organi della riproduzione degli animali dei gruppi di trattamento alla dose bassa ed intermedia nei quali si sospetta una riduzione della fertilità (ad esempio gli esemplari che non si sono accoppiati, che non hanno concepito, che non hanno generato o che non hanno partorito prole sana, o nei quali si sono osservati effetti sul ciclo estrale o sul numero, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi). Devono essere esaminate tutte le lesioni macroscopiche, quali atrofie e tumori.

L'esame istopatologico dettagliato dei testicoli (trattati ad esempio mediante fissativo di Bouin, inclusi in paraffina e preparati in sezioni trasversali di 4-5 μm di spessore) va effettuato allo scopo di identificare eventuali effetti correlati al trattamento, quali ritenzione di spermatidi, mancanza di strati o tipi di cellule germinali, formazione di cellule giganti polinucleate o spostamento delle cellule spermatogeniche nel lume (14). L'esame degli epididimi intatti deve comprendere testa, corpo e coda e può essere eseguito mediante valutazione di una sezione longitudinale. Occorre valutare la presenza di infiltrazioni leucocitarie, alterazioni della prevalenza dei tipi cellulari, tipi cellulari aberranti e fagocitosi degli spermatozoi nell'epididimo. Per l'esame degli organi della riproduzione maschili può essere impiegata la colorazione con PAS ed ematossilina.

Dopo l'allattamento l'ovaio deve contenere follicoli primordiali e in crescita, oltre ai grandi corpi lutei della lattazione. L'esame istopatologico deve individuare un deterioramento qualitativo della popolazione di follicoli primordiali. Nelle femmine F_1 occorre effettuare un'analisi quantitativa dei follicoli primordiali; il numero di animali, la selezione delle sezioni ovariche e le dimensioni dei campioni devono essere statisticamente adeguati alla procedura di analisi applicata. L'esame deve comprendere la conta del numero dei follicoli primordiali che può essere combinata con i follicoli piccoli in crescita per il confronto delle ovaie tra soggetti trattati e i controlli (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Animali svezzati*

I tessuti e gli organi bersaglio che presentano evidenti irregolarità nei piccoli con anomalie esterne o segni clinici, oltre a quelli di un individuo di ciascun sesso di ogni nidiata scelto a random, sia della generazione F_1 che della F_2, che non sono stati selezionati per l'accoppiamento, devono essere fissati e conservati in mezzo adeguato per l'esame istopatologico. Occorre effettuare una caratterizzazione istopatologica completa del tessuto conservato con particolare attenzione per gli organi dell'apparato riproduttore.

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati vanno riportati individualmente e riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo sperimentale e ciascuna generazione il numero di animali presenti all'inizio del test, il numero di animali trovati morti durante il test o soppressi per motivi umanitari, il momento di eventuali decessi o soppressioni con metodi non cruenti, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di osservazione sugli animali parentali e sulla prole, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate.

È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettato; i metodi statistici vanno selezionati come parte del disegno sperimentale e devono essere giustificati. Per l'analisi dei dati possono risultare utili i modelli statistici dose-risposta. La relazione deve comprendere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma software utilizzati, di modo che un revisore o un esperto di statistica indipendente possa rivalutare e ricostruire l'analisi.

2.2. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del presente studio di tossicità riproduttiva a due generazioni vanno valutati in base agli effetti osservati, ai reperti delle autopsie e all'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto, o la sua assenza, fra la dose della sostanza di saggio e la presenza o assenza, incidenza e gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, le conseguenze sulla fertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici. Nella valutazione dei risultati del test occorre tenere conto delle proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio e, quando disponibili, dei dati sulla sua tossicocinetica.

Un test di tossicità riproduttiva adeguatamente condotto deve fornire una stima soddisfacente del livello di dose al quale non si osservano effetti e consentire di capire gli effetti negativi sulla riproduzione, sul parto, sull'allattamento, sullo sviluppo postnatale, sulla crescita e sullo sviluppo sessuale.

▼B

2.3. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uno studio di tossicità riproduttiva a due generazioni deve fornire informazioni sugli effetti dovuti all'esposizione ripetuta ad una sostanza durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo. In particolare, un simile studio fornisce informazioni sui parametri relativi alla riproduzione e sullo sviluppo, la crescita, la maturazione e la sopravvivenza della prole. I risultati dello studio vanno interpretati insieme ai dati ottenuti con studi subcronici, sullo sviluppo prenatale, di tossicocinetica e altri studi disponibili. I risultati di questo studio possono essere impiegati per valutare la necessità di sottoporre a ulteriori test una determinata sostanza chimica. L'estrapolazione all'uomo dei risultati dello studio è valida solo limitatamente. Tali risultati si prestano piuttosto per trarre informazioni sui livelli di dose ai quali non si rilevano effetti e sui livelli di esposizione accettabile per l'uomo (20)(21)(22)(23).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

sostanza di saggio:

— natura fisica e, se pertinenti, proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— purezza.

Veicolo (se pertinente):

— giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

— specie/ceppo,

— numero, età e sesso degli animali,

— origine, condizioni di alloggio, dieta, materiali per la lettiera, ecc.,

— peso individuale degli animali all'inizio del test.

Condizioni del test:

— motivazione per la selezione del livello delle dosi,

— dettagli sulla formulazione/preparazione della sostanza di saggio somministrata nella dieta, concentrazioni ottenute,

— stabilità e omogeneità della preparazione,

— dettagli sulla somministrazione della sostanza di saggio,

— conversione dalla concentrazione della sostanza di saggio in dieta/acqua potabile (ppm) alla dose ottenuta (mg/kg peso corporeo/die), se pertinente,

— dettagli circa la qualità di cibo e acqua.

▼B

Risultati:

— consumo di cibo e di acqua (se disponibile), efficienza di trasformazione alimentare (incremento ponderale per grammo di cibo assunto), consumo della sostanza di saggio per gli animali P e F_1, tranne che per il periodo di coabitazione e per almeno l'ultimo terzo dell'allattamento,

— dati sull'assorbimento (se disponibili),

— dati sul peso corporeo per gli animali P e F_1 selezionati per l'accoppiamento,

— dati sul peso corporeo degli individui singoli e delle intere nidiate,

— peso corporeo al momento della soppressione degli animali e dati sul peso assoluto e relativo degli organi negli animali parentali,

— natura, gravità e durata dei segni clinici (reversibili o meno),

— momento del decesso durante lo studio o indicazione degli animali sopravvissuti fino alla conclusione del test,

— dati sulla risposta tossica per sesso e dose, ivi compresi gli indici di accoppiamento, fertilità, gestazione, nascita, vitalità e allattamento; la relazione deve indicare i numeri utilizzati per calcolare questi indici,

— effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.,

— reperti delle autopsie,

— descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici,

— numero di femmine P e F_1 con cicli normali e lunghezza dei cicli,

— numero totale degli spermatozoi nella coda dell'epididimo, percentuale di spermatozoi progressivamente mobili, percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e percentuale di spermatozoi con ciascuna delle anomalie identificate,

— tempo di maturazione per l'accoppiamento, compreso il numero di giorni fino all'accoppiamento,

— durata della gestazione,

— numero di impianti, corpi lutei, numero di esemplari per nidiata,

— numero di nati vivi e di perdite post-impianto,

— numero di piccoli con anomalie evidenti; numero di esemplari più piccoli del normale (se determinato),

— dati sui punti di repere fisici nei piccoli e altri dati sullo sviluppo postnatale; i punti di repere fisici valutati vanno giustificati,

— dati sulla funzionalità in piccoli e adulti, per quanto pertinenti,

— trattamento statistico dei risultati, se pertinente.

▼B

Discussione dei risultati.

Conclusioni, compresi i valori NOAEL per gli effetti sulle madri e sulla prole.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproductions in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In *Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10:401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298-303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H.s and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOSSICOCINETICA**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 417 (2010). Gli studi incentrati sulla tossicocinetica di una sostanza chimica si prefiggono di ottenere informazioni adeguate sull'assorbimento, la distribuzione, la biotrasformazione (ovvero il metabolismo) e l'escrezione della sostanza, di facilitare la comprensione della relazione tra la concentrazione, o la dose, e la tossicità osservata e di contribuire a comprendere il meccanismo attraverso il quale la sostanza chimica in esame esercita la propria tossicità. La tossicocinetica può aiutare a comprendere gli studi tossicologici dimostrando che l'esposizione degli animali da laboratorio alla sostanza in esame è di natura sistemica e rivelando quali siano i gruppi funzionali circolanti (composto progenitore/metaboliti). I principali parametri tossicocinetici ricavati dagli studi forniscono anche informazioni sul potenziale di accumulo della sostanza in esame nei tessuti e/o negli organi, come pure sul rischio di induzione di biotrasformazioni derivanti dall'esposizione alla sostanza.

2. I dati tossicocinetici possono essere utili per valutare se i dati di tossicità negli animali sono pertinenti ed adeguati ad essere estrapolati per valutare i pericoli e/o i rischi per gli esseri umani. Inoltre, gli studi tossicocinetici possono fornire informazioni utili a determinare i livelli di dose per gli studi di tossicità (cinetica lineare o non-lineare), gli effetti derivanti dalla via di somministrazione, la biodisponibilità e i problemi connessi all'impostazione dello studio. Alcuni tipi di dati tossicocinetici possono servire a elaborare dei modelli tossicocinetici su base fisiologica.

3. I dati tossicocinetici e metabolici sono importanti sotto diversi aspetti. Possono ad esempio fornire indicazioni su eventuali tossicità e modalità d'azione e su come queste interagiscono con i livelli di dose e la via di esposizione. Inoltre, i dati sul metabolismo possono fornire informazioni utili per valutare l'importanza, sul piano tossicologico, dell'esposizione a metaboliti esogeni della sostanza in esame.

4. La presenza di dati tossicocinetici adeguati aiuterà a confermare l'accettabilità e l'applicabilità dei metodi fondati sulle relazioni quantitative struttura-attività e le interpolazioni fondate sul metodo read-across o sul metodo del raggruppamento per valutare la sicurezza delle sostanze chimiche. I dati cinetici possono anche servire a valutare la rilevanza tossicologica di altri studi (ad esempio quelli in vivo/in vitro).

5. Salvo menzione contraria (cfr. in particolare i paragrafi da 74 a 78), il presente metodo di prova presuppone la somministrazione della sostanza in esame per via orale.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

6. Gli endpoint e i parametri tossicocinetici da misurare per le diverse classi di sostanze chimiche (ad esempio pesticidi, biocidi, sostanze chimiche industriali) sono diversi a seconda delle necessità e degli obblighi imposti dai diversi regimi normativi. Contrariamente alla maggior parte degli altri metodi di prova, il presente metodo descrive delle prove tossicocinetiche che comprendono misurazioni ed endpoint multipli. In futuro potranno essere sviluppati nuovi metodi di prova, e/o documenti di orientamento, per descrivere ciascun endpoint separatamente e più in dettaglio. Per quanto riguarda il presente metodo, la definizione di quali prove o quali valutazioni condurre è subordinata alle esigenze e/o ai bisogni dei singoli regimi normativi.

▼M4

7. Si possono allestire molti tipi di studi per valutare il comportamento tossicocinetico della sostanza in esame in riposta alle disposizioni normative. Tuttavia, a seconda delle particolari situazioni o esigenze normative, per valutare la sostanza in questione non sempre è necessario ricorrere a tutti i diversi studi a disposizione. L'impostazione di uno studio tossicocinetico deve essere sufficientemente flessibile, in modo da poter prendere in considerazione le caratteristiche della sostanza analizzata. In alcuni casi, sarà sufficiente esplorare solo una particolare serie di aspetti per prevenire i pericoli e i rischi associati alla sostanza. In alcune situazioni, è possibile estrarre dati tossicocinetici dalle valutazioni svolte per altri studi tossicologici, in altre, possono essere necessari studi tossicocinetici più approfonditi, a seconda dei regimi normativi e/o nel caso sia necessario rispondere a nuove questioni sorte nel corso della valutazione della sostanza.

8. Per migliorare la qualità delle analisi ed evitare un inutile ricorso ad animali, prima di svolgere le prove il laboratorio deve prendere in considerazione tutte le informazioni disponibili sulla sostanza e sui rilevanti metaboliti e analoghi. Le informazioni possono comprendere dati provenienti da altri metodi di prova pertinenti (studi in vivo, in vitro e/o valutazioni in silico). Per programmare lo studio e interpretare i risultati potrebbero risultare utili le proprietà fisico-chimiche, ad esempio: il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (espresso in valore log P_{OW}), la costante di dissociazione (pKa), l'idrosolubilità, la pressione di vapore e il peso molecolare di una sostanza. Li si può determinare utilizzando metodi idonei, descritti nei metodi di prova pertinenti.

LIMITI

9. Il presente metodo di prova non è stato concepito per casi particolari, quali femmine gravide o che allattano e relativa prole, né per valutare gli eventuali residui in animali da produzione alimentare esposti alla sostanza. Tuttavia, i dati ottenuti da uno studio allestito secondo il presente metodo possono fornire informazioni generali utili a impostare studi specifici per questo tipo di indagini. Il presente metodo di prova non è destinato a essere utilizzato per test sui nanomateriali. Una relazione sull'analisi preliminare delle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche in merito alla loro applicabilità ai nanomateriali suggerisce che non sia possibile applicare a tali materiali la linea guida dell'OCSE n. 417 (equivalente al presente metodo B.36) (1).

DEFINIZIONI

10. Le definizioni utilizzate ai fini del presente metodo di prova sono fornite in appendice.

CONSIDERAZIONI SUL BENESSERE DEGLI ANIMALI

11. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 contiene delle indicazioni sul trattamento umano degli animali (2). Se ne raccomanda la consultazione per tutti gli studi in vivo e in vitro descritti nel presente metodo.

DESCRIZIONE DEI METODI

Studi pilota

12. Si raccomanda e incoraggia il ricorso a studi pilota per la scelta dei parametri sperimentali per gli studi tossicocinetici (es.: metabolismo, bilancio di massa, procedure analitiche, definizione delle dosi, esalazioni di CO_2 ecc.). Potrebbe non essere necessario ricorrere all'uso di sostanze chimiche radiomarcate per caratterizzare alcuni dei parametri elencati sopra.

▼M4

Scelta degli animali

Specie

13. Le specie (e i ceppi) animali utilizzati per le prove tossicocinetiche devono di preferenza essere identiche a quelle utilizzate in altri studi tossicologici svolti con la sostanza in esame. Normalmente viene utilizzato il ratto, in quanto specie ampiamente usata negli studi tossicologici. Il ricorso o l'aggiunta di altre specie possono essere giustificati se uno studio tossicologico importante ha dimostrato la presenza di tossicità rilevante nelle specie in questione o se è dimostrato che la loro tossicità/tossicocinetica è più pertinente per l'uomo. In caso di utilizzo di un'altra specie e ceppo è necessario motivare la scelta.

14. Salvo indicazioni contrarie, la specie scelta per il presente metodo di prova è il ratto. Se si fa ricorso ad altre specie, alcuni aspetti del metodo potrebbero necessitare di modifiche.

Età e ceppo

15. Gli animali utilizzati devono essere adulti giovani (normalmente, 6-12 settimane al momento della somministrazione) e sani (cfr. anche paragrafi 13 e 14). In caso non si utilizzino giovani adulti, è necessario motivare la scelta. All'inizio della prova gli animali devono essere nella stessa fascia di età. La variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio di tutti gli animali interessati dallo studio. Idealmente, il ceppo usato sarà lo stesso di quello utilizzato per stabilire la banca dati tossicologica della sostanza in esame.

Numero e sesso degli animali

16. Ciascuna dose sperimentale va somministrata a un minimo di quattro animali dello stesso sesso. È necessario giustificare la scelta del sesso dell'animale. Occorre prendere in considerazione l'opportunità di ricorrere ad animali di entrambi i sessi (quattro maschi e quattro femmine) in presenza di dati che suffragano differenze tossicologiche significative legate al sesso.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. Nel corso della prova gli animali vanno stabulati individualmente. La stabulazione in gruppo può essere giustificata in determinate circostanze. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C) con un'umidità relativa del 30-70 %. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Sostanza chimica in esame

18. Occorre usare una sostanza radiomarcata al ^{14}C per tutti gli aspetti dello studio che riguardano il bilancio di massa e l'identificazione dei metaboliti; tuttavia, nel caso sia dimostrato che:

— è possibile valutare adeguatamente il bilancio di massa e l'identificazione dei metaboliti utilizzando una sostanza chimica non marcata,

— la specificità analitica e la sensibilità del metodo che fa ricorso a una sostanza non radioattiva sono uguali o maggiori di quelle che si sarebbero ottenute con una sostanza radiomarcata,

▼M4

non è necessario utilizzare una sostanza radiomarcata. Inoltre, si può ricorrere ad altri isotopi radioattivi e stabili, in particolare se tali elementi sono responsabili della porzione tossica della sostanza in esame o ne fanno parte. Se possibile, il marcatore radioattivo deve collocarsi in quella porzione centrale della molecola che è metabolicamente stabile (vale a dire, non è scambiabile, non è rimossa metabolicamente come CO_2 e non è incorporata nell'insieme dei radicali monocarbonici dell'organismo). Per seguire il destino metabolico della sostanza in esame potrebbe essere necessario marcare vari punti o determinate regioni della sua molecola.

19. Le sostanze radiomarcate e non radiomarcate sono analizzate utilizzando metodi idonei a stabilirne purezza e identità. La radiopurezza della sostanza radioattiva in esame deve essere la massima raggiungibile per tale sostanza (idealmente, superiore al 95 %) ed è necessario fare un ragionevole sforzo per identificare eventuali impurità presenti in percentuale pari o superiore al 2 %. Nella relazione sulla prova vengono riportate la purezza, l'identità e l'eventuale percentuale di presenza di impurità. Alcuni regimi normativi possono fornire sia ulteriori orientamenti per la definizione e la caratterizzazione delle sostanze chimiche composte da miscele sia metodi per determinarne la purezza.

Scelta delle dosi

Studio pilota

20. Una dose unica somministrata per via orale è generalmente sufficiente per lo studio pilota. Va utilizzata una dose non tossica ma sufficientemente elevata da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso) e da soddisfare lo scopo dichiarato dello studio pilota, come stabilito al paragrafo 12 del presente metodo.

Studio principale

21. Per gli studi principali, è preferibile ricorrere a un minimo di due dosi dato che le informazioni raccolte da almeno due gruppi-dose possono essere d'aiuto a stabilire le dosi da somministrare in altri studi di tossicità e per la valutazione dose-risposta nelle prove di tossicità già disponibili.

22. Se vengono somministrate due dosi, devono entrambe essere in dosaggio sufficientemente alto da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso). Le informazioni provenienti dai dati sulla tossicità già disponibili vanno prese in considerazione al momento di scegliere la dose. Se non si dispone di informazioni (provenienti, ad esempio, da studi di tossicità acuta orale che indichino i segni clinici di tossicità, oppure da studi sulla tossicità da dosi ripetute), per la dose più elevata è possibile prendere in considerazione un valore inferiore alla stima della DL_{50} (per via orale e per via cutanea) o della CL_{50} (per inalazione) o inferiore al valore più basso nella gamma di valori sperimentali stimati di tossicità acuta. La dose più bassa corrisponderà a una frazione della dose più elevata.

23. Se viene utilizzato un solo livello di dose, sarà idealmente una dose sufficientemente elevata da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso) anche senza produrre tossicità apparente. Occorre giustificare la decisione di non includere un secondo livello di dose.

24. Se è necessario stabilire gli effetti della dose sui processi cinetici, due dosi potrebbero non essere sufficienti e almeno una dose dovrebbe essere sufficientemente elevata da saturare tali processi. Se l'area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo» (AUC) non è lineare nell'intervallo tra la somministrazione di due livelli di dose nello studio principale, si può chiaramente dedurre che la saturazione di uno (o più) dei processi cinetici avviene in un punto compreso tra questi due livelli di dose.

▼M4

25. Nel caso di sostanze di prova con bassa tossicità, va utilizzata una dose massima di 1 000 mg/kg di peso corporeo (per via orale e per via cutanea; se la somministrazione avviene per inalazione, cfr. capitolo B.2 del presente allegato; in quest'ultimo caso, generalmente, la dose non supera i 2 mg/l). Considerazioni specifiche relative a una determinata sostanza possono rendere necessaria una dose superiore, in funzione dei regimi normativi. Occorre sempre giustificare la scelta di una particolare dose.

26. I dati relativi alla tossicocinetica e alla distribuzione tissutale ottenuti a partire da una dose singola possono essere sufficienti per determinare il potenziale di accumulo e/o di persistenza. In alcune circostanze può essere tuttavia necessario somministrare dosi ripetute: i) per valutare più accuratamente il potenziale di accumulo e/o di persistenza o l'evoluzione dei parametri tossicocinetici (per esempio induzione e inibizione enzimatica); oppure, ii) per rispondere alle esigenze della normativa applicabile. Negli studi a dosi ripetute è generalmente sufficiente la somministrazione ripetuta di dosi basse, ma, in determinate circostanze, può essere necessario somministrare a più riprese dosi elevate (cfr. anche paragrafo 57).

Somministrazione della sostanza chimica in esame

27. È necessario sciogliere la sostanza in esame o prepararne una sospensione omogenea nello stesso veicolo utilizzato per gli altri studi di tossicità orale realizzati sulla sostanza con somministrazione mediante sonda, se il veicolo è conosciuto. La scelta del veicolo deve essere motivata. Quando si imposta lo studio è necessario prendere in considerazione la scelta del veicolo e il volume delle dosi. Il metodo consueto di somministrazione è tramite sonda gastrica; ciononostante, in casi specifici può essere più opportuno ricorrere a capsule di gelatina o a una somministrazione con la dieta (in entrambi i casi è necessario giustificare la scelta). È altrettanto necessario avvalersi di mezzi di verifica delle dosi effettivamente somministrate a ogni animale.

28. Il volume massimo dei liquidi da somministrare tramite sonda gastrica in una sola volta dipende dalla taglia degli animali, dal tipo di veicolo scelto per la dose e dalla soppressione o meno dell'alimentazione prima della somministrazione della sostanza in esame. Occorre giustificare la scelta di sospendere o continuare l'alimentazione prima della somministrazione della dose. Solitamente, va utilizzato il minor volume possibile sia per veicoli acquosi sia per veicoli non acquosi. Di norma, per i roditori il livello di dose non deve superare i 10 ml/kg di peso corporeo. Nel caso di sostanze più lipofile, il volume del veicolo utilizzato può essere di 4 ml/kg di peso corporeo o superiore. Nel caso di somministrazione ripetuta, quando il digiuno quotidiano è controindicato, occorre considerare l'uso di livelli di dose più bassi (per esempio, da 2 a 4 ml/kg di peso corporeo). Se possibile, prendere in considerazione la possibilità di utilizzare livelli di dose coerenti con quello somministrato in altri studi su sostanze chimiche in esame somministrate per via orale tramite sonda gastrica.

29. La somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa e la misurazione del tenore della sostanza nel sangue e/o negli escreti può servire a determinare la biodisponibilità o l'assorbimento orale relativo. Per lo studio per via endovenosa, viene somministrata una dose singola della sostanza in esame (generalmente equivalente, ma non superiore, alla dose orale più bassa — cfr. «Scelta delle dosi») utilizzando un veicolo idoneo. La dose va somministrata in un volume adeguato (es. 1 ml/kg di peso corporeo) e nel sito prescelto ad almeno quattro animali di sesso adatto (si possono utilizzare animali di entrambi i sessi, giustificando la scelta, cfr. paragrafo 16). Per la somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa, è necessario sciogliere completamente o preparare una soluzione in sospensione della dose. Fare in modo che il veicolo per la somministrazione per via endovenosa non interferisca col flusso sanguigno o con

▼M4

l'integrità delle cellule sanguigne. Se la sostanza viene infusa tramite un'apposita pompa, la velocità di somministrazione deve essere registrata e va standardizzata per tutti gli animali. È necessario ricorrere ad anestesia se si procede all'incanulamento della vena giugulare (per somministrare la sostanza in esame e/o per prelievo di sangue) o se per la somministrazione si fa ricorso all'arteria femorale. Considerare con attenzione il tipo di anestesia, in quanto può incidere sulla tossicocinetica. Gli animali devono potersi riprendere adeguatamente prima della somministrazione della sostanza chimica in esame incorporata nel veicolo.

30. Per determinate sostanze chimiche è possibile ricorrere ad altre vie di somministrazione (come le vie cutanee e l'inalazione, per esempio, cfr. paragrafi da 74 a 78), in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche e l'utilizzo o la via di esposizione umana previsti.

Misurazioni

Bilancio di massa

31. Il bilancio di massa viene determinato in base alla somma della percentuale di dose (radioattiva) somministrata escreta nelle urine, nelle feci e nell'aria espirata, e della percentuale presente nei tessuti, nel resto della carcassa e nell'acqua di risciacquo delle gabbie (cfr. paragrafo 46). In generale, sono considerati adeguati i recuperi totali della sostanza chimica (radioattività) somministrata superiori al 90 %.

Assorbimento

32. È possibile calcolare una stima iniziale dell'assorbimento escludendo dal bilancio di massa la percentuale della dose nel tratto gastrointestinale e/o nelle feci. Per il calcolo della percentuale di assorbimento, cfr. paragrafo 33. Per l'analisi degli escreti, cfr. paragrafi da 44 a 49. Se non è possibile stabilire con esattezza, per mezzo di un bilancio di massa, l'assorbimento conseguente a una somministrazione per via orale (per esempio se più del 20 % della dose somministrata è presente nelle feci), può essere necessario procedere a studi più approfonditi che possono includere: 1) la somministrazione per via orale della sostanza in esame e la misurazione della sostanza nella bile; oppure 2) la somministrazione per via orale e per endovena della sostanza in esame e la misurazione della quantità netta di sostanza presente nelle urine, più quella nell'aria espirata e più quella nella carcassa, per ciascuna delle due vie citate. In entrambi gli studi, la misurazione della radioattività è utilizzata come metodo sostitutivo all'analisi specifica della sostanza chimica in esame e dei suoi metaboliti.

33. Per lo studio dell'escrezione biliare, la sostanza in esame viene somministrata generalmente per via orale. In questo tipo di studio, è necessario incanulare le vie biliari di almeno quattro animali di sesso adatto (o di entrambi i sessi, giustificando la scelta) e somministrare una dose singola della sostanza in esame. Dopo la somministrazione della sostanza, occorre monitorare l'escrezione di radioattività/sostanza in esame nella bile per il tempo necessario a stimare la percentuale della dose somministrata che viene escreta per questa via, in modo da calcolare direttamente a partire da questo dato la percentuale dell'assorbimento per via orale, nel modo seguente:

$$\text{Percentuale di assorbimento} = \begin{array}{l}(\text{quantità presentenella bile} + \text{nell'urina} \\ + \text{nell'aria espirata} + \text{ nella carcassa, esclusa la} \\ \text{quantità presente nel tratto gastrointestinale})/ \\ \text{quantità somministrata} \times 100\end{array}$$

34. Per alcune classi di sostanze la dose assorbita può essere secreta direttamente attraverso le membrane intestinali. In questi casi, la misurazione della percentuale della dose presente nelle feci dopo la somministrazione orale in ratti con dotto biliare incanulato non è considerata rappresentativa della dose non assorbita. Nei casi in cui si presume avvenga una secrezione intestinale, si raccomanda di basare il calcolo della percentuale della dose assorbita a partire dall'assorbimento calcolato, confrontando l'escrezione a seguito di somministrazione per via orale e l'escrezione tramite somministrazione per via endovenosa (in ratti intatti o con dotto biliare incanulato) (cfr. paragrafo 35). Inoltre, quando la quantificazione della secrezione intestinale è considerata necessaria, si consiglia di misurare l'escrezione presso ratti con dotto biliare incanulato dopo aver somministrato la dose per via endovenosa.

▼M4

Biodisponibilità

35. La biodisponibilità può essere determinata a partire dalla cinetica plasmatica/sanguigna dei gruppi esposti per via orale e per via endovenosa, come descritto ai paragrafi 50-52, attraverso analisi chimiche specifiche della sostanza in esame e/o del o dei metaboliti corrispondenti, evitando, pertanto, di ricorrere alla radiomarcatura della sostanza in causa. Per calcolare la biodisponibilità (F) della sostanza chimica in esame oppure del metabolita o dei metaboliti corrispondenti, ricorrere a questa formula:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

dove «AUC» è l'area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo», mentre «exp» è la via di somministrazione sperimentale (orale, cutanea, inalatoria).

36. Nella valutazione del rischio legato ad effetti sistemici, è generalmente preferibile ricorrere alla biodisponibilità del componente tossico, invece che alla percentuale di assorbimento, per confrontare le concentrazioni sistemiche ricavate da studi sugli animali con dati analoghi di biomonitoraggio provenienti da studi sull'esposizione professionale. La situazione può diventare più complessa se le dosi si situano nell'intervallo di risposta non lineare; è quindi importante che un precedente studio tossicocinetico consenta di scegliere una gamma di dosi con risposta nell'intervallo lineare.

Distribuzione tissutale

37. È importante conoscere la distribuzione tissutale della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti per poter identificare i tessuti bersaglio, comprendere i meccanismi soggiacenti alla tossicità e per poter ottenere informazioni sul potenziale di accumulo e di persistenza della sostanza e dei metaboliti. La percentuale della dose (radioattiva) totale nei tessuti e nel resto della carcassa va misurata per lo meno al termine dello studio di escrezione (vale a dire, di solito, fino a 7 giorni dopo la somministrazione della dose, oppure prima in funzione del comportamento specifico della sostanza in esame). Se alla fine dello studio non si rileva la presenza della sostanza nei tessuti (ad esempio nel caso in cui la sostanza sia stata eliminata prima della fine dello studio a causa di un'emivita breve) occorre prestare particolare attenzione per evitare una scorretta interpretazione dei dati. In situazioni simili, la distribuzione tissutale deve essere analizzata quando si raggiunge la concentrazione massima nel plasma/nel sangue (T_{max}) oppure il picco dell'escrezione urinaria della sostanza chimica in esame (e/o dei metaboliti), a seconda del caso (cfr. paragrafo 38). Inoltre, può essere necessario raccogliere tessuti anche in altri momenti in modo da poter determinare la distribuzione della sostanza in esame e/o dei metaboliti nei tessuti, valutare la dipendenza temporale (se del caso), aiutare a stabilire il bilancio di massa e/o se ciò è richiesto da un'autorità competente. I tessuti da prelevare comprendono fegato, grasso, tratto gastrointestinale, reni, milza, sangue intero, residuo della carcassa, tessuti dell'organo bersaglio ed altri eventuali tessuti (es. tiroide, eritrociti, organi riproduttivi, pelle e — in particolare negli animali pigmentati — occhi) potenzialmente importanti per la valutazione tossicologica della sostanza in esame. Occorre analizzare la più ampia gamma possibile di tessuti negli stessi momenti, per sfruttare al massimo l'uso degli animali e nell'eventualità che, negli studi di tossicità cronica e subcronica, si osservino effetti tossici nell'organo bersaglio. Vanno inoltre registrate la concentrazione del residuo (radioattivo) e le relazioni percentuali tra concentrazione nei tessuti e nel plasma (nel sangue).

38. È inoltre possibile che la valutazione della distribuzione tissutale in ulteriori momenti — ad esempio nel momento della concentrazione di picco nel plasma/nel sangue (es. T_{max}) o al massimo dell'escrezione urinaria — ottenuta, rispettivamente, a partire da studi di cinetica plasmatica/sanguigna o da studi sull'escrezione, possa essere necessaria a un'autorità competente o venga richiesta da quest'ultima. Si tratta di un'informazione che può aiutare a comprendere la tossicità e il potenziale di accumulo e di persistenza della sostanza in esame e dei metaboliti. Occorre giustificare la scelta dei campioni; i campioni da sottoporre ad analisi devono solitamente essere uguali a quelli indicati sopra (cfr. paragrafo 37).

▼M4

39. Negli studi sulla distribuzione tissutale è possibile quantificare la radioattività ricorrendo a dissezione, omogeneizzazione, combustione e/o solubilizzazione degli organi, seguite da conteggio in scintillazione liquida dei residui intrappolati. Altre tecniche (es. autoradiografia quantitativa a corpo intero e microautoradiografia dei recettori), attualmente a diversi livelli di sviluppo, potrebbero dimostrarsi utili per determinare la distribuzione di una sostanza chimica negli organi e/o nei tessuti (3) (4).

40. Per le vie d'esposizione che non siano quella orale, occorre prelevare e analizzare tessuti specifici, ad esempio i polmoni negli studi che prevedono la somministrazione per via inalatoria e la pelle in quelli con somministrazione per via cutanea. Cfr. paragrafi da 74 a 78.

Metabolismo

41. È necessario raccogliere escreti (e plasma, se del caso) per procedere all'identificazione e alla quantificazione di una sostanza chimica e dei suoi metaboliti, non modificati, come descritto ai paragrafi da 44 a 49. È accettabile raggruppare gli escreti per facilitare l'identificazione dei metaboliti in seno a un determinato gruppo-dose. Si raccomanda di stabilire il profilo dei metaboliti per ogni fase dello studio. Tuttavia, se l'assenza di campioni o di radioattività impedisce di farlo, è accettabile raggruppare l'urina e le feci raccolte in diversi momenti, ma provenienti solo da animali dello stesso sesso che abbiano ricevuto la stessa dose. Utilizzare metodi qualitativi e quantitativi appropriati per le analisi delle urine, delle feci e della radioattività espirata nonché, se del caso, della bile degli animali esposti.

42. Occorre fare un ragionevole sforzo per identificare tutti i metaboliti presenti in una percentuale uguale o superiore al 5 % della dose somministrata e tracciare uno schema metabolico per la sostanza in esame. Se la quantità della sostanza chimica in esame presente negli escreti è pari o superiore al 5 % della dose somministrata, la sostanza chimica va identificata. Con «identificata» si intende che venga determinata la struttura esatta dei suoi componenti. Normalmente, l'identificazione avviene effettuando simultaneamente una co-cromatografia del metabolita e dei modelli conosciuti, usando due sistemi diversi, oppure utilizzando tecniche in grado di determinare con sicurezza la struttura come la spettrometria di massa, la risonanza magnetica nucleare ecc. Nel caso della co-cromatografia, i metodi cromatografici che utilizzano la stessa fase stazionaria con due sistemi di solventi diversi non sono considerati adeguati per verificare l'identità dei metaboliti in quanto i due sistemi non sono indipendenti. L'identificazione tramite co-cromatografia va ottenuta utilizzando due sistemi diversi e indipendenti sul piano analitico, come ad esempio la cromatografia su strato sottile (TLC) in fase normale o inversa, oppure la cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC). Se la qualità della separazione cromatografica è adeguata, non è necessario ottenere un'ulteriore conferma tramite mezzi spettroscopici. Per un'identificazione inequivocabile è possibile ricorrere anche a metodi che forniscono informazioni strutturali: cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa (LC-MS), oppure cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) e spettrometria di risonanza magnetica nucleare.

43. Se non è possibile procedere all'identificazione dei metaboliti che rappresentano, individualmente, il 5 % od oltre della dose somministrata è necessario fornire una giustificazione/spiegazione di questo fatto nella relazione finale. Potrebbe essere utile identificare i metaboliti che rappresentano meno del 5 % della dose somministrata per migliorare la comprensione della via metabolica per la valutazione dei rischi e/o dei pericoli della sostanza in esame. Ogniqualvolta possibile, è necessario fornire la conferma della struttura dei metaboliti, che potrebbe rendere necessario stabilire il profilo metabolico nel plasma, nel sangue o in altri tessuti.

▼M4

Escrezione

44. Il tasso e il grado di escrezione della sostanza somministrata devono essere determinati attraverso la misurazione della percentuale di dose (radioattiva) recuperata dalle urine, dalle feci e dall'aria espirata. Si tratta di dati utili anche per stabilire il bilancio di massa. Le quantità della sostanza (radioattività) in esame eliminate nelle urine, nelle feci e nell'aria espirata devono essere determinate ad intervalli appropriati (cfr. paragrafi da 47 a 49). Gli esperimenti a dosi ripetute devono essere appositamente impostati, in modo da consentire la raccolta di dati sugli escreti sufficienti a raggiungere gli obiettivi stabiliti al paragrafo 26. Ciò consentirà di poterli confrontare con quelli degli esperimenti con dose unica.

45. Se lo studio pilota dimostra che la quantità di sostanza in esame (radioattività) escreta nell'aria espirata non è significativa (secondo il paragrafo 49), per lo studio definitivo non sarà necessario raccogliere l'aria espirata.

46. Ciascun animale viene collocato in un'unità metabolica separata per la raccolta degli escreti (urina, feci, aria espirata). Alla fine di ciascun periodo di raccolta (cfr. paragrafi da 47 a 49), le unità metaboliche vanno risciacquate con un solvente adeguato («acqua di risciacquo») per assicurare il massimo recupero della sostanza in esame (radioattività). La raccolta degli escreti termina in capo a sette giorni o dopo aver recuperato almeno il 90 % della dose, a seconda di quale eventualità si verifica per prima.

47. La quantità totale della sostanza in esame (radioattività) nelle urine dev'essere determinata almeno due volte nel corso della prima giornata di raccolta (una delle quali 24 ore dopo la somministrazione della dose) per poi continuare una volta al giorno fino alla fine dello studio. Per la prima giornata, si raccomanda di optare per più di due momenti di campionamento (ad esempio dopo 6, 12 e 24 ore). I risultati degli studi pilota vanno analizzati per trarre informazioni sull'opportunità di introdurre momenti di raccolta diversi o supplementari. È necessario giustificare la scelta del calendario adottato.

48. La quantità totale della sostanza in esame (radioattività) nelle feci dev'essere determinata una volta al giorno, a partire da 24 ore dopo la somministrazione della dose e fino alla fine dello studio, salvo indicazioni contrarie provenienti dagli studi pilota che suggeriscano di svolgere raccolte più frequenti o in altri momenti. È necessario giustificare la scelta di un calendario alternativo.

49. Se in un determinato studio meno dell'1 % della dose somministrata viene rilevata nell'aria espirata raccolta in un periodo di 24 ore, la raccolta di CO_2 espirata e di altri materiali volatili può essere sospesa.

Studi in funzione del tempo

Cinetica plasmatica/sanguigna

50. Lo scopo di questi studi è di ottenere delle stime relative ai principali parametri tossicocinetici della sostanza in esame [es.: C_{max}, T_{max}, emivita ($t_{1/2}$), AUC]. È possibile svolgere gli studi somministrando una dose unica, ma generalmente se ne somministrano due o più. Le dosi vengono stabilite a seconda della natura e/o dell'oggetto dello studio. I dati cinetici possono essere necessari per risolvere questioni quali la biodisponibilità della sostanza in esame e/o per chiarire gli effetti della dose sull'eliminazione (vale a dire, per chiarire se la saturazione dell'eliminazione dipende o meno dalla dose).

51. Per questo tipo di studi, devono essere usati almeno quattro animali dello stesso sesso per ogni gruppo-dose. È necessario giustificare la scelta del sesso degli animali. Occorre prendere in considerazione l'opportunità di ricorrere ad animali di entrambi i sessi (quattro maschi e quattro femmine) in presenza di dati che suffragano differenze tossicologiche significative legate al sesso.

▼M4

52. Dopo la somministrazione della sostanza (radiomarcata), utilizzare un metodo di campionamento adeguato per prelevare campioni di sangue da ogni animale in momenti idonei. Eventuali potenziali effetti del campionamento ripetuto sulla salute/fisiologia degli animali e/o la sensibilità del metodo analitico potrebbero limitare il volume e il numero di campioni di sangue da prelevare da ciascun animale. Devono essere sottoposti ad analisi campioni provenienti da ogni singolo animale. In determinate circostanze (ad esempio per la caratterizzazione dei metaboliti), può essere necessario raggruppare i campioni provenienti da diversi animali. I campioni raggruppati devono essere chiaramente identificati e occorre fornire una spiegazione per la scelta del raggruppamento. Se si utilizza una sostanza chimica radiomarcata, può essere opportuno determinare la radioattività totale presente. In tal caso, la radioattività totale deve essere analizzata nel sangue intero e nel plasma o nel plasma e negli eritrociti, per poter calcolare il rapporto sangue/plasma. In altre circostanze, potrebbero essere necessari studi più approfonditi che includano l'identificazione del composto progenitore e/o dei metaboliti o la valutazione della fissazione alle proteine.

Altri studi di cinetica tissutale

53. Questi studi si propongono di ottenere informazioni sull'evoluzione nel tempo, per chiarire questioni legate ad aspetti quali il meccanismo dell'azione tossica, il bioaccumulo e la biopersistenza, determinando i livelli della sostanza chimica in esame nei vari tessuti. I tipi di tessuti selezionati e il numero di momenti da sottoporre a valutazione dipenderanno dagli aspetti oggetto dello studio e dalla base dei dati tossicologici disponibili per la sostanza chimica in esame. Il disegno di questi ulteriori studi di cinetica tissutale deve tenere conto delle informazioni raccolte seguendo le indicazioni dei paragrafi da 37 a 40. Gli studi possono essere condotti somministrando una dose unica o dosi ripetute. Occorre fornire una giustificazione dettagliata dell'approccio scelto.

54. Le ragioni che possono giustificare il ricorso a ulteriori studi cinetici comprendono:

— indicazioni di una emivita prolungata nel sangue, che suggeriscono la possibilità di un accumulo della sostanza nei diversi tessuti, oppure

— l'interesse a verificare se è stato raggiunto uno stadio stazionario in determinati tessuti (ad esempio, negli studi a somministrazione ripetuta, sebbene possa sembrare che la concentrazione della sostanza in esame nel sangue abbia raggiunto uno stato apparentemente stazionario, può essere utile confermare se sia stata raggiunta la stessa concentrazione stazionaria anche nei tessuti bersaglio).

55. Per questo tipo di studi in funzione del tempo, occorre somministrare per via orale una dose adeguata della sostanza chimica in esame ad almeno quattro animali, per ciascuna dose e per punto temporale, e sorvegliare l'evoluzione nel tempo della distribuzione nei tessuti selezionati. Si utilizzano animali dello stesso sesso, salvo se si è osservata una tossicità specifica legata al sesso. A seconda dell'oggetto dello studio, si procederà o meno all'analisi della radioattività totale o della sostanza madre e/o dei metaboliti. Utilizzare tecniche idonee per valutare la distribuzione tissutale.

Induzione/Inibizione enzimatica

56. In uno o più dei casi elencati di seguito può essere necessario svolgere studi sui possibili effetti dell'induzione/inibizione enzimatica o della biotrasformazione della sostanza in esame:

1) se alcuni elementi indicano una possibile relazione tra biotrasformazione della sostanza in esame e aumento della tossicità;

2) se i dati sulla tossicità disponibili segnalano una relazione non lineare tra dose e metabolismo;

▼M4

3) se gli studi sull'identificazione dei metaboliti identificano un metabolita potenzialmente tossico che può essere stato prodotto da una via enzimatica indotta dalla sostanza chimica in esame;

4) per spiegare effetti che si presume siano legati a fenomeni di induzione enzimatica;

5) in caso di esperimenti in vitro o in vivo con specie e in condizioni diverse, se vengono osservate alterazioni tossicologiche rilevanti nel profilo metabolico della sostanza in esame, può essere necessario caratterizzare l'enzima o gli enzimi coinvolti (per esempio, enzimi di fase I come gli isoenzimi del sistema della monoossigenasi dipendente dal citocroma P450, enzimi di fase II come gli isoenzimi della uridina difosfato glucoronil-transferasi, o ogni altro enzima pertinente). Queste informazioni possono essere utilizzate per valutare la pertinenza delle specie in causa per le estrapolazioni inter-specie.

57. Per valutare le variazioni tossicocinetiche legate alla sostanza in esame, è necessario utilizzare protocolli di studio adeguati, debitamente convalidati e giustificati. Il disegno dello studio può ad esempio prevedere la somministrazione di dosi ripetute di una sostanza non marcata, seguite da una dose unica radiomarcata somministrata il 14° giorno, oppure la somministrazione di dosi ripetute con una sostanza radiomarcata con campionamenti il 1º, 7° e 14° giorno in modo da determinare il profilo dei metaboliti. La somministrazione di dosi ripetute della sostanza chimica radiomarcata, inoltre, può fornire informazioni sul bioaccumulo (cfr. paragrafo 26).

METODI COMPLEMENTARI

58. Altri metodi, al di là degli esperimenti in vivo descritti in questo metodo di prova, possono fornire informazioni utili su assorbimento, distribuzione, metabolismo o eliminazione delle sostanze chimiche in determinate specie.

Uso dei dati ottenuti in vitro

59. Utilizzando sistemi di prova adeguati è possibile studiare in vitro molti aspetti del metabolismo della sostanza in esame. Si può ricorrere a epatociti isolati di fresco o coltivati, oppure a frazioni subcellulari (es.: microsomi e citosol o frazione S9) epatiche per studiare i possibili metaboliti. Il metabolismo locale nell'organo bersaglio, ad esempio il polmone, può fornire indicazioni interessanti per la valutazione dei rischi. A tal fine, possono essere utili frazioni microsomiali dei tessuti bersaglio. Gli studi che ricorrono ai microsomi possono servire a indagare potenziali differenze dovute al genere o alle fasi di vita e a caratterizzare i parametri enzimatici (K_m e V_{max}) che possono essere d'aiuto nella valutazione della dose-dipendenza del metabolismo rispetto ai livelli di esposizione. Inoltre, i microsomi possono essere utili nell'identificazione degli enzimi microsomiali specifici coinvolti nel metabolismo della sostanza in esame, un aspetto che può rivelarsi importante per le estrapolazioni inter-specie (cfr. anche paragrafo 56). È inoltre possibile esaminare il potenziale di induzione della biotrasformazione utilizzando frazioni subcellulari epatiche (es. microsomi e citosol) di animali pretrattati con la sostanza in questione, attraverso studi di induzione sugli epatociti in vitro o a partire da determinate linee cellulari che esprimono degli enzimi pertinenti. In determinate circostanze e in condizioni adeguate, le frazioni subcellulari provenienti da tessuti umani possono essere prese in considerazione ed essere utilizzate per determinare eventuali differenze tra specie a livello di biotrasformazione. I risultati degli studi in vitro possono essere utili anche per sviluppare modelli tossicocinetici su base fisiologica (5).

▼M4

60. A partire da studi in vitro sull'assorbimento cutaneo, si possono ottenere informazioni supplementari per caratterizzare l'assorbimento (6).

61. È possibile utilizzare colture cellulari primarie da cellule epatiche e campioni tissutali freschi per chiarire questioni simili a quelle studiate ricorrendo a microsomi epatici. In alcuni casi, si potrebbero trovare risposte a determinate questioni utilizzando linee cellulari che esprimano specificamente l'enzima in causa, o linee cellulari geneticamente modificate. In altri casi, può essere utile studiare in vitro l'inibizione e l'induzione di isoenzimi specifici del citocroma P450 (es. CYP1A1, 2E1, 1A2, e altri) e/o di enzimi di fase II, attraverso il composto progenitore. Le informazioni ottenute possono dimostrarsi utili per composti di struttura simile.

Uso di dati tossicocinetici provenienti da studi di tossicità quali informazioni complementari

62. Le analisi di campioni di sangue, tessuti e/o escreti svolte all'interno di altri studi di tossicità possono fornire dati su biodisponibilità, cambiamenti nella concentrazione plasmatica in funzione del tempo (AUC, C_{max}), potenziale di bioaccumulo, tassi di eliminazione e cambiamenti nel metabolismo e nella cinetica legati al genere o alle fasi di vita.

63. Si possono effettuare modifiche a livello di impostazione dello studio per rispondere a domande concernenti: la saturazione delle vie di assorbimento, di biotrasformazione o di escrezione a dosi più elevate; il funzionamento di nuove vie metaboliche a dosi più elevate; la limitazione dei metaboliti tossici, sempre a dosi più elevate.

64. Si possono affrontare anche altre considerazioni legate alla valutazione dei rischi:

— la sensibilità in funzione dell'età, dovuta alle differenze nello stato della barriera emato-encefalica, a livello dei reni e/o delle capacità di detossificazione,

— la sensibilità di determinate sottopopolazioni dovuta a differenze nella capacità di biotrasformazione o ad altre differenze tossicocinetiche,

— il grado di esposizione fetale per trasferimento transplacentare delle sostanze chimiche o l'esposizione neonatale attraverso l'allattamento.

Uso dei modelli tossicocinetici

65. I modelli tossicocinetici possono essere utili per diversi aspetti della valutazione dei rischi e dei pericoli, ad esempio nella previsione dell'esposizione sistemica e della dose trasmessa ai tessuti interni. Inoltre, possono servire per chiarire determinate questioni relative alle modalità d'azione, potendo fungere da base per estrapolazioni interspecie, tra vie di esposizione, tra dosaggi, e per la valutazione dei rischi per l'uomo. Tra i dati utili per l'elaborazione di modelli tossicocinetici su base fisiologica per una sostanza chimica in esame in una determinata specie si trovano: 1) i coefficienti di ripartizione; 2) le costanti biochimiche e i parametri fisiologici; 3) i parametri di assorbimento specifico per via di esposizione; e 4) i dati cinetici in vivo per la valutazione dei modelli [ad esempio i parametri di eliminazione per le vie di escrezione pertinenti (> 10 %) nonché K_m e V_{max} per il metabolismo]. I dati sperimentali usati per elaborare il modello devono essere generati ricorrendo a metodi scientificamente solidi e i risultati ottenuti dall'applicazione del modello devono essere convalidati. Per facilitare l'elaborazione di modelli non compartimentali o a base fisiologica (7) vengono spesso determinati parametri specifici a una sostanza chimica o a una specie in esame, quali i tassi di assorbimento, il coefficiente di ripartizione sangue-tessuto e le costanti di velocità metabolica.

▼M4

DATI E RELAZIONE

66. Si raccomanda di inserire un indice nella relazione.

Corpo della relazione

67. Il corpo della relazione deve includere le informazioni previste dal presente metodo di prova, organizzate nelle sezioni e nei paragrafi descritti di seguito.

Sintesi

68. Occorre esporre sinteticamente l'impostazione dello studio e il metodo usato. È altrettanto necessario evidenziare i risultati principali concernenti il bilancio di massa, la natura e l'importanza dei metaboliti, i residui nei tessuti, il tasso di eliminazione, il potenziale di bioaccumulo, le differenze legate al sesso ecc. La sintesi dev'essere dettagliata a sufficienza da consentire una valutazione dei risultati.

Introduzione

69. In questa sezione si presentano gli obiettivi dello studio, le ragioni alla sua base e l'impostazione sperimentale, come pure i riferimenti pertinenti ed eventuali cenni storici.

Materiali e metodi

70. Vanno descritte in dettaglio tutte le informazioni pertinenti, in particolare:

a) sostanza chimica in esame

È necessario includere l'identificazione del prodotto chimico, che deve comprendere: denominazione chimica, struttura molecolare, composizione chimica qualitativa e quantitativa, grado di purezza chimica e, se possibile, tipo e quantità delle eventuali impurità. Occorre inoltre includere informazioni sulle proprietà fisico-chimiche, incluso stato fisico, colore, grado lordo di solubilità e/o coefficiente di ripartizione, stabilità e, se del caso, corrosività. Se del caso, fornire informazioni sugli isomeri. Se la sostanza chimica è radiomarcata, vanno indicati: il tipo di radionuclide, la posizione della marcatura, l'attività specifica e il grado di purezza radiochimica.

Si deve indicare il tipo o la descrizione dei veicoli, dei diluenti, degli agenti di sospensione e degli emulsionanti o di altri materiali utilizzati per somministrare la sostanza in esame;

b) animali da laboratorio

È necessario fornire informazioni sugli animali utilizzati per la prova, incluse quelle sulla selezione, giustificandola, della specie, del ceppo, dell'età all'inizio dello studio, del sesso, insieme a informazioni su peso corporeo, stato di salute e condizioni di allevamento;

c) metodi

Occorre fornire dettagli sull'impostazione dello studio e sulla metodologia utilizzata, includendo:

1) una giustificazione delle eventuali modifiche alla via e, se del caso, alle condizioni di esposizione;

▼M4

2) una giustificazione della scelta dei livelli della dose;

3) la descrizione degli studi pilota sottesi al disegno sperimentale degli studi di follow-up, se del caso, allegando i dati di supporto provenienti dagli studi pilota;

4) la modalità di preparazione della soluzione somministrata, il tipo di solvente o veicolo, se utilizzato;

5) il numero dei gruppi esposti e il numero degli animali per ciascun gruppo;

6) il livello e il volume delle dosi (e attività specifica in caso di utilizzo di marcatori radioattivi);

7) la o le vie e i metodi di somministrazione;

8) la frequenza di somministrazione;

9) il periodo di digiuno (se del caso);

10) la radioattività totale per animale;

11) la manipolazione degli animali;

12) la raccolta e il trattamento dei campioni;

13) i metodi d'analisi utilizzati per la separazione, quantificazione e identificazione dei metaboliti;

14) i limiti di rivelabilità per i metodi utilizzati;

15) le altre misure e procedure sperimentali utilizzate (inclusa la validazione dei metodi per l'analisi dei metaboliti);

d) analisi statistica

Se per analizzare i risultati degli studi si ricorre all'analisi statistica, la relazione deve includere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma informatico utilizzati, in maniera tale che un revisore o un esperto di statistica indipendente possa rivalutare e ricostruire l'analisi.

Nel caso si ricorra a una modellizzazione sistemica, utilizzando ad esempio modelli tossicocinetici su base fisiologica, la presentazione dei modelli deve includerne una descrizione completa in modo da poterli ricostruire e convalidare in modo indipendente (cfr. paragrafo 65 e l'appendice «Definizioni»).

Risultati

71. I dati vanno riportati sinteticamente in una tabella, con una valutazione statistica idonea e una descrizione. Quelli relativi al conteggio della radioattività devono essere sintetizzati e presentati nel modo più consono allo studio, in genere in microgrammi o milligrammi equivalenti per massa del campione, sebbene sia possibile utilizzare altre unità. In questa sezione della relazione vanno inserite le illustrazioni grafiche dei risultati, la riproduzione dei dati cromatografici e spettrometrici, l'identificazione/quantificazione dei metaboliti e le vie metaboliche proposte, ivi compresa la struttura molecolare dei metaboliti. Inoltre, ove pertinenti, vanno incluse le informazioni elencate di seguito:

1) quantità e recupero percentuale della radioattività nelle urine, nelle feci, nell'aria espirata e nell'acqua di risciacquo delle urine e delle feci dalle gabbie.

— Per gli studi per via cutanea, è inoltre necessario includere i dati sul recupero della sostanza dalla cute trattata e dai lavaggi della cute, i dati relativi alla radioattività residua nella copertura protettiva della pelle e nell'unità metabolica, nonché i risultati dello studio sul lavaggio cutaneo; per ulteriori informazioni, cfr. paragrafi da 74 a 77,

▼M4

— per gli studi per via inalatoria, includere anche i dati sul recupero della sostanza in esame nei polmoni e nei tessuti nasali (8); per ulteriori informazioni, cfr. paragrafo 78;

2) distribuzione nei tessuti, espressa in percentuale della dose somministrata e come concentrazione (microgrammi equivalenti per grammo di tessuto) e rapporti tessuto/sangue o tessuto/plasma;

3) bilancio di materia elaborato per ciascuno studio, che implica l'analisi dei tessuti e degli escreti;

4) concentrazione del plasma e parametri tossicocinetici (biodisponibilità, AUC, C_{max}, T_{max}, eliminazione, emivita) della sostanza dopo la somministrazione attraverso la o le vie di esposizione pertinenti;

5) tasso e grado di assorbimento della sostanza chimica in esame dopo la somministrazione attraverso la o le vie di esposizione pertinenti;

6) quantità della sostanza chimica e dei metaboliti (espressa in percentuale della dose somministrata) raccolta negli escreti;

7) riferimento ai dati sugli animali presentati in allegato per tutti i parametri e gli endpoint misurati (ad esempio, dose somministrata, percentuale di recupero, concentrazioni, parametri tossicocinetici ecc.).

8) grafico sul quale figurano le vie metaboliche proposte e la struttura metabolica dei metaboliti.

Discussione dei risultati e conclusioni

72. In questa sezione della relazione l'autore, o gli autori, devono:

1) proporre la via metabolica, basata sui risultati del metabolismo e sull'eliminazione della sostanza chimica in esame;

2) esaminare le eventuali differenze legate alla specie e al sesso, rispetto all'eliminazione e/o alla biotrasformazione della sostanza chimica in esame;

3) presentare sotto forma di tabella ed esaminare l'identità e l'importanza dei metaboliti, i tassi di eliminazione, il potenziale di bioaccumulo e il livello dei residui tissutali del composto progenitore e/o del o dei metaboliti, oltre a eventuali alterazioni dei parametri tossicocinetici in funzione della dose;

4) integrare in questa sezione eventuali dati tossicocinetici pertinenti, ottenuti nel corso dello svolgimento degli studi di tossicità;

5) fornire una conclusione concisa, giustificata dai risultati dello studio;

6) aggiungere altre sezioni, se necessario.

73. Le eventuali ulteriori sezioni possono servire ad includere informazioni bibliografiche a sostegno degli studi, tabelle, grafici, appendici ecc.

▼M4

VIE DI ESPOSIZIONE ALTERNATIVE

Via cutanea

Esposizione per via cutanea

74. Questa sezione contiene indicazioni specifiche per studi di tossicocinetica sulla sostanza in esame somministrata per via cutanea. Per quanto riguarda l'assorbimento cutaneo, consultare il capitolo B.44 del presente allegato: Assorbimento cutaneo: metodo in vivo (9). Per altri endpoint, quali la distribuzione e il metabolismo, è possibile utilizzare il presente metodo di prova (B.36). Nell'esposizione per via cutanea, è possibile utilizzare uno o più livelli di dose della sostanza chimica in esame. La sostanza chimica in esame (sostanza chimica pura, diluita o formulazione che la contenga, da applicare sulla pelle) deve essere identica (o essere un suo surrogato plausibile) a quella a cui possono essere esposti gli esseri umani o le altre specie bersaglio potenziali. Il livello o i livelli di dose devono essere scelti conformemente a quanto indicato ai paragrafi da 20 a 26 del presente metodo di prova. I fattori di cui tenere conto nella scelta della o delle dosi da somministrare per via cutanea sono la prevista esposizione umana e/o le dosi alle quali è stata osservata tossicità in altri studi di tossicità cutanea. La o le dosi da somministrare per via cutanea devono essere disciolte in un veicolo idoneo e applicate in congrua quantità. Poco prima della prova si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'inizio della prova. Durante le operazioni di taglio o rasatura, si deve badare a non ledere la cute dell'animale per evitarne l'abrasione che potrebbe alterarne la permeabilità. Si dovrà preparare circa il 10 % della superficie corporea per l'applicazione della sostanza in esame. In caso di sostanze altamente tossiche, la superficie può essere inferiore al 10 %, ma deve però essere coperta quanto più possibile da uno strato uniforme e sottile della sostanza. La superficie esposta deve essere la stessa per tutti i gruppi di animali che partecipano alla prova cutanea. Le superfici esposte devono essere protette con una protezione idonea adeguatamente fissata in posizione. Gli animali vanno alloggiati separatamente.

75. È necessario svolgere uno studio sul lavaggio cutaneo per determinare la quantità di dose somministrata che può essere rimossa dalla pelle mediante un lavaggio della superficie esposta con sapone delicato e acqua. Tale studio può essere utilizzato anche per stabilire il bilancio di massa quando la sostanza in esame viene somministrata per via cutanea. Per realizzare questo studio, applicare un dose unica della sostanza su due animali. La scelta del livello della dose va effettuata conformemente a quanto indicato al paragrafo 23 del presente metodo di prova (cfr. anche paragrafo 76 per indicazioni sul tempo di contatto con la pelle). Per valutare l'efficacia della rimozione della sostanza in esame attraverso questo metodo di lavaggio, occorre determinare la quantità di sostanza recuperata nell'acqua di lavaggio.

76. Salvo che la corrosività lo impedisca, una volta applicata, la sostanza chimica in esame va lasciata a contatto della pelle per un minimo di 6 ore. Una volta rimossa la protezione, l'area esposta deve essere lavata seguendo la procedura descritta per lo studio sul lavaggio cutaneo (cfr. paragrafo 75). Analizzare sia la protezione sia l'acqua di lavaggio per determinare la quantità residua della sostanza chimica in esame. Al termine dello studio, gli animali vengono sottoposti a eutanasia, conformemente al riferimento bibliografico (2), e la pelle esposta viene rimossa. Occorre analizzare una sezione idonea della pelle esposta per determinare i residui della sostanza chimica in esame (radioattività).

77. Per la valutazione tossicocinetica dei prodotti farmaceutici può essere necessario ricorrere ad altri protocolli, conformemente agli obblighi normativi applicabili.

▼M4

Via inalatoria

78. Per questo tipo di studi va utilizzata una concentrazione unica (o più concentrazioni, se necessario) della sostanza in esame. La o le concentrazioni devono essere scelte conformemente a quanto indicato ai paragrafi da 20 a 26 del presente metodo di prova. La somministrazione per via inalatoria deve effettuarsi tramite apparecchi che consentono di esporre solo il naso o la testa, in modo da evitare l'assorbimento tramite altre vie d'esposizione (8). Se vengono utilizzate altre condizioni di esposizione per via inalatoria, è necessario giustificare e documentare la scelta. Il periodo di esposizione va indicato (generalmente, si situa tra le 4 e le 6 ore).

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OCSE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Capitolo B.45 del presente allegato, Assorbimento cutaneo: metodo in vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolo B.44 del presente allegato, Assorbimento cutaneo: metodo in vivo.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendice

DEFINIZIONI

Assorbimento: processo o processi tramite i quali una sostanza chimica attraversa i tessuti o vi penetra. L'assorbimento si riferisce a un composto progenitore e a tutti i suoi metaboliti. Non va confuso con «biodisponibilità».

Accumulo (bioaccumulo): aumento, nel corso del tempo, della quantità della sostanza chimica in esame nei tessuti (solitamente tessuti grassi, dopo ripetute esposizioni); se la quantità somministrata della sostanza in esame è maggiore della quantità eliminata, essa si accumula nell'organismo fino anche a raggiungere concentrazioni tossiche.

ADME: sigla che sta per «Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione».

AUC (*Area Under the Curve*, area sotto la curva): area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo» della sostanza in esame. Rappresenta il volume totale della sostanza in esame assorbita dal corpo in un intervallo di tempo predeterminato. In condizioni lineari, l'AUC (da zero a infinito) è proporzionale al volume totale della sostanza in esame assorbita dal corpo, a prescindere dal tasso di assorbimento.

Autoradiografia: (autoradiografia a corpo intero) tecnica utilizzata per determinare qualitativamente e/o quantitativamente la localizzazione tissutale della sostanza radioattiva in esame; utilizza pellicola a raggi X o, più recentemente, immagini digitali su schermi al fosforo per visualizzare molecole o frammenti di molecole radiomarcate, registrando l'irraggiamento emesso all'interno dell'oggetto studiato. Rispetto alla dissezione degli organi, l'autoradiografia quantitativa a corpo intero può comportare dei vantaggi per determinare la distribuzione della sostanza in esame e valutare il recupero globale e la risoluzione del materiale radioattivo nei tessuti. Un vantaggio significativo, per esempio, è rappresentato dal fatto che questa tecnica può essere utilizzata su un modello animale pigmentato per valutare l'eventuale associazione della sostanza in esame con la melanina, che può legarsi ad alcune molecole. Tuttavia, sebbene possa rappresentare un mezzo utile per visualizzare globalmente i siti di fissazione di grande capacità e bassa affinità, questa tecnica può rivelarsi meno efficace per quanto riguarda il riconoscimento di siti bersaglio specifici quali i siti di fissaggio dei recettori per rilevare i quali è necessario ricorrere a risoluzioni e sensibilità relativamente elevate. Quando si ricorre all'autoradiografia, gli esperimenti intesi a determinare il bilancio di massa dei composti somministrati vanno svolti su un gruppo distinto o tramite uno studio distinto rispetto a quello che si concentra sulla distribuzione tissutale, nel quale tutti gli escreti (che possono includere l'aria espirata) e le carcasse intere vengono omogeneizzati e testati tramite conteggio in scintillazione liquida.

Escrezione biliare: escrezione attraverso i dotti biliari.

Bioaccumulo: cfr. «accumulo».

Biodisponibilità: frazione di una dose somministrata che raggiunge la circolazione sistemica o viene resa disponibile nel sito dell'attività fisiologica. Generalmente, la biodisponibilità della sostanza in esame si riferisce al composto progenitore, ma potrebbe riferirsi ai suoi metaboliti. Tiene conto di una sola forma chimica. *NB* biodisponibilità e assorbimento non sono sinonimi. La differenza, ad esempio, tra assorbimento orale (cioè presenza nella parete intestinale e circolazione portale) e biodisponibilità (cioè presenza nel sangue sistemico e nei tessuti) potrebbe derivare, tra le varie possibilità, dalla degradazione chimica dovuta al metabolismo delle pareti intestinali, dall'efflusso verso il lume intestinale o dal metabolismo presistemico nel fegato (10). La biodisponibilità del componente tossico (il composto progenitore o un metabolita) rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione del rischio per gli esseri umani (estrapolazione da dosi basse a dosi alte, estrapolazione da una via all'altra) per poter derivare un valore interno dal NOAEL o dalla BMD esterni (dose applicata). Per studiare gli effetti sul fegato in caso di somministrazione orale, è sufficiente l'assorbimento orale. Tuttavia, per valutare tutti gli altri effetti, escluso quello alla porta d'entrata, il parametro generalmente più affidabile da utilizzare per un'ulteriore valutazione del rischio è rappresentato dalla biodisponibilità e non dall'assorbimento.

▼M4

Biopersistenza: cfr. «Persistenza».

Biotrasformazione: conversione chimica (solitamente enzimatica), all'interno del corpo, della sostanza in esame in una sostanza chimica diversa. Sinonimo di «metabolismo».

C_{max}: concentrazione massima (picco di concentrazione) nel sangue (plasma/siero) dopo la somministrazione, oppure escrezione massima (picco di escrezione) nelle urine o nelle feci dopo la somministrazione.

Velocità di eliminazione (*clearance rate*): misura quantitativa della velocità alla quale una sostanza viene eliminata dal sangue, dal plasma o da un dato tessuto, per unità di tempo.

Compartimento: porzione (o unità) strutturale o biochimica di un corpo, tessuto o cellula, separata dal resto di tale corpo, tessuto o cellula.

Vie di detossificazione: serie di tappe che conducono all'eliminazione delle sostanze tossiche dal corpo, per trasformazione metabolica o per escrezione.

Distribuzione: dispersione di un prodotto chimico e dei suoi derivati attraverso l'organismo.

Enzimi/Isoenzimi: Proteine che catalizzano le reazioni chimiche. Gli isoenzimi sono enzimi che catalizzano reazioni chimiche simili ma si differenziamo nella sequenza degli aminoacidi.

Parametri enzimatici: K_m (costante di Michaelis) e V_{max} (velocità massima).

Escrezione: processo o processi attraverso i quali una sostanza somministrata e/o i suoi metaboliti vengono rimossi dal corpo.

Esogeno: introdotto dall'esterno o prodotto all'esterno dell'organismo o del sistema.

Estrapolazione: inferenza di uno o più valori sconosciuti sulla base di ciò che è conosciuto o è stato osservato.

Emivita ($t_{1/2}$): tempo necessario a ridurre della metà la concentrazione della sostanza in esame in un comparto. Si riferisce generalmente alla concentrazione del plasma o alla quantità della sostanza presente nell'intero corpo.

Induzione/Induzione enzimatica: sintesi degli enzimi in risposta a uno stimolo ambientale o a una molecola induttrice.

Linearità/cinetica lineare: in cinetica si definisce un processo come lineare quando tutte le velocità di trasferimento tra compartimenti sono proporzionali alle quantità o concentrazioni presenti, cioè di primo ordine. Di conseguenza i volumi di eliminazione e di distribuzione sono costanti, allo stesso modo delle emivite. Le concentrazioni ottenute sono proporzionali ai tassi di somministrazione (esposizione) e l'accumulo è più facilmente prevedibile. È possibile valutare la linearità/non linearità attraverso il confronto dei parametri pertinenti, ad esempio l'AUC, dopo la somministrazione di dosi diverse o dopo un'esposizione singola e un'esposizione ripetuta. L'assenza di dose-dipendenza può essere indicativa della saturazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del composto, un aumento dell'AUC dopo esposizione ripetuta rispetto all'esposizione singola può indicare invece l'inibizione del metabolismo e, infine, una riduzione dell'AUC può indicare l'induzione del metabolismo [cfr. anche (11)].

Bilancio di massa: contabilità delle entrate e delle uscite dal sistema della sostanza chimica in esame.

Bilancio di materia: cfr. «bilancio di massa».

▼M4

Meccanismo (Modalità) di tossicità/d'azione: il meccanismo d'azione si riferisce alle interazioni biochimiche specifiche attraverso le quali una sostanza produce il suo effetto. La modalità d'azione si riferisce ai fenomeni più generali attraverso i quali si manifesta la tossicità di una sostanza.

Metabolismo: sinonimo di «biotrasformazione».

Metaboliti: prodotti del metabolismo o dei processi metabolici.

Assorbimento orale: percentuale della dose di sostanza in esame assorbita a partire dal sito di somministrazione (per esempio: tratto gastrointestinale). Si tratta di un parametro fondamentale che può aiutare a comprendere quale frazione della sostanza somministrata raggiunge la vena porta e in seguito il fegato.

Coefficiente di ripartizione: chiamato anche «coefficiente di distribuzione», misura la solubilità differenziale di una sostanza chimica in due solventi.

Concentrazione sanguinea (plasmatica/sierica) massima: concentrazione massima (picco di concentrazione) nel sangue (plasma/siero) dopo la somministrazione (cfr. anche «C_{max}»).

Persistenza (biopersistenza): presenza a lungo termine di una sostanza chimica (in un sistema biologico) dovuta alla sua resistenza alla degradazione/eliminazione.

Metodo read-across: metodo con il quale le informazioni sull'endpoint di una o più sostanze chimiche vengono utilizzate per prevedere l'endpoint della sostanza in esame.

Autoradiografia microscopica dei recettori (microautoradiografia dei recettori): tecnica che può essere utilizzata per studiare l'interazione xenobiotica con popolazioni di cellule o siti tissutali specifici, per esempio nel quadro degli studi sulla fissazione al recettore o sulla modalità d'azione specifica che possono richiedere una qualità di risoluzione e sensibilità impossibile da ottenere con altre tecniche come l'autoradiografia a corpo intero.

Via di somministrazione (per via orale, endovenosa, cutanea, per inalazione ecc.): come le sostanze chimiche vengono somministrate al corpo (es.: per via orale mediante sonda gastrica o mediante dieta, per via cutanea, per inalazione, per endovena ecc.).

Saturazione: stato nel quale uno o più processi cinetici (es.: assorbimento, metabolismo o eliminazione) raggiungono il picco massimo (sono cioè «saturi»).

Sensibilità: capacità di un metodo o di uno strumento di discriminare tra misurazioni corrispondenti a diversi livelli di risposta alla variabile in causa.

Concentrazione sanguinea (plasmatica) allo stato stazionario: stato di non equilibrio di un sistema aperto nel quale tutte le forze che agiscono sul sistema sono perfettamente controbilanciate da forze opposte in modo tale che tutti i componenti del sistema abbiano una concentrazione stazionaria, nonostante al suo interno circoli della materia.

Modellizzazione dei sistemi (modello tossicocinetico su base fisiologica, modello su base farmacocinetica, modello farmacocinetico su base fisiologica, modello su base biologica ecc.): modello astratto che utilizza il linguaggio matematico per descrivere il comportamento di un sistema.

Tessuto bersaglio: tessuto nel quale si manifesta il principale effetto avverso del tossico.

▼M4

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

Distribuzione tissutale: movimento reversibile di una sostanza chimica da un punto a un altro del corpo. La distribuzione tissutale può essere studiata ricorrendo a dissezione, omogeneizzazione, combustione e conteggio in scintillazione liquida di un organo oppure a autoradiografia qualitativa o quantitativa a corpo intero. Il primo metodo è utile per ottenere la concentrazione e la percentuale di recupero nei tessuti e nella carcassa degli stessi animali, ma può fornire una risoluzione insufficiente per tutti i tessuti e raggiungere un recupero globale che è lungi dall'essere ideale (< 90 %). Cfr. «autoradiografia».

T_{max}: tempo necessario a raggiungere C_{max}.

Tossicocinetica (farmacocinetica): studio dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo e dell'escrezione delle sostanze chimiche, nel tempo.

Convalida dei modelli: processo destinato a valutare se un modello descriva convenientemente i dati tossicocinetici disponibili. I modelli possono essere valutati attraverso la comparazione statistica o visiva delle loro predizioni con i valori sperimentali, in funzione di una variabile indipendente comune (ad esempio il tempo). La portata della valutazione dev'essere giustificata in funzione dell'uso che si intende fare del modello.

▼B

B.37. NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE DOPO ESPOSIZIONE ACUTA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosforotioico, fosfonotioico o fosforotioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurotossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Una sostanza di riferimento può essere sagggiata in un gruppo di controllo positivo al fine di dimostrare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la reazione delle specie esaminate non ha subito variazioni significative.

Una sostanza neurotossica di comune utilizzo è il tri-o-tolil fosfato [CAS 78-30-8, E1NECS 201-103-5, nomenclatura CAS: acido fosforico, tris (2-metilfenil)estere], noto anche come tris-o-cresilfosfato.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene somministrata per via orale in un'unica dose a galline eventualmente protette contro effetti colinergici acuti. Gli animali vengono tenuti in osservazione per 21 giorni al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi. A 24 e 48 ore di distanza dalla somministrazione vengono effettuate analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Ventun giorni dopo l'esposizione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

▼B

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.5.1. **Preparazioni**

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

Le gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

Di norma la sostanza in esame viene somministrata per via orale tramite sonda gastrica, capsule di gelatina o un metodo analogo. Le sostanze liquide possono essere somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.5.2. **Condizioni sperimentali**

1.5.2.1. *Animali da esperimento*

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.5.2.2. *Numero e sesso*

Oltre al gruppo da trattare, si utilizzeranno un gruppo di controllo positivo ed uno con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico al primo, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 ore e tre a 48 ore di distanza dalla somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 21 giorni del periodo di osservazione.

Il gruppo di controllo positivo può essere attuale o appartenere a studi recentemente effettuati. Esso comprenderà almeno sei animali trattati con una sostanza neurotossica nota ad effetto ritardato, tre dei quali saranno destinati alle analisi biochimiche e tre all'osservazione. È opportuno procedere ad un aggiornamento periodico dei dati storici. Nuovi dati di controllo positivo dovranno essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio (quale il ceppo, il tipo di alimentazione o le condizioni di alloggiamento degli animali).

▼B

1.5.2.3. *Livelli di dosaggio*

Per la determinazione del livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale si procederà ad uno studio preliminare su un numero adeguato di animali suddivisi in gruppi trattati con diversi livelli di dosaggio. Per una corretta definizione di detto parametro sono generalmente necessari in questa fase preliminare, un certo numero di decessi. Tuttavia, al fine di evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potrà fare ricorso ad atropina o ad un altro agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate. Esistono diversi metodi per la determinazione della dose massima non letale di una sostanza (vedi metodo B.l *bis*). Anche i dati di precedenti studi su galline o altre informazioni tossicologiche possono essere utili a questo scopo.

Il livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale deve essere il più elevato possibile tenendo conto dei risultati ottenuti nello studio preliminare per la determinazione del dosaggio e del limite massimo di 2 000 mg/kg peso corporeo. Indipendentemente dal tasso di mortalità, è indispensabile che un numero sufficiente di animali sopravviva per l'esecuzione delle analisi biochimiche (sei) e dell'esame istologico del ventunesimo giorno (sei). Per evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potranno somministrare atropina o un analogo agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate.

1.5.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite è giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.5.2.5. **Periodo di osservazione**

Il periodo di osservazione avrà una durata di 21 giorni.

1.5.3. **Procedimento**

Dopo aver trattato gli animali con un agente protettivo atto a prevenire effetti colinergici acuti potenzialmente letali, si somministra la sostanza in esame in una singola dose.

1.5.3.1. Osservazioni generali

II periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate diverse volte per i primi 2 giorni e almeno quotidianamente a partire dal terzo fino alla soppressione degli animali, prevista per il ventunesimo giorno. Si registreranno tutti i segni di tossicità, nonché il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata di qualsiasi anomalia del comportamento. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quatro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie o sottoposte ad attività motoria forzata (ad esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

▼B

1.5.3.2. Peso corporeo

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.5.3.3. Biochimica

Pochi giorni dopo l'esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e di controllo negativo e tre appartenenti al gruppo di controllo positivo (se realizzato). Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati a distanza di 24 ore ed altri tre a distanza di 48 ore, mentre le tre galline del gruppo di controllo positivo vengono soppresse dopo 24 ore. Qualora l'osservazione dei segni clinici di intossicazione (spesso valutabili in funzione della comparsa di effetti colinergici) suggerisca che l'eliminazione della sostanza tossica avviene molto lentamente, può essere preferibile effettuare altri due prelievi tissutali da tre animali nel periodo compreso tra 24 e non oltre 72 ore dopo la somministrazione.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE *in vivo*, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

1.5.3.4. Necroscopia macroscopica

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.5.3.5. Esame istopatologico

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelietto (piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombosacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con appositi coloranti specifici per la mielina e gli assoni.

2. **DATI**

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravità di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità.

▼B

I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni.

Animali da esperimento:

— ceppo utilizzato,

— numero e età degli animali,

— origine, condizioni di allogiamento, ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

— modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso,

— motivazione della scelta del veicolo,

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame,

— caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua,

— motivazione della scelta del dosaggio,

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata,

— tipo di agente protettivo e caratteristiche di somministrazione, ove del caso.

Risultati:

— dati relativi al peso corporeo,

— dati relativi alla reazione tossica per ciascun gruppo, compresa la mortalità,

— natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità),

— descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati,

— risultati dell'esame necroscopico,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 418.

▼B

B.38. **NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE STUDIO CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA PER 28 GIORNI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati negativi di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Il presente saggio di neurotossicità ritardata su 28 giorni fornisce informazioni sui rischi che l'esposizione ripetuta per un periodo limitato di tempo può comportare per la salute. Esso consente di trarre indicazioni sulla correlazione dose-risposta e di valutare il NOAEL applicabile per la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione.

Vedi anche introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosforotioico, fosfonotioico o fosforotioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurolossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene quotidianamente somministrata per via orale a galline domestiche per un periodo di 28 giorni. Gli animali vengono esaminati almeno una volta al giorno al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi fino a 14 giorni dopo l'ultima somministrazione. Analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, vengono di norma eseguite 24 e 48 ore dopo l'ultima esposizione su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Due settimane dopo l'ultima somministrazione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1. **Preparazioni**

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

La gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

La sostanza viene somministrata giornalmente, sette giorni su sette, preferibilmente tramite sonda gastrica o capsule di gelatina. Le sostanze liquide possono essere somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.4.2. **Condizioni sperimentali**

1.4.2.1. *Animali da esperimento*

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.4.2.2. *Numero e sesso*

Si utilizzano di norma almeno tre gruppi da trattare ed uno di controllo con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico ai primi, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 e tre a 48 ore di distanza dall'ultima somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 14 giorni del periodo di osservazione.

1.4.2.3. *Livelli di dosaggio*

I livelli di dosaggio dovranno essere selezionati tenendo conto dei risultati del saggio di neurotossicità ritardata dopo esposizione acuta e di tutti i dati di tossicità o di tossicocinetica esistenti per la sostanza in esame. Il livello massimo di dosaggio dovrà essere tale da indurre effetti tossici, preferibilmente effetti neurotossici ritardati, senza tuttavia cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie descrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo.

▼B

1.4.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/-giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.4.2.5. *Periodo di osservazione*

Tutti gli animali saranno esaminati almeno quotidianamente durante il periodo di esposizione e nei 14 giorni successivi, salvo nel caso in cui sia previsto un esame necroscopico.

1.4.3. **Procedimento**

La sostanza in esame viene somministrata sette giorni su sette per un periodo di 28 giorni.

1.4.3.1. *Osservazioni generali*

Il periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per i 28 giorni del trattamento e i 14 giorni successivi, fino al momento della loro soppressione. Si registreranno futi i segni di tossicità, specificandone il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata. Le osservazioni riguarderanno, tra l'altro, eventuali anomalie comportamentali. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quattro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie e sottoposte ad attività motoria forzata (ad esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

1.4.3.2. *Peso corporeo*

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.4.3.3. *Biochimica*

Pochi giorni dopo l'ultima esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e dal gruppo di controllo con somministrazione del solo veicolo. Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati dopo 24 ore ed altri tre dopo 48 ore dall'ultima somministrazione. Qualora ciò risulti preferibile in base ai risultati dello studio con esposizione acuta o di altri studi (ad esempio di tossicocinetica), si potranno modificare i tempi previsti per la soppresisone degli animali. Tale scelta dovrà essere tuttavia scientificamente motivata.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE *in vivo*, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

▼B

1.4.3.4. *Necroscopia macroscopica*

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.4.3.5. *Esame istopatologico*

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelletto (piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombosacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con appositi coloranti specifici per la mielina e gli assoni. L'esame microscopico sarà dapprima effettuato su tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e di quello trattato con il livello massimo di dosaggio. Qualora in questo gruppo si riscontrino effetti, si procederà all'esame microscopico di tessuti prelevati da animali appartenenti agli altri due gruppi (rispettivamente con somministrazione del dosaggio intermedio e del dosaggio minimo).

2. **DATI**

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravita di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità.

I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni.

Animali da esperimento:

— ceppo utilizzato,

— numero e età degli animali,

— origine, condizioni di alloggiamento, ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

▼B

Condizioni sperimentali:

— modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso,

— motivazione della scelta del veicolo,

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame,

— caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua,

— motivazione della scelta del dosaggio,

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata,

— qualora le analisi biochimiche vengano effettuate in tempi diversi da quelli previsti (24 e 48 h), motivazione di tale scelta.

Risultati:

— dati relativi al peso corporeo,

— dati relativi alla reazione tossica per ciascun livello di dosaggio, compresa la mortalità,

— livello di esposizione massimo per il quale non siano stati osservati effetti avversi (NOAEL),

— natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità),

— descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati,

— risultati dell'esame necroscopico,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 419.

▼B

B.39. TEST *IN VIVO* DI SINTESI NON PROGRAMMATA DI DNA (UDS) SU CELLULE EPATICHE DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 486, (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

1.1. INTRODUZIONE

Il saggio *in vivo* della sintesi non programmata di DNA (Unscheduled DNA Synthesis — UDS) su cellule epatiche di mammifero è destinato ad identificare le sostanze che inducono la riparazione del DNA nelle cellule epatiche degli animali trattati [cfr. (1) (2) (3) (4)].

Questo test *in vivo* fornisce un metodo per studiare gli effetti genotossici di sostanze chimiche sul fegato. L'effetto misurato è indice di danno al DNA e successiva riparazione nelle cellule epatiche. Il fegato è di norma la sede principale del metabolismo delle sostanze assorbite. Rappresenta pertanto il sito idoneo per misurare *in vivo* il danno al DNA.

Questo saggio non è idoneo se è evidente che la sostanza in esame non raggiunge il tessuto bersaglio.

La sintesi non programmata dì DNA (UDS) è misurata determinando l'assorbimento di nucleosidi marcati nelle cellule in cui non è in corso una sintesi programmata (fase S) del DNA. La tecnica più comunemente usata è la determinazione mediante autoradiografia dell'assorbimento di timidina marcata con tritio (^{3}H-TdR). Per il test UDS *in vivo* si usa di preferenza il fegato di ratto. Si possono usare anche altri tessuti, ma non sono oggetto del presente metodo.

L'individuazione di una risposta UDS dipende dal numero di basi del DNA escisse e sostituite nel sito danneggiato. Il saggio di UDS pertanto è particolarmente valido per individuare la riparazione di sequenze lunghe (da 20 a 30 basi) indotta dalla sostanza. È molto meno sensibile invece trattandosi di rilevare la riparazione di sequenze corte (1-3 basi). Fenomeni di mutagenesi possono inoltre risultare da mancata riparazione o riparazione difettosa di lesioni del DNA o da errata replicazione. Il grado di risposta di UDS non fornisce alcuna indicazione sulla fedeltà del meccanismo di riparazione. Inoltre un agente mutageno può reagire con il DNA senza che il danno prodotto al DNA sia riparato con un processo di riparazione per escissione. L'impossibilità di ottenere con il saggio UDS informazioni specifiche sull'attività mutagena è compensata dalla sua potenziale sensibilità, in quanto viene misurato nell'intero genoma.

Cfr. anche introduzione generale parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Cellule in riparazione: cellule in cui il numero di grani nucleari netti (NNG) è superiore ad un valore prestabilito, che il laboratorio che effettua il saggio deve motivare.

Grani nucleari netti (NNG): misura quantitativa in autoradiografia dell'attività di UDS delle cellule, calcolata sottraendo il numero medio di grani citoplasmici in aree citoplasmiche equivalenti al nucleo (CG) dal numero di grani nucleari (NG): NNG = NG-CG. I NNG sono conteggiati per le singole cellule, poi sommati per le cellule di una coltura, di colture in parallelo, ecc.

▼B

Sintesi non programmata di DNA (UDS): sintesi di riparazione del DNA dopo escissione e rimozione di un tratto di DNA che contiene una regione danneggiata per effetto di sostanze chimiche o agenti fisici.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il saggio UDS *in vivo* su cellule epatiche di mammifero permette di individuare la sintesi di riparazione del DNA dopo escissione e rimozione di un tratto di DNA contenente una regione che presenta un danno indotto da sostanze chimiche o agenti fisici. Il test è di solito basato sull'incorporazione di ^{3}H-TdR nel DNA di cellule epatiche che presentano una bassa frequenza di cellule nella fase S del ciclo cellulare. La captazione di ^{3}H-TdR è solitamente determinata mediante autoradiografia, non essendo tale tecnica soggetta ad interferenze da parte delle cellule nella fase S, a differenza, ad esempio, del conteggio per scintillazione in fase liquida.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1. **Preparazioni**

1.4.1.1. *Scelta delle specie ammali*

Il ratto è la specie più comunemente usata, ma si può usare qualsiasi specie di mammifero adatta. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dello studio la variazione di peso tra gli animali deve essere minima e non superare ± 20 % del peso medio per sesso.

1.4.1.2. *Condizioni dì stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4. *Sostanze in esame/preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2. **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1. *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilita. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

▼B

1.4.2.2. *Controlli*

Ogni parte dell'esperimento condotta separatamente dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/mezzo disperdente). Gli animali dei vari gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi devono essere effettuati con sostanze che producono UDS *in vivo* a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media. I controlli positivi che richiedono un'attivazione metabolica devono essere usati a dosi che provochino una risposta moderata (4). Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore d'identità dei vetrini codificati. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Fasi di campionamento	Sostanza	N. CAS	N. Einecs
Fasi di campionamento precoci (2-4 ore)	N-Nitrosodimetilammina	62-75-9	200-249-8
Fasi di campionamento tardive (12-16 ore)	N-2-Fluorenilacetammide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Sono ammesse altre sostanze adeguate per i controlli positivi. Il controllo positivo può essere somministrato per una via diversa rispetto alla sostanza in esame.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Numero e sesso degli animali**

Si usi un numero di animali adeguato, per tener conto delle normali variazioni biologiche di risposta al saggio. Ogni gruppo dovrebbe comprendere almeno 3 animali analizzabili. Qualora esista una base di dati precedenti significativa, sono sufficienti 1 o 2 animali per i gruppi di controllo negativo e positivo.

Se al momento dello studio sono disponibili dati relativi a studi sulla stessa specie, nei quali è stata usata la stessa via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare il test su un singolo sesso, preferibilmente sui maschi. Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, ad esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso.

1.5.2. **Protocollo di trattamento**

Le sostanze in esame vengono in generale somministrate in un'unica volta.

1.5.3. **Dosi**

Di norma si usano almeno due dosi. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. In linea di principio la dose inferiore dovrebbe andare dal 50 % al 25 % della dose massima.

▼B

Sostanze con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. Se si procede a uno studio per individuare l'intervallo di dosi, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie e ceppo, con il medesimo protocollo usato nel test principale.

La dose massima può anche essere definita come dose che produce qualche segno di epatotossicità (ad esempio nuclei picnotici).

1.5.4. **Saggio con dose limite**

Se la somministrazione di una dose di almeno 2 000 mg/kg di peso corporeo in una singola presa o in due prese lo stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non c'è ragione di sospettare genotossicità sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, può essere superfluo uno studio completo. Sulla base dell'esposizione umana prevista per la sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5. **Somministrazione delle dosi**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. La via intraperitoneale non è però raccomandata, in quanto potrebbe esporre il fegato alla sostanza in esame direttamente, e non attraverso il sistema circolatorio. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6. **Preparazione delle cellule epatiche**

Di norma le cellule epatiche sono prelevate da animali trattati e preparate 12-16 ore dopo la somministrazione. In genere è necessario un altro prelievo dopo un periodo più breve (di norma da 2 a 4 ore dopo il trattamento), salvo che a 12-16 ore si abbia una risposta positiva chiara. Si possono comunque usare fasi di campionamento diverse se motivate sulla base di dati tossicocinetici.

Le colture a breve termine di cellule epatiche di mammifero sono di solito costituite mediante perfusione del fegato in situ con collagenasi, lasciando poi le cellule epatiche appena dissociate aderire ad una superficie idonea. Le cellule epatiche dei controlli negativi dovrebbero avere una vitalità (5) almeno del 50 %.

1.5.7. **Determinazione dell'UDS**

Le cellule epatiche di mammifero appena isolate sono poste in incubazione, di norma su terreno contenente ^{3}H-TdR, per un periodo adeguato, ad esempio da 3 a 8 ore. Al termine dell'incubazione, si rimuova il terreno dalle cellule, che possono poi essere incubate con terreno contenente un eccesso di timidina non marcata, per ridurre la radioattività non incorporata («cold chase»). Le cellule vengono poi risciacquate, fissate ed essiccate. Per tempi di incubazione più prolungati, la «cold chase» può essere superflua. I vetrini sono immersi in emulsione autoradiografica, esposti al buio (ad esempio refrigerati per 7-14 giorni), sviluppati, colorati; si contano quindi i grani d'argento. Per ogni animale si preparano due o tre vetrini.

▼B

1.5.8. **Analisi**

I preparati su vetrino devono contenere cellule di morfologia normale in numero sufficiente per permettere una valutazione probante dell'UDS. I preparati sono esaminati al microscopio alla ricerca di segni evidenti di citotossicità (ad esempio picnosi, livelli ridotti di radiomarcatura).

Si codifichino i vetrini prima del conteggio dei grani. Di norma si analizzano 100 cellule per animale, su almeno due vetrini. L'analisi di un numero inferiore a 100 cellule per animale deve essere motivato. Nel conteggio dei grani non si tiene conto dei nuclei in fase S, ma si può registrare la percentuale delle cellule in fase S.

Il grado di incorporazione della ^{3}H-TdR nel nucleo e nel citoplasma di cellule morfologicamente normali, messo in evidenza dal deposito di granuli di argento, deve essere determinato mediante metodi adeguati.

Il numero dei grani è determinato sui nuclei (grani nucleari, NG) e su aree del citoplasma equivalenti al nucleo (grani citoplasmici, CG). Il numero dei CG è determinato prendendo in considerazione l'area più densamente marcata del citoplasma, oppure in base alla media di due o più regioni citoplasmiche adiacenti al nucleo, scelte casualmente. Si possono usare altri metodi di conteggio (ad esempio il conteggio delle cellule complete) se motivabili (6).

2. RISULTATI

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si forniscano i dati relativi ai singoli vetrini e ai singoli animali. Inoltre tutti i dati devono essere riassunti in tabelle. Il numero dei grani nucleari netti (NNG) va determinato per ciascuna cellula, per ciascun animale e per ciascuna dose e fase di prelievo sottraendo il numero dei CG dal numero dei NG. Se si contano le «cellule in riparazione», i criteri di definizione delle «cellule in riparazione» devono essere motivati e basati sui dati di controlli negativi precedenti o paralleli. I risultati numerici possono essere valutati mediante metodi statistici. Gli eventuali test statistici devono essere scelti e motivati prima di condurre lo studio.

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Esempi di criteri che permettono di concludere che la risposta è positiva o negativa:

risposta positiva
- i) valori di NNG superiori ad una soglia prestabilita, motivata sulla base di dati di laboratorio precedenti; o
- ii) valori di NNG significativamente maggiori rispetto al controllo parallelo;

risposta negativa
- i) valori di NNG uguali o inferiori alla soglia dei controlli precedenti; o
- ii) valori di NNG non significativamente maggiori rispetto al controllo parallelo.

▼B

Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico; si tenga conto di parametri quali le variazioni intraspecifiche, la relazione dose-risposta e la citotossicità. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali, ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico attore determinante di una risposta positiva.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio *in vivo* su cellule epatiche di mammifero indicano che la sostanza in esame induce nel DNA di cellule epatiche di mammifero *in vivo* un danno che può essere riparato in vitro mediante sintesi non programmata del DNA. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di esperimento, la sostanza in esame non induce nel DNA danni rilevabili mediante questo saggio.

Si vagli la probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti entrino in circolo o raggiungano specificamente il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni.

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente,

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo usato,

— numero, età e sesso degli animali,

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio del test, con range, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni di esperimento:

— controlli positivi e negativi mezzo disperdente/solvente,

— risultati dello studio per individuare l'intervallo di dosi, se effettuato,

— criteri di selezione delle dosi,

— illustrazione paiticolareggiata della preparazione della sostanza in esame,

— illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame,

— criteri di selezione della via di somministrazione,

— metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto bersaglio, se del caso,

▼B

— conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso,

— dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua,

— descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento,

— metodi di misura della tossicità,

— metodo di preparazione e di coltura delle cellule epatiche,

— tecnica autoradiografica usata,

— numero di vetrini preparati e numero di cellule analizzate,

— criteri di valutazione,

— criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— valori medi dei grani nucleari, dei grani citoplasmici, e dei grani nucleari netti per vetrino, per animale e per gruppo,

— relazione dose-risposta, se possibile,

— eventuali analisi statistiche,

— segni di tossicità,

— dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi paralleli,

— dati sui precedenti controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) con intervalli, medie e deviazioni standard,

— numero di «cellule in riparazione», se determinato,

— numero di cellule in fase S, se determinato,

— vitalità delle cellule.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985), An Assessment of the in Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J.C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S.W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M, (eds.), Supplementary Mutagenicily Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidlines for Mulagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madie, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutations Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolateci Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C, Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼B

B.40. CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: TEST DI RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA (TER)

1. METODO

Questo metodo corrisponde alle linee guida OCSE TG 430 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Per corrosione cutanea si intende il manifestarsi di lesioni irreversibili sulla pelle dopo l'applicazione della sostanza che si intende testare (come definita dal Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures (GHS)(1). Il presente metodo prevede una procedura per la valutazione della corrosività che non è condotta su animali vivi.

Tipicamente, la valutazione della corrosività cutanea è effettuata su cavie (2). Gli aspetti connessi al dolore ed alla sofferenza inflitti agli animali ai fini del test di corrosività sono stati affrontati in occasione della revisione del metodo di prova B.4, che consente di determinare la corrosione cutanea tramite metodi alternativi in vitro, evitando la sofferenza degli animali.

Il primo passo verso la definizione di test alternativi atti a studiare la corrosività cutanea a fini regolamentari è stato la realizzazione di studi di prevalidazione (3). Successivamente è stato realizzato (6)-(7)(8) uno studio di validazione formale dei metodi in vitro di valutazione della corrosione cutanea (4)(5). I risultati di questi studi e di altri documenti pubblicati hanno permesso di stabilire che i seguenti test potevano essere utilizzati per valutare la corrosività cutanea *in vivo* (9)(10)(11): il test eseguito su modelli di pelle umana (cfr. il metodo di prova B.40 *bis*) e il test di resistenza elettrica transcutanea (TER, il presente metodo).

I risultati di uno studio di validazione e di altri studi pubblicati indicano che il test di resistenza elettrica (TER) condotto sui ratti (12)(13) è in grado di discriminare in modo affidabile, tra le sostanze conosciute, quelle che sono corrosive e non corrosive per la pelle (5)(9).

Il test descritto nel presente metodo permette di identificare le sostanze e i composti chimici corrosivi. Permette inoltre l'identificazione delle sostanze e dei composti non corrosivi se sostenuto da molte prove basate su altre informazioni esistenti (ad esempio, pH, relazioni struttura/attività, dati relativi agli esseri umani e/o agli animali) (1)(2)(11)(14). Non fornisce informazioni pertinenti sull'irritazione cutanea, né permette la sottocategorizzazione delle sostanze corrosive conformemente al sistema armonizzato universale di classificazione (GHS) (1).

Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della cute, si raccomanda di applicare la strategia di test sequenziale allegata al metodo di prova B.4 (2) e descritta nel sistema armonizzato universale (1). Detta strategia sperimentale comporta la realizzazione di test in vitro volti a determinare la corrosione cutanea (come descritta nel presente metodo) e l'irritazione cutanea prima di prevedere la conduzione di test su animali vivi.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Corrosione cutanea *in vivo*: è il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza di prova per non più di quattro ore. Le reazioni corrosive sono caratterizzate da ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, alla fine dell'osservazione, il giorno 14, da alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie effettuare eventualmente un esame istopatologico.

Resistenza elettrica transcutanea (TER): misurazione dell'impedenza elettrica della pelle, come valore di resistenza espressa in kΩ (kilo-ohm). Si tratta di un metodo al contempo semplice ed affidabile per valutare la funzione di barriera tramite la registrazione del passaggio di ioni attraverso la pelle per mezzo di un ponte di Wheatstone.

1.3. SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento

Denominazione	N. Einecs	N. CAS	
1,2-diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Fortemente corrosivo
Acido acrilico	201-177-9	79-10-7	Fortemente corrosivo
2-tert-butilfenolo	201-807-2	88-18-6	Corrosivo
Idrossido di potassio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivo
Acido solforico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivo
Acido ottanoico (caprilico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivo
4-amino-1,2,4-triazolo	209-533-5	584-13-4	Non corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Non corrosivo
Fenetil bromuro	203-130-8	103-63-9	Non corrosivo
Tetracloroetilene	204-825-9	27-18-4	Non corrosivo
Acido isostearico	250-178-0	30399-84-9	Non corrosivo
4-(metiltio)-benzaldeide	222-365-7	3446-89-7	Non corrosivo

La maggior parte delle sostanze chimiche sopra elencate proviene dall'elenco delle sostanze chimiche selezionate per lo studio di validazione internazionale di ECVAM (4). Detta selezione si basa sui criteri seguenti:

i) ugual numero di sostanze corrosive e non corrosive;

▼B

ii) sostanze disponibili in commercio, rappresentanti la maggior parte delle classi chimiche pertinenti;

iii) l'inclusione di sostanze fortemente corrosive e meno corrosive ai fini della discriminazione in base al potere corrosivo;

iv) selezione di sostanze chimiche che possono essere trattate in laboratorio senza presentare altri rischi gravi oltre alla corrosività.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova è applicata per non più di 24 ore sulla superficie epidermica di dischi di tessuto cutaneo in un sistema di test a due compartimenti nel quale i dischi di tessuto cutaneo fungono da separatori tra i compartimenti. I dischi di tessuto cutaneo sono prelevati da ratti di 28-30 giorni, soppressi con metodi non cruenti. Le materie corrosive sono individuate in base alla loro capacità di comportare una perdita dell'integrità dello strato corneo normale e della funzione di barriera, che si misura come riduzione della TER al di sotto di un livello soglia (12). Per la TER dei ratti, un valore limite di 5 kΩ è stato scelto sulla base di molti dati relativi ad un elevato numero di sostanze chimiche per le quali la maggior parte dei valori era nettamente superiore (spesso > 10 kΩ), o nettamente inferiore (spesso < 3 kΩ) a tale valore (12). In generale, le sostanze che non sono corrosive per gli animali ma che sono irritanti o non irritanti non comportano una riduzione della TER al di sotto di tale valore limite. Inoltre, l'utilizzo di altre preparazioni cutanee o di altre attrezzature può alterare il valore limite, rendendo necessaria in tal caso una validazione supplementare.

La procedura sperimentale include una sequenza relativa alla fissazione del colorante al fine di confermare i risultati positivi del TER con valori attorno a 5 kΩ. Tale sequenza determina se l'aumento della permeabilità ionica è dovuto alla distruzione fisica dello strato corneo. È stato dimostrato che il metodo TER su pelle di ratto permetteva di predire la corrosività *in vivo* nel coniglio valutato con il metodo di prova B.4 (2). Giova osservare che il test *in vivo* sul coniglio è estremamente conservativo per quanto riguarda la corrosività cutanea e l'irritazione cutanea rispetto al test sul tessuto cutaneo umano (15).

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO

1.5.1. **Animali**

I ratti sono la specie di elezione, giacché la sensibilità della loro pelle alle sostanze chimiche utilizzate nel test è stata già dimostrata (10). L'età (al momento in cui la cute è prelevata) ed il ceppo del ratto sono particolarmente importanti perché si deve essere sicuri che i follicoli piliferi siano in fase d'inattività, prima dell'inizio della crescita dei peli adulti.

▼B

I peli della zona dorsale e laterale di giovani ratti maschi o femmine di circa 22 giorni (Wistar o ceppo comparabile) sono rimossi con cura per mezzo di piccole forbici. Gli animali sono successivamente lavati con cura mediante pezze bagnate e la zona rimossa è immersa in una soluzione antibiotica (contenente, ad esempio, streptomicina, penicillina, cloramfenicolo e amfotericina a concentrazioni efficaci per inibire la crescita batterica). Gli animali sono nuovamente lavati con antibiotici il terzo o il quarto giorno dopo il primo lavaggio e sottoposti al test entro 3 giorni dal secondo lavaggio, quando lo strato corneo si è rimesso dalla rimozione dei peli.

1.5.2. **Preparazione dei dischi di tessuto cutaneo**

Gli animali sono uccisi in modo non cruento quando hanno 28-30 giorni. La pelle dorso-laterale di ciascun animale è successivamente rimossa ed accuratamente liberata da qualsiasi eccesso di grasso sottocutaneo. Vengono rimossi dischi di tessuto cutaneo del diametro di circa 20 mm. Il tessuto cutaneo potrà essere conservato prima dell'utilizzo dei dischi se i dati dei controlli positivi e negativi risultano equivalenti a quelli ottenuti sul tessuto cutaneo fresco.

Ciascun disco di tessuto cutaneo è posto su una delle estremità di un tubo di politetrafluoroetilene (PTFE), con la superficie epidermica a contatto con il tubo. Dopo aver fissato il disco all'estremità del tubo con un anello di tenuta toroidale in gomma, si elimina la parte eccedentaria del tessuto. Le dimensioni del tubo e del giunto toroidale sono indicate nella figura 2. L'anello toroidale di gomma viene quindi fissato con cura all'estremità del tubo per mezzo di vaselina. Il tubo è posizionato con una pinza a molla all'interno in un cilindro contenente una soluzione di 154 mM di $MgSO_4$ (figura 1). Il disco cutaneo deve essere interamente sommerso nella soluzione di $MgSO_4$. È possibile ottenere fino a 10-15 dischi di tessuto cutaneo dalla pelle di un solo ratto.

Prima di cominciare le prove, misurare la resistenza elettrica di due dischi cutanei per controllare la qualità della pelle di ciascun animale. I due dischi devono dare valori di resistenza superiori a 10 kΩ affinché gli altri dischi possano essere utilizzati per il test. Se il valore di resistenza è inferiore a 10 kΩ, gli altri dischi della stessa cute devono essere eliminati.

1.5.3. **Applicazione delle sostanze di prova e delle sostanze di controllo**

Controlli positivi e negativi concorrenti devono essere utilizzati per ciascuno studio in modo da garantire un'adeguata prestazione del metodo di prova. Devono essere utilizzati dischi di tessuto cutaneo provenienti da un unico animale. Le sostanze proposte per i controlli positivi e negativi sono, rispettivamente, l'acido cloridrico 10 M e l'acqua distillata.

La sostanza di prova liquida (150 μL) è applicata uniformemente sulla superficie epidermica all'interno del tubo. Per il test di sostanze solide, si applica in modo uniforme sul disco di tessuto cutaneo una quantità sufficiente di sostanza in modo da coprire la totalità della superficie dell'epidermide. Dopo avere aggiunto l'acqua deionizzata (150 μL) sulla sostanza solida, agitare delicatamente il tubo. Per ottenere il massimo contatto con la pelle, può risultare necessario riscaldare i solidi a 30 °C per sciogliere o rammollire la sostanza di prova o macinarli per ottenere grani o polveri.

▼B

Tre dischi di pelle sono utilizzati per ciascuna sostanza di prova e di controllo. La sostanza di prova è applicata per 24 ore a 20-23 °C, quindi rimossa con un getto d'acqua corrente a 30 °C fino alla sua completa rimozione.

1.5.4. **Misurazione della TER**

L'impedenza cutanea è determinata misurando la TER per mezzo di un ponte Wheatstone a basso voltaggio e corrente alternata (13). Le specificazioni generali del ponte sono una tensione operativa di 1-3 V, una corrente alternata sinusoidale o rettangolare di 50-1 000 Hz ed un intervallo di misurazione di almeno 0,1-30 kΩ. Il ponte utilizzato nello studio di validazione misura l'induttanza, la capacitanza e la resistenza fino a valori di 2 000 H, 2 000 μF e 2 MΩ, rispettivamente, a frequenze di 100 Hz o 1 kHz, utilizzando valori in serie o paralleli. Ai fini della TER, le misurazioni dei test di corrosività sono registrate in resistenza ad una frequenza di 100 Hz utilizzando valori in serie. Prima di misurare la resistenza elettrica, la tensione di superficie della pelle è ridotta aggiungendo un volume di etanolo al 70 % sufficiente a coprire l'epidermide. Dopo alcuni secondi, l'etanolo è rimosso dal tubo ed il tessuto è idratato con l'aggiunta di 3 mL di soluzione di $MgSO_4$ (154 mM). Gli elettrodi del ponte di misurazione sono posizionati su entrambi i lati del disco cutaneo per misurare la resistenza in kΩ/disco di tessuto cutaneo (figura 1). Le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza dell'elettrodo esposto al di sotto dei morsetti a coccodrillo sono indicate nella figura 2. Il morsetto attaccato all'elettrodo interno è posto sulla parte superiore del tubo durante la misurazione della resistenza, affinché la lunghezza dell'elettrodo immerso nella soluzione di $MgSO_4$ resti costante. L'elettrodo esterno è posizionato all'interno del cilindro in modo tale da posarsi sul fondo dello stesso. La distanza tra la pinza a molla e la parte inferiore del tubo deve rimanere costante (figura 2), poiché tale distanza influenza il valore di resistenza che si ottiene. Di conseguenza, la distanza tra l'elettrodo interno ed il disco di tessuto cutaneo deve essere costante e minima (1-2 mm).

Se la misurazione della resistenza dà un valore superiore a 20 kΩ, ciò può essere dovuto ad un residuo della sostanza di prova che copre la superficie epidermica del disco di tessuto cutaneo. Un tentativo di rimozione della sostanza può essere effettuato, ad esempio, turando ermeticamente il tubo con il pollice inguantato ed agitandolo per 10 secondi circa; la soluzione di $MgSO_4$ viene così completamente rimossa e la misurazione della resistenza è ripetuta con una nuova soluzione di $MgSO_4$.

Le proprietà e le dimensioni dell'apparecchiatura e la procedura sperimentale utilizzate possono influenzare i valori della TER che si ottengono. La soglia di corrosività è stata fissata a 5 kΩ sulla base di dati ottenuti con l'apparecchiatura e la procedura sperimentale specifiche descritte nel presente metodo. Possono essere applicati diversi valori limite e di controllo nel caso in cui le condizioni sperimentali siano alterate o sia utilizzata una diversa attrezzatura. Pertanto, si raccomanda di calibrare la metodologia ed i valori limite di resistenza provando una serie di sostanze standard di riferimento scelte fra le sostanze chimiche utilizzate nello studio di validazione (4)(5) o fra classi di sostanze chimiche simili a quelle studiate. Un elenco di idonee sostanze chimiche di riferimento è proposto nella tabella 1.

▼B

1.5.5. **Metodi di fissazione del colorante**

L'esposizione ad alcune sostanze non corrosive può comportare una diminuzione della resistenza al di sotto del valore soglia di 5 kΩ e permettere il passaggio di ioni attraverso lo strato corneo riducendo in tal modo la resistenza elettrica (5). Ad esempio, le sostanze organiche neutre e le sostanze tensioattive (compresi detergenti, emulsionanti ed altri agenti di superficie) può eliminare i lipidi della cute rendendo in tal modo la barriera più permeabile agli ioni. Di conseguenza, se i valori della TER delle sostanze di prova sono inferiori o all'incirca di 5 kΩ in mancanza di lesioni visive, si deve effettuare una valutazione della penetrazione del colorante sui tessuti di controllo ed i tessuti trattati per determinare se i valori della TER ottenuti sono il risultato della maggiore permeabilità della cute o della corrosione cutanea (3)(5). In caso di corrosione cutanea con danno dello strato corneo, il colorante sulforodamina B, quando applicato sulla pelle, penetra rapidamente e colora il tessuto sottostante. Questo colorante è stabile con un'ampia gamma di sostanze chimiche e non è influenzato dal procedimento di estrazione descritto di seguito.

1.5.5.1. *Applicazione ed eliminazione del colorante sulforodamina B*

Al termine della valutazione della TER, il solfato di magnesio è rimosso dal tubo ed il tessuto cutaneo è esaminato con cura in cerca di lesioni manifeste. Se non ci sono importanti lesioni manifeste, 150 µL di una diluizione al 10 % (p/v) di colorante sulforodamina B (rosso acido 52; n. Einecs 222-529-8; n. CAS 3520-42-1) in acqua distillata sono applicati sulla superficie epidermica di ogni disco di tessuto cutaneo per 2 ore. Questi dischi di tessuto vengono successivamente lavati con un getto d'acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi in modo da eliminare il colorante eccedentario/non fissato. Ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso attentamente dal tubo e messo in una fiala (ad esempio, una fiala a scintillazione in vetro di 20 mL) contenente acqua deionizzata (8 mL). Agitare delicatamente le fiale per 5 minuti fino ad eliminare qualsiasi eccesso di colorante non fissato. Dopo aver ripetuto la procedura di risciacquo, i dischi di tessuto cutaneo sono rimossi e inseriti in fiale contenenti 5 ml di sodio dodecil solfato (SDS) al 30 % (p/v) in acqua distillata, quindi incubati per una notte a 60 ºC.

In seguito all'incubazione, ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso e scartato e la soluzione restante è centrifugata per 8 minuti a 21 ºC (forza centrifuga relativa ~175 × g). Un campione di 1 mL di supernatante è in seguito diluito in rapporto 1:5 (v/v) (cioè 1 mL + 4 mL) con SDS al 30 % (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (OD) della soluzione è misurata a 565 nm.

1.5.5.2. *Calcolo del tasso di colorante*

Il tasso di sulforodamina B in ciascun disco è calcolato sulla base dei valori di OD (5) (coefficiente di estinzione molare della sulforodamina B a 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; peso molecolare = 580). Il tenore di colorante è determinato per ciascun disco di tessuto cutaneo per mezzo di un'idonea curva di taratura. Un tenore medio è quindi calcolato per le prove ripetute.

2. **DATI**

I valori di resistenza (kΩ) e, eventualmente, i valori di tasso medio del colorante (µg/disco), per la sostanza di prova ed i controlli positivi e negativi sono presentati sotto forma di tabella (dati relativi ai singoli test e medie ± D.S.), compresi i dati dei test ripetuti/replicati ed i valori medi ed individuali.

▼B

2.1. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I valori medi della TER sono accettati se i valori dei controlli positivi e negativi effettuati in parallelo si situano entro gli intervalli accettabili di valori per il metodo utilizzato nel laboratorio di prova. Gli intervalli accettabili di resistenza per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono indicati nella tabella seguente:

Controllo	Sostanza	Intervallo di resistenza (kΩ)
Positivo	10 M acido cloridrico	0,5-1,0
Negativo	Acqua distillata	10-25

I valori medi della fissazione del colorante sono accettati a condizione che i valori dei controlli effettuati in parallelo si situino entro gli intervalli accettabili per il metodo. Gli intervalli accettabili di tasso colorante per le sostanze di controllo proposte per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Intervallo di tasso di colorante (μg/disco)
Positivo	10 M acido cloridrico	40-100
Negativo	Acqua distillata	15-35

La sostanza di prova è considerata non corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza di prova è superiore a 5 k; o

ii) se il valore medio della TER è inferiore o uguale a 5 kΩ; e se

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta, e

— il tasso medio di colorante del disco è nettamente inferiore a quello del controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo.

La sostanza di prova è considerata corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER è inferiore o uguale a 5 kΩ e se il disco di tessuto cutaneo presenta lesioni manifeste; o

ii) se il valore medio della TER è inferiore o uguale a 5 kΩ, e se

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta, ma soltanto

— il tasso medio di colorante del disco è maggiore o uguale a quello del controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo.

▼B

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere le informazioni seguenti.

Sostanze di prova e sostanze di controllo:

— denominazioni chimiche, quali i nomi IUPAC o CAS ed il numero CAS, se conosciuti,

— purezza e composizione della sostanza o della preparazione (in percentuale ponderale), natura fisica,

— proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali la natura fisica, il pH, la stabilità e la solubilità nell'acqua,

— trattamento delle sostanze di prova/di controllo prima del test, se necessario (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità, se conosciuta.

Cavie:

— ceppo e sesso utilizzati,

— età degli animali in caso d'utilizzo come animali donatori,

— origine, condizione d'alloggio, alimentazione, ecc.,

— dettagli sulla preparazione della pelle.

Condizioni di prova:

— curve di taratura dell'apparecchiatura di test,

— curve di taratura delle prestazioni del test di fissazione del colorante,

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per le misurazioni della TER,

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per la valutazione della fissazione del colorante, se del caso,

— descrizione di qualsiasi modifica delle procedure sperimentali;

— descrizione dei criteri di valutazione utilizzati.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati derivati dal test della TER e dal test di fissazione del colorante (se del caso) per i singoli animali e singoli campioni di pelle,

— descrizione di tutti gli effetti osservati.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://-www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., e Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483-524.

(6) OCSE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., e Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

(9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/-epiddocs/epis_brd.pdf.

(11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An in vitro skin corrosivity test-modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial. Toxic. in Vitro 6, 191-194.

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

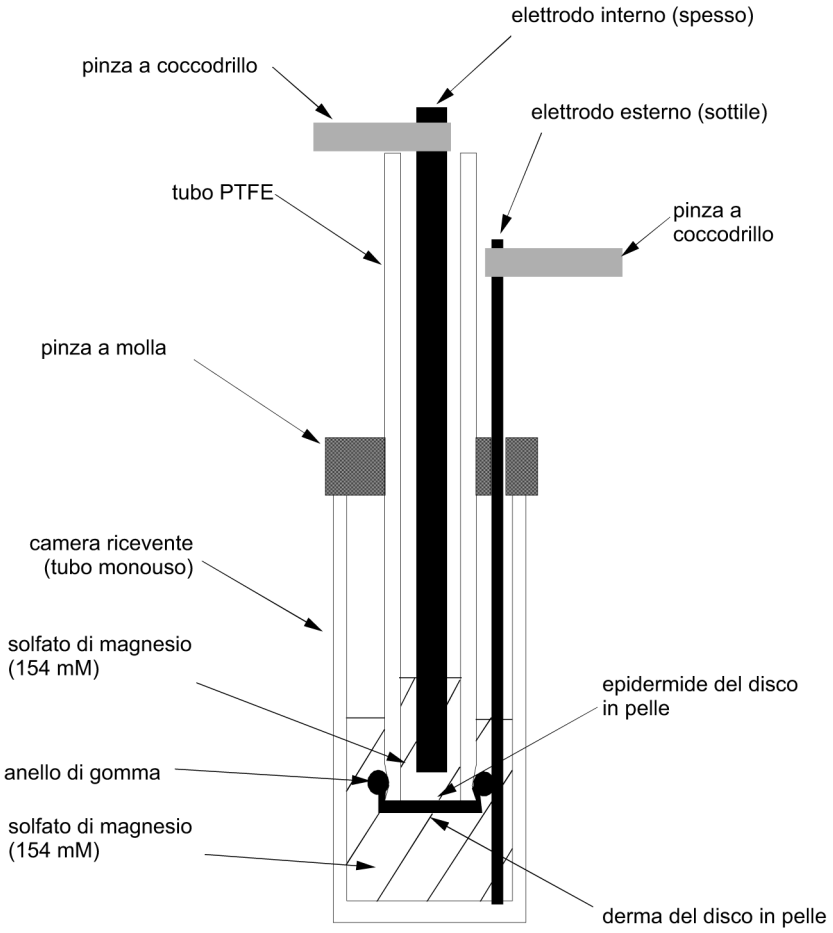
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin- corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7-17.

▼B

Figura 1

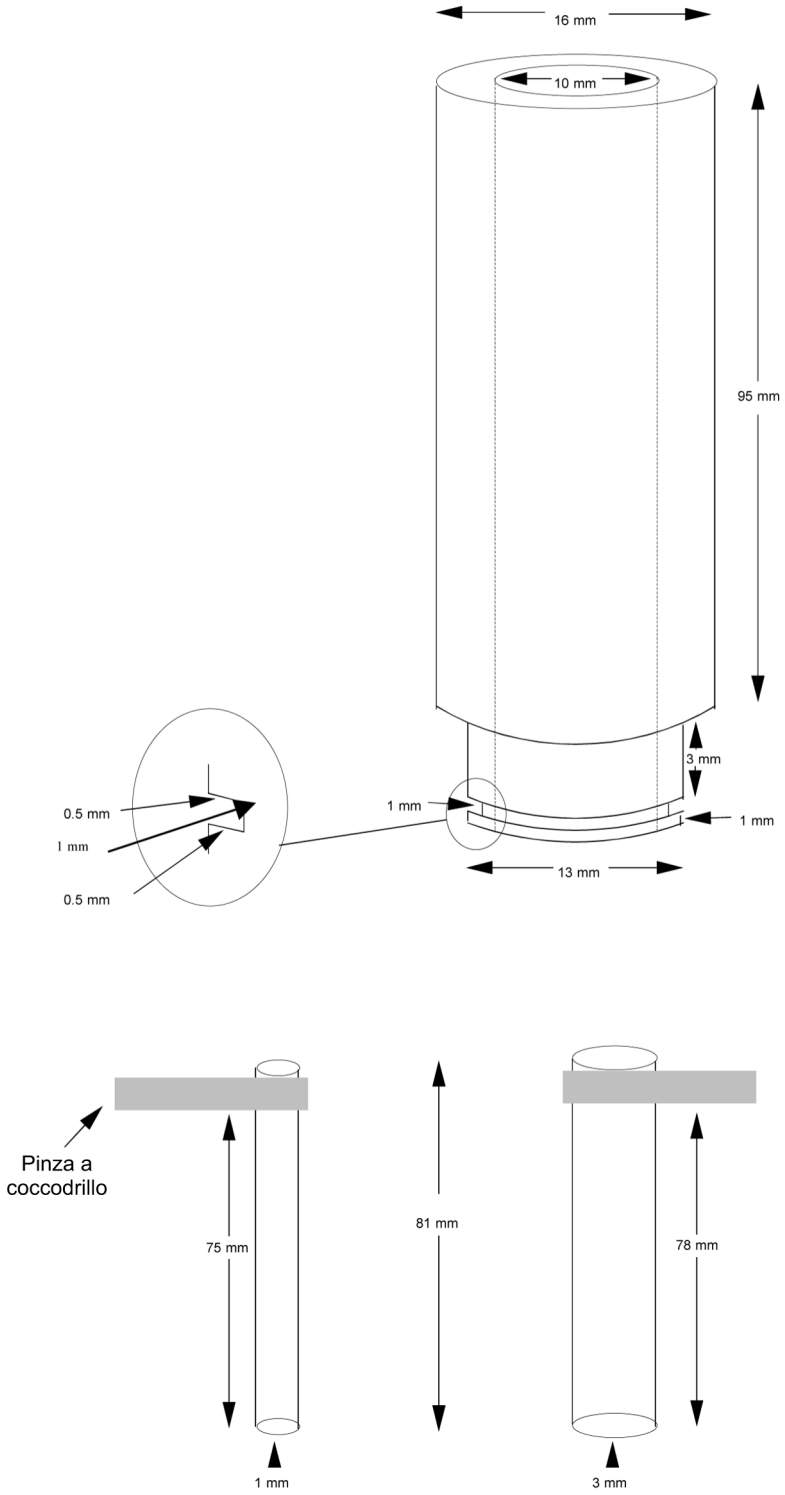
Attrezzatura per il test di resistenza elettrica transcutanea (TER) su tessuti cutanei di ratto



▼B

Figura 2

Dimensioni del tubo in polietrafluoroetilene (PTFE), del cilindro contenitore e degli elettrodi utilizzati



▼B

Fattori critici dell'attrezzatura sopra descritta:

— diametro interno del tubo PTFE,

— lunghezza degli elettrodi relativi al tubo PTFE e al cilindro contenitore, di modo che il disco di tessuto cutaneo non è in contatto con gli elettrodi e che una lunghezza standard dell'elettrodo sia in contatto con la soluzione MgSO4,

— la quantità della soluzione MgSO4 nel cilindro contenitore dovrebbe essere tale che la profondità del liquido, relativo al livello nel tubo PFTE, appaia come indicato nella figura 1,

— il disco di tessuto cutaneo deve essere fissato accuratamente al tubo PFTE, di modo che la resistenza elettrica sia una misura reale delle proprietà del tessuto cutaneo.

▼B

B.40 *BIS.* CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: TEST SU MODELLI DI PELLE UMANA

1. METODO

Il presente metodo corrisponde alle linee guida OCSE TG 431 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Per corrosione cutanea si intende il manifestarsi di lesioni irreversibili sulla pelle dopo l'applicazione della sostanza che si intende testare (come definita dal Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures (GHS)(1). Il presente metodo non prevede l'utilizzo di animali vivi o di tessuti animali ai fini della valutazione della corrosività cutanea.

Tipicamente, la valutazione della corrosività cutanea è effettuata su cavie (2). Gli aspetti connessi al dolore ed alla sofferenza inflitti agli animali ai fini del test di corrosività sono stati affrontati in occasione della revisione del metodo di prova B.4, che consente di determinare la corrosione cutanea tramite metodi alternativi in vitro, evitando la sofferenza degli animali.

Il primo passo verso la definizione di test alternativi atti a studiare la corrosività cutanea a fini regolamentari è stato la realizzazione di studi di prevalidazione (3). Successivamente è stato realizzato (6)-(7)(8) uno studio di validazione formale dei metodi in vitro di valutazione della corrosione cutanea (4)(5). I risultati di questi studi e di altri documenti pubblicati (9) hanno permesso di stabilire che i seguenti test potevano essere utilizzati per valutare la corrosività cutanea *in vivo* (10)(1 1)(12)(13): il test eseguito su modelli di pelle umana (cfr. il presente metodo) e il test di resistenza elettrica transcutanea (TER, il metodo di prova B.40).

I risultati degli studi di validazione indicano che i test basati sui modelli di pelle umana (3)(4)(5)(9) sono in grado di discriminare in modo affidabile, tra le sostanze conosciute, quelle che sono corrosive e non corrosive per la pelle. Il presente metodo di prova è altresì in grado di fornire un'indicazione sulla distinzione fra le sostanze che presentano un diverso grado di corrosività.

Il test descritto nel presente metodo permette di identificare le sostanze e i composti chimici corrosivi. Permette inoltre l'identificazione delle sostanze e dei composti non corrosivi se sostenuto da molte prove basate su altre informazioni esistenti (ad esempio, pH, relazioni struttura/attività, dati relativi agli esseri umani e/o agli animali) (1)(2)(13)(14). In generale, non fornisce adeguate informazioni sull'irritazione cutanea, né permette la sottocategorizzazione delle sostanze corrosive conformemente al sistema armonizzato universale di classificazione (GHS) (1).

Ai fini di una completa valutazione degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della cute, si raccomanda di applicare la strategia di test sequenziale indicata nell'allegato al metodo di prova B.4 (2) e descritta nel sistema armonizzato universale (GHS)(1). Detta strategia sperimentale comporta la realizzazione di test in vitro volti a determinare la corrosione cutanea (come descritta nel presente metodo) e l'irritazione cutanea prima di prevedere la conduzione di test su animali vivi.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Corrosione cutanea *in vivo*: è il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza di prova per non più di quattro ore. Le reazioni corrosive sono caratterizzate da ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, alla fine dell'osservazione, il giorno 14, da alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie effettuare eventualmente un esame istopatologico.

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule (ad esempio, capacità delle deidrogenasi mitocondriali cellulari di ridurre il colorante vitale MTT), che, in funzione del parametro misurato e del tipo di test utilizzato, corrisponde al numero totale e/o alla vitalità delle cellule.

1.3. SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento

Denominazione	N. Einecs	N. CAS	
1,2-diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Fortemente corrosivo
Acido acrilico	201-177-9	79-10-7	Fortemente corrosivo
2-tert-butilfenolo	201-807-2	88-18-6	Corrosivo
Idrossido di potassio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivo
Acido solforico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivo
Acido ottanoico (caprilico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivo
4-amino-1,2,4-triazolo	209-533-5	584-13-4	Non corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Non corrosivo
Fenetil bromuro	203-130-8	103-63-9	Non corrosivo
Tetracloroetilene	204-825-9	27-18-4	Non corrosivo
Acido isostearico	250-178-0	30399-84-9	Non corrosivo
4-(metiltio)-benzaldeide	222-365-7	3446-89-7	Non corrosivo

La maggior parte delle sostanze chimiche sopra elencate proviene dall'elenco delle sostanze chimiche selezionate per lo studio di validazione internazionale di ECVAM (4). Detta selezione si basa sui criteri seguenti:

i) ugual numero di sostanze corrosive e non corrosive;

ii) sostanze disponibili in commercio, rappresentanti la maggior parte delle classi chimiche pertinenti;

iii) l'inclusione di sostanze fortemente corrosive e meno corrosive ai fini della discriminazione in base al potere corrosivo;

▼B

iv) selezione di sostanze chimiche che possono essere trattate in laboratorio senza presentare altri rischi gravi oltre alla corrosività.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova è applicata localmente su un modello tridimensionale di pelle umana che comprende almeno un'epidermide ricostituita con uno strato corneo funzionale. Le sostanze corrosive sono individuate in base alla loro attitudine a ridurre la vitalità cellulare [determinata, ad esempio, tramite test di riduzione del MTT (15)] al di sotto di valori limite definiti per periodi di esposizione determinati. Il principio del test si basa sull'ipotesi secondo la quale le sostanze chimiche corrosive sono capaci di penetrare nello strato corneo per diffusione o erosione e sono citotossiche per gli strati cellulari sottostanti.

1.4.1. **Procedura**

1.4.1.1. *Modelli di pelle umana*

I modelli di pelle umana possono essere costruiti, acquistati in commercio (ad esempio, i modelli EpiDerm™ ed EPISKIN™) (16)(17)-(18)(19) oppure sviluppati o costruiti nel laboratorio di prova (20)-(21). Com'è generalmente riconosciuto, l'utilizzo di pelle umana forma l'oggetto di considerazioni etiche ed è subordinato a condizioni nazionali ed internazionali. Qualsiasi nuovo modello deve essere validato (almeno nella misura descritta al punto 1.4.1.1.2). I modelli di pelle umana utilizzati nel presente test devono soddisfare i criteri seguenti.

1.4.1.1.1 Condizioni generali dei modelli:

Per costruire l'epitelio devono essere utilizzati cheratinociti d'origine umana. Devono essere presenti molteplici strati di cellule epiteliali vitali sotto lo strato corneo funzionale. Il modello di pelle umana può anche avere uno strato stromale. Lo strato corneo deve presentare una molteplicità di strati con il necessario profilo lipidico per produrre una barriera funzionale solida capace di resistere alla penetrazione rapida dei marcatori citotossici. Le proprietà di contenimento del modello devono impedire il passaggio delle sostanze dallo strato corneo verso i tessuti vitali. Il passaggio delle sostanze chimiche da testare dallo strato corneo potrebbe infatti dare origine a modelli di esposizione cutanea non validi. Il modello di pelle umana non deve essere stato contaminato da batteri (tra cui micoplasmi) né da funghi.

1.4.1.1.2 Condizioni funzionali dei modelli:

La vitalità è generalmente quantificata tramite MTT o altri coloranti vitali che hanno subito una conversione metabolica. In questo caso, la densità ottica (DO) del colorante estratto (solubilizzato) dal tessuto di controllo negativo deve essere almeno 20 volte superiore alla DO del solo solvente di estrazione [per maggiori dettagli, si rimanda al riferimento (22)]. Il tessuto di controllo negativo deve essere stabile in cultura (cioè fornire misure di vitalità simili) nel corso del periodo di esposizione. Lo strato corneo deve essere sufficientemente solido per resistere alla penetrazione rapida di alcuni marcatori citotossici (ad esempio, Triton X-100 all'1 %). Tale proprietà può essere valutata calcolando il tempo di esposizione necessaria per ridurre la vitalità cellulare del 50 % (ET_{50}) (ad esempio, per i modelli EpiDerm™ ed EPISKIN™, tale tempo è inferiore a 2 ore). Il tessuto deve dimostrare una riproducibilità dei risultati nel tempo e preferibilmente tra laboratori. Deve inoltre permettere di prevedere il potenziale corrosivo delle sostanze chimiche di riferimento (cfr. tabella 1) quando utilizzate nel metodo di prova selezionato.

▼B

1.4.1.2. *Applicazione delle sostanze di prova e delle sostanze di controllo*

Due tessuti replicati sono utilizzati per ciascun trattamento (tempo di esposizione), compresi i controlli. Per le sostanze liquide, deve essere applicata una quantità della sostanza di prova sufficiente a coprire la superficie cutanea in modo uniforme (almeno 25 $\mu L/cm^2$). Per le sostanze solide, occorre applicare in modo uniforme una quantità della sostanza di prova sufficiente a coprire la pelle; essa deve successivamente essere inumidita con acqua deionizzata o distillata al fine di garantire un buon contatto con la pelle. Se necessario, le sostanze solide devono essere ridotte in polvere prima della loro applicazione. Il metodo d'applicazione deve essere adatto alla sostanza di prova (cfr., ad esempio, il riferimento 5). Al termine del periodo di esposizione, la sostanza di prova deve essere tolta con cura dalla superficie cutanea con idoneo tampone o NaCl allo 0,9 %.

Controlli positivi e negativi concorrenti devono essere utilizzati per ciascuno studio in modo da garantire un'adeguata prestazione del metodo di prova. Le sostanze proposte ai fini dei controlli positivi sono l'acido acetico ghiacciato o 8N KOH. Le sostanze proposte per i controlli negativi sono NaCl allo 0,9 % o l'acqua.

1.4.1.3. *Misurazioni della vitalità cellulare*

Solo metodi quantitativi validati possono essere utilizzati per misurare la vitalità cellulare. La misurazione della vitalità deve inoltre essere compatibile con l'utilizzo in un modello tridimensionale di tessuto. Il legame non specifico dei coloranti non deve interferire con la misurazione della vitalità. L'utilizzo di coloranti che si legano alle proteine o che non subiscono conversioni metaboliche (ad esempio, il rosso neutro) non risulta pertanto adeguato. Il metodo più spesso utilizzato è la riduzione del MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide; Tiazolil blue: numero Einecs 206-069-5, numero CAS 298-93-1), di cui si è constatata l'esattezza e la riproducibilità dei risultati (5), ma è anche possibile utilizzare altri metodi. Il campione di pelle è inserito in una soluzione MTT alla concentrazione adeguata (ad esempio, 0,3-1/ml) e ad una temperatura di incubazione adeguata per 3 ore. Il precipitato blu formazan è successivamente estratto con solvente (isopropanolo) e la concentrazione di formazan è misurata determinando la DO ad una lunghezza d'onda compresa tra 540 e 595 nm.

L'azione chimica prodotta dalla sostanza di prova sul colorante vitale può imitare quella del metabolismo cellulare, il che può condurre ad una stima sbagliata della vitalità. È stato dimostrato che ciò avviene in particolare quando la sostanza di prova non è stata rimossa completamente dalla pelle con risciacquo (9). Se la sostanza di prova agisce direttamente sul colorante vitale, devono essere utilizzati controlli supplementari per individuare e correggere qualsiasi interferenza delle sostanze di prova con la misurazione della vitalità (9)(23).

2. **DATI**

Per ciascun tessuto, i valori della DO, le percentuali calcolate della vitalità cellulare per la sostanza di prova ed i controlli positivi e negativi sono presentati sotto forma di tabella, compresi i dati delle prove ripetute ed i valori medi ed individuali.

▼B

2.1. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I valori della DO ottenuti per ciascun campione di prova possono essere utilizzati per calcolare una percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo, il cui valore è fissato arbitrariamente al 100 %. Il valore limite della percentuale di vitalità cellulare in base al quale si stabilisce la distinzione tra sostanze corrosive e sostanze non corrosive (o tra diverse classi di sostanze corrosive) o le procedure statistiche utilizzate per analizzare i risultati e individuare le sostanze corrosive devono essere chiaramente definite e documentate, nonché dimostrarsi idonee. In generale, questi valori limite sono stabiliti nel corso dell'ottimizzazione del test, testati in una fase di prevalidazione e confermati da uno studio di validazione. Ad esempio, la previsione di corrosività associata al modello EpiDerm^{TM} è la seguente (9):

La sostanza di prova è considerata corrosiva per la pelle:

i) se la vitalità dopo 3 minuti d'esposizione è inferiore al 50 %; o

ii) se la vitalità dopo 3 minuti d'esposizione è superiore o uguale al 50 %, ma è inferiore al 15 % dopo 1 ora di esposizione.

La sostanza di prova è considerata non corrosiva per la pelle:

i) se la vitalità dopo 3 minuti di esposizione è superiore o uguale al 50 %, e la vitalità dopo un'ora di esposizione è superiore o uguale al 15 %.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto sul test deve contenere le informazioni seguenti:

Sostanze di prova e sostanze di controllo:

— denominazioni chimiche, quali le denominazioni IUPAC o CAS ed il numero CAS, se conosciuti;

— purezza e composizione della sostanza o della preparazione (in percentuale ponderale);

— proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali la natura fisica, il pH, la stabilità e la solubilità in acqua;

— trattamento delle sostanze di prova/di controllo prima del test, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità, se conosciuta.

Giustificazione del modello di pelle umana e del metodo utilizzato.

Condizioni di prova:

— sistema cellulare utilizzato;

— informazioni sulla taratura dell'attrezzatura di misurazione utilizzata per misurare la vitalità cellulare (spettrofotometro, ad esempio);

▼B

— informazioni complete sul modello di pelle utilizzato e sulla sua vitalità

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata;

— dosi utilizzate per il test;

— descrizione di qualsiasi modifica delle procedure sperimentali;

— riferimenti a dati storici del modello;

— descrizione dei criteri di valutazione utilizzati.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati tratti dai campioni di prova individuali;

— descrizione di altri effetti osservati.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OCSE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://-www.olis.oecd.org/olis/2001 doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Metodo di prova B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., e Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483-524.

6. OCSE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., e Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post -transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVItro 15, 57-93.

▼B

B.41. **SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ IN VITRO 3T3 NRU**

1. **METODO**

Questo metodo corrisponde alle linee guida OCSE TG 432 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Per fototossicità si intende la risposta tossica che si manifesta dopo esposizione del corpo ad una sostanza chimica e che è indotta o accentuata (ma presente a dosaggi inferiori) dopo successiva esposizione alla luce, o che è indotta da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

Il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU consente di identificare il potenziale fototossico di una sostanza di prova indotto dalla sostanza chimica eccitata dopo esposizione alla luce. Il saggio determina la fotocitotossicità in base alla relativa riduzione della vitalità delle cellule esposte alla sostanza chimica in presenza di luce rispetto alla mancata esposizione alla luce. Le sostanze individuate da questo saggio sono verosimilmente fototossiche *in vivo*, dopo applicazione sistemica e distribuzione sulla cute o altra applicazione topica.

È noto che molti tipi di sostanze chimiche inducono effetti fototossici (1)(2)(3)(4). La caratteristica che le accomuna è la capacità di assorbire l'energia luminosa nello spettro della luce solare. In base alla prima legge della fotochimica (legge di Grotthaus-Draper), la reazione fotochimica richiede un assorbimento sufficiente di quanti di luce. Pertanto, prima di prendere in esame l'eventualità di un saggio biologico, occorre determinare lo spettro di assorbimento UV/visibile della sostanza di prova secondo le linee guida dell'OCSE dal titolo *OECD Test Guideline 101*. Secondo alcuni, se il coefficiente di estinzione/assorbimento molare è inferiore a 10 litri × mol-1 × cm-1 è improbabile che la sostanza chimica sia fotoreattiva. In quel caso non è necessario sottoporre la sostanza al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU o ad altri saggi biologici per determinarne gli effetti fotochimici indesiderati (1)(5). Cfr. anche l'allegato I.

Recentemente sono state valutate l'affidabilità e la pertinenza del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (6)(7)(8)(9). È stato dimostrato che il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU consente di prevedere gli effetti fototossici acuti negli animali e nelle persone *in vivo*. Il saggio non è concepito per prevedere altri effetti indesiderati che potrebbero derivare dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, come ad esempio la fotogenotossicità, la fotoallergia e la fotocancerogenicità né permette di valutare la potenza fototossica. Il saggio non è nemmeno studiato per determinare i meccanismi indiretti della fototossicità, gli effetti dei metaboliti della sostanza di prova o gli effetti delle miscele di sostanze.

Mentre in genere è richiesto l'utilizzo di sistemi metabolizzanti per tutti i saggi in vitro utilizzati per determinare il potenziale genotossico e cancerogeno, finora nel caso della fototossicologia si contano solo rari esempi dove è richiesta la trasformazione metabolica affinché la sostanza chimica agisca come fototossina *in vivo* o in vitro. Non si ritiene pertanto necessario né giustificato dal punto di vista scientifico che il presente saggio sia eseguito con un sistema di attivazione metabolica.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Irradianza: l'intensità della luce ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, misurata in W/m^2 o in mW/cm^2.

Dose di luce: la quantità (= intensità × tempo) di radiazione ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, espressa in joule (= W × s) per area di superficie, ad esempio J/m^2 o J/cm^2.

Bande di lunghezza d'onda della luce UV: i valori raccomandati dalla CIE *(Commission Internationale de l'Éclairage)* sono: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). Sono in uso, inoltre, altri valori: spesso la distinzione fra UVB e UVA viene posta a 320 nm e gli UVA possono essere suddivisi in UV-A1 e UV-A2, con una distinzione posta a circa 340 nm.

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule (ad esempio l'assunzione del colorante vitale rosso neutro nei lisosomi cellulari) che, in funzione dell'«endpoint» misurato e del tipo di saggio impiegato, è correlato al numero totale e/o alla vitalità delle cellule.

Vitalità cellulare relativa: vitalità cellulare espressa in relazione a controlli negativi (solvente) effettuati nel corso del saggio (+ Irr o - Irr) senza trattamento con la sostanza chimica di prova.

PIF *(Photo Irritation Factor* — Fattore di fotoirritazione): fattore ottenuto comparando due concentrazioni di pari citotossicità (IC_{50}) della sostanza chimica di prova in assenza (- Irr) e in presenza (+ Irr) di una irradiazione non citotossica con raggi UVA/luce visibile.

IC_{50}: concentrazione della sostanza di prova alla quale la vitalità cellulare è ridotta del 50 %.

MPE *(Mean Photo Effect* — Foto-effetto medio): misura derivata dall'analisi matematica delle curve di concentrazione-risposta ottenute in assenza (- Irr) e in presenza (+ Irr) di una irradiazione non citotossica con UVA/luce visibile.

Fototossicità: risposta tossica acuta che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

Il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è basato sul confronto della citotossicità di una sostanza chimica sottoposta al saggio con e senza esposizione a una dose non citotossica di luce solare simulata. In questo saggio la citotossicità viene espressa come riduzione, dipendente dalla concentrazione, dell'assunzione del colorante vitale rosso neutro 24 ore dopo il trattamento con la sostanza chimica di prova e l'irradiazione (10). Il rosso neutro *(Neutral Red,* NR) è un colorante cationico debole che penetra rapidamente nelle membrane cellulari per non-diffusione e si accumula a livello intracellulare nei lisosomi. Le alterazioni della superficie della membrana sensibile del lisosoma causano una fragilità del lisosoma e altri cambiamenti che diventano progressivamente irreversibili. Tali cambiamenti dovuti all'azione degli xenobiotici riducono l'assunzione e il legame dell'NR. È dunque possibile fare la distinzione tra cellule vitali, cellule danneggiate e cellule morte, che è alla base di questo saggio.

▼B

Le cellule Balb/c 3T3 vengono mantenute in coltura per 24 ore per permettere la formazione di monostrati. Quindi, per ogni sostanza chimica di prova, vengono preincubate due piastre a 96 pozzetti con otto diverse concentrazioni della sostanza chimica per 1 ora. Una delle due piastre viene successivamente esposta alla massima dose non citotossica di luce, mentre l'altra piastra viene mantenuta al buio. In entrambe le piastre, il mezzo di trattamento viene successivamente sostituito con il mezzo di coltura e, dopo altre 24 ore di incubazione, si determina la vitalità cellulare tramite assunzione del rosso neutro *(Neutral Red Uptake,* NRU). Per ognuna delle otto concentrazioni di prova viene dunque calcolata la vitalità cellulare, espressa come percentuale dei controlli non trattati (solvente). Per prevedere il potenziale fototossico vengono confrontate le risposte alla concentrazione ottenute in presenza e in assenza di irradiazione, generalmente al livello IC_{50}, cioè alla concentrazione che inibisce la vitalità cellulare del 50 % rispetto ai controlli non trattati.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Preparazioni**

1.4.1.1 *Cellule*

Nello studio di validazione è stata usata una linea cellulare permanente di fibroblasti di topo — Balb/c 3T3, clone 31 — proveniente dall'American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, o dalla European Collection of Cell Cultures (ECACC) di Salisbury, Wiltshire, Regno Unito. Si raccomanda di acquisire le cellule da una banca di cellule qualificata. È possibile utilizzare anche altre cellule o linee cellulari applicando lo stesso protocollo se le condizioni della coltura vengono adattate alle esigenze specifiche delle cellule; in quel caso è tuttavia necessario dimostrare l'equivalenza.

È necessario verificare con regolarità che le cellule non siano contaminate da micoplasmi e utilizzarle solo se non vi è contaminazione (11).

È importante verificare periodicamente la sensibilità delle cellule Balb/c 3T3 agli UV secondo la procedura di controllo della qualità descritta in questo metodo. Poiché la sensibilità delle cellule agli UVA può aumentare con il numero di passaggi, vanno impiegate cellule Balb/c 3T3 del numero più basso ottenibile di passaggi, preferibilmente inferiore a 100 (cfr. punto 1.4.2.2.2 e allegato II).

1.4.1.2. *Condizioni dei mezzi e della coltura*

Per il passaggio di routine delle cellule e durante il saggio è necessario utilizzare mezzi di coltura e condizioni di incubazione adeguati: ad esempio, nel caso delle cellule Balb/c 3T3, il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) integrato con 10 % di siero di vitello neonato, 4 mM di glutammina, penicillina (100 IU) e streptomicina (100 μg/mL), nonché incubazione umidificata a 37 ºC, al 5-7,5 % di CO_2 in funzione del tampone (cfr. punto 1.4.1.4, secondo paragrafo). È particolarmente importante che le condizioni della coltura cellulare assicurino un tempo di ciclo cellulare compreso nel normale range storico delle cellule o della linea cellulare utilizzate.

1.4.1.3 *Preparazione delle colture*

Le cellule ottenute da colture madre congelate vengono seminate nel terreno di coltura alla densità adeguata e poste in sottocoltura almeno una volta prima di essere utilizzate per il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

▼B

Per il saggio di fototossicità occorre seminare le cellule nel terreno di coltura ad una densità tale che impedisca alle colture di raggiungere la confluenza prima della fine del saggio, cioè quando viene determinata la vitalità cellulare 48 ore dopo la semina. Per le cellule Balb/c 3T3 coltivate in piastre a 96 pozzetti la densità raccomandata è di 1×10^4 cellule per pozzetto.

Per ogni sostanza chimica di prova si seminano cellule in maniera identica in due diverse piastre a 96 pozzetti, che vengono poi sottoposte simultaneamente all'intero protocollo in condizioni colturali identiche, salvo il periodo di tempo in cui una delle piastre viene irradiata (+ Irr) mentre l'altra viene tenuta al buio (- Irr).

1.4.1.4 *Preparazione della sostanza chimica di prova*

Le sostanze chimiche di prova devono essere preparate di fresco immediatamente prima dell'uso, a meno che non siano disponibili dati che ne dimostrino la stabilità di conservazione. Si raccomanda che tutte le manipolazioni chimiche e il trattamento iniziale delle cellule avvengano in condizioni di luce tali da evitare la fotoattivazione o la degradazione della sostanza di prova prima dell'irradiazione.

Le sostanze chimiche di prova vanno dissolte in soluzioni saline tampone, come la soluzione isotonica di Earl (EBSS) o altre soluzioni tampone in equilibrio fisiologico che, per evitare interferenze durante l'irradiazione, devono essere prive di componenti proteiche e fotoassorbenti (ad esempio colori indicatori di pH e vitamine). Poiché durante l'irradiazione le cellule sono mantenute per circa 50 minuti al di fuori dell'incubatore al CO_2, è necessario fare in modo di evitare l'alcalizzazione. Se vengono impiegati tamponi deboli come l'EBSS, è necessario incubare le cellule al 7,5 % di CO_2; se invece le cellule sono incubate al 5 % di CO_2 è necessario selezionare un tampone più forte.

Le sostanze chimiche di prova che presentano una scarsa solubilità in acqua devono essere disciolte in solventi adeguati. Gli eventuali solventi utilizzati devono essere presenti a un volume costante in tutte le colture, e cioè sia nei controlli negativi che in tutte le concentrazioni della sostanza chimica di prova; a tali concentrazioni non devono essere citotossici. Le concentrazioni della sostanza chimica di prova devono essere tali da evitare precipitati o soluzioni torbide.

I solventi raccomandati sono il dimetilsolfossido (DMSO) e l'etanolo (ETOH). Possono essere adatti anche altri solventi a bassa citotossicità. Prima dell'uso è necessario valutare attentamente le proprietà specifiche di tutti i solventi utilizzati, quali la reazione con la sostanza chimica di prova, l'estinzione dell'effetto fototossico, le proprietà di cattura dei radicali e/o la stabilità chimica nel solvente.

Se necessario, si può procedere a miscelazione tramite vortex e/o sonicazione e/o riscaldamento alle temperature opportune per favorire la solubilizzazione, a condizione che non ci siano conseguenze sulla stabilità della sostanza di prova.

▼B

1.4.1.5 *Condizioni di irradiazione*

1.4.1.5.1 Fonte di luce

La scelta di una fonte di luce e di filtri adeguati è il fattore più importante ai fini di un corretto saggio della fototossicità. Le radiazioni UVA e la luce visibile si associano generalmente a fotosensibilizzazione *in vivo* (3) (12), mentre i raggi UVB sono in genere meno rilevanti ma fortemente citotossici; la citotossicità aumenta di 1 000 volte quando la lunghezza d'onda passa da 313 a 280 nm (13). Per scegliere una fonte luminosa adeguata valgono, tra l'altro, i seguenti criteri essenziali: la fonte di luce deve emettere lunghezze d'onda assorbite dalla sostanza chimica di prova (spettro di assorbimento) e la dose di luce (ottenibile in tempi di esposizione ragionevoli) deve essere sufficiente per individuare le sostanze con caratteristiche fotocitotossiche note. Inoltre, le lunghezze d'onda e le dosi utilizzate non devono essere eccessivamente nocive per il sistema sottoposto a prova, ad esempio per quanto riguarda l'emissione di calore (spettro dell'infrarosso).

La fonte di luce artificiale ottimale si ottiene simulando la luce solare con simulatori solari. La distribuzione della potenza di irradiazione dei simulatori solari con filtri deve essere la più vicina possibile a quella della luce solare esterna indicata in (14). Nei simulatori solari si usano sia gli archi allo xeno che gli archi al mercurio e ad alogenuri metallici (drogati) (15). Questi ultimi presentano il vantaggio di emettere meno calore e di essere meno costosi, ma la simulazione della luce solare che offrono è inferiore a quella garantita dagli archi allo xeno. Poiché tutti i simulatori solari emettono quantità significative di UVB, vanno muniti di filtri adeguati per attenuare le lunghezze d'onda UVB altamente citotossiche. Poiché i materiali plastici delle colture cellulari contengono stabilizzatori UV, lo spettro deve essere misurato utilizzando lo stesso tipo di coperchio della piastra a 96 pozzetti impiegato per il saggio. Indipendentemente dalle misure adottate per attenuare parti dello spettro con filtri o con gli effetti filtranti inevitabili dell'apparecchiatura, lo spettro registrato al di sotto dei filtri non deve discostarsi dalla luce solare esterna standardizzata (14). Un esempio della distribuzione spettrale dell'irradianza del simulatore solare con filtro impiegato nello studio di validazione del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU 1 figura in (8)(16). Cfr. anche allegato II, figura 1.

1.4.1.5.2 Dosimetria

Prima di effettuare il saggio di fototossicità occorre controllare regolarmente l'intensità della luce (irradianza) mediante opportuno misuratore UV a banda larga. L'intensità deve essere misurata utilizzando lo stesso tipo di coperchio della piastra a 96 pozzetti impiegato per il saggio. Il misuratore UV deve essere calibrato in funzione della fonte. È necessario controllare la funzionalità del misuratore UV e, a tale scopo, si raccomanda di impiegare un secondo misuratore UV di riferimento, dello stesso tipo e con identica calibrazione. L'ideale sarebbe che, a intervalli di tempo più lunghi, con uno spettroradiometro si misurasse l'irradianza spettrale della fonte di luce filtrata e si controllasse la calibrazione del misuratore UV a banda larga.

È stato dimostrato che una dose di 5 J/cm^2 (nelle lunghezze d'onda UVA) non è citotossica per le cellule Balb/c 3T3 ed è sufficientemente potente per eccitare le sostanze chimiche e indurre reazioni di fototossicità (6) (17): a titolo di esempio, per ottenere una dose di 5 J/cm^2 entro 50 minuti, l'irradianza deve essere regolata a 1,7 mW/cm^2 (cfr. allegato II, figura 2). Se si utilizza un'altra linea cellulare o una diversa fonte luminosa, potrebbe essere necessario adattare la dose irradiata in modo tale che non sia nociva per le cellule e che sia comunque sufficiente per eccitare le fototossine standard. Il tempo di esposizione alla luce si calcola come segue:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose irradiazione } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradianza } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2 **Condizioni di prova**

1.4.2.1 *Concentrazioni della sostanza di prova*

I range (o intervalli) di concentrazione di una sostanza chimica sottoposta al saggio in presenza (+ Irr) e in assenza (- Irr) di luce vanno determinati in modo adeguato con esperimenti espressamente effettuati a tale scopo. Può essere utile valutare la solubilità nel momento iniziale e dopo 60 minuti (o dopo qualsiasi altro periodo di trattamento utilizzato), perché la solubilità può variare nel tempo o nel corso dell'esposizione. Per evitare di indurre tossicità a causa di condizioni inadeguate delle colture o in presenza di sostanze chimiche altamente acide o alcaline, il pH delle colture cellulari alle quali è aggiunta la sostanza chimica di prova deve essere compreso tra 6,5 e 7,8.

La concentrazione massima della sostanza chimica di prova deve rientrare nelle condizioni fisiologiche di prova (occorre ad esempio evitare stress osmotico e del pH). In funzione della sostanza di prova prescelta può essere necessario prendere in considerazione altre proprietà fisico-chimiche tra i fattori che limitano la concentrazione massima di prova. Per le sostanze relativamente insolubili che non sono tossiche a concentrazioni massime fino al punto di saturazione è necessario testare la concentrazione massima raggiungibile. In generale è preferibile evitare la precipitazione della sostanza di prova a qualsiasi concentrazione. La concentrazione massima di una sostanza di prova non deve superare i 1 000 μg/mL e l'osmolalità non deve superare 10 mmolari. È necessario utilizzare diluizioni in serie geometrica con 8 concentrazioni della sostanza di prova (con un fattore di diluizione costante) (cfr. punto 2.1, secondo paragrafo).

Se sono disponibili dati (ricavati da esperimenti preliminari per determinare il range di concentrazione o *range finding)* che dimostrano che la sostanza chimica non è citotossica fino al limite di concentrazione nell'esperimento in assenza di luce (- Irr), ma è altamente citotossica se irradiata (+ Irr), per garantire un'adeguata qualità dei dati gli intervalli di concentrazione da scegliere per l'esperimento (+ Irr) possono essere diversi da quelli utilizzati nel saggio (- Irr).

1.4.2.2 *Controlli*

1.4.2.2.1 Sensibilità delle cellule alle radiazioni, determinazione dei dati storici

Le cellule devono essere controllate con regolarità (ogni cinque passaggi) per accertarne la sensibilità alla fonte luminosa valutando la loro vitalità dopo l'esposizione a dosi crescenti di radiazioni. Nella valutazione devono essere applicate varie dosi di radiazioni luminose, fino a livelli molto superiori a quelli applicati nel saggio di fototossicità 3T3 NRU. Le dosi in questione sono quantificate più facilmente misurando lo spettro UV della fonte luminosa. Le cellule sono seminate alla stessa densità utilizzata nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU e irradiate il giorno successivo; il giorno ancora successivo si determina la vitalità cellulare misurando l'assunzione del rosso neutro (NRU). Si deve poter dimostrare che la dose non-citotossica massima che ne risulta [ad esempio, nello studio di validazione: 5 J/cm^2 (UVA)] è sufficiente per classificare correttamente le sostanze chimiche di riferimento (tabella 1).

▼B

1.4.2.2.2 Sensibilità alle radiazioni, verifica del saggio in corso

Il saggio risponde ai criteri di qualità se i controlli negativi/solvente con irradiazione dimostrano una vitalità superiore all'80 % rispetto ai controlli negativi/solvente senza irradiazione.

1.4.2.2.3 Vitalità associata ai controlli a base di solvente

La densità ottica assoluta ($OD_{540\ NRU}$) del rosso neutro derivata dai controlli in solvente indica se le 1×10^4 cellule seminate in ogni pozzetto sono cresciute con un tempo di raddoppiamento normale durante i due giorni della prova. Il saggio soddisfa i criteri di accettazione se la $OD_{540\ NRU}$ media dei controlli non trattati è $\geq 0{,}4$ (cioè circa 20 volte l'assorbanza di fondo del solvente).

1.4.2.2.4 Controllo positivo

Contemporaneamente al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, si saggia una sostanza chimica notoriamente fototossica. Si raccomanda l'uso di clorpromazina (CPZ). Per la CPZ saggiata con il protocollo standard nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU sono stati definiti i seguenti criteri di accettazione: CPZ irradiata (+ Irr): IC_{50} = da 0,1 a 2,0 μg/ml; CPZ non irradiata (- Irr): IC_{50} = da 7,0 a 90,0 μg/ml. Il PIF deve essere superiore a 6. È necessario monitorare le prestazioni dei controlli positivi nel tempo.

Come controlli positivi concomitanti, al posto della CPZ possono essere impiegate altre sostanze chimiche notoriamente fototossiche, corrispondenti alla classe chimica o alle caratteristiche di solubilità della sostanza chimica di prova.

1.4.3 **Procedura di prova (6)(7)(8)(16)(17)**

1.4.3.1 *Primo giorno*

Versare 100 μL di terreno di coltura nei pozzetti periferici di una piastra per microtitolazione di coltura tissutale da 96 pozzetti (= bianchi). Nei restanti pozzetti versare 100 μL di una sospensione cellulare di 1×10^5 cellule/mL (= 1×10^4 cellule/pozzetto). Per ciascuna serie di concentrazioni delle singole sostanze di prova e per i controlli in solvente e i controlli positivi preparare due piastre.

Incubare le cellule per 24 ore (cfr. punto 1.4.1.2) finché formano un monostrato semiconfluente. Questo periodo di incubazione tiene conto del recupero e dell'aderenza delle cellule, nonché della crescita esponenziale.

1.4.3.2 *Secondo giorno*

Dopo l'incubazione, far decantare il terreno di coltura separandolo dalle cellule e lavare con cura con 150 μL della soluzione tamponata usata per l'incubazione chimica. Aggiungere 100 μL del tampone contenente la concentrazione corretta della sostanza chimica di prova o del solvente (controllo in solvente). Utilizzare 8 diverse concentrazioni della sostanza chimica di prova. Incubare le cellule con la sostanza chimica di prova al buio per 60 minuti (cfr. punti 1.4.1.2 e 1.4.1.4, secondo paragrafo).

Delle due piastre preparate per ogni serie di concentrazioni della sostanza di prova e dei controlli, una è scelta, in genere a caso, per determinare la citotossicità (- Irr) (la piastra di controllo) e una (la piastra di trattamento) per determinare la fotocitotossicità (+ Irr).

▼B

Per eseguire la parte + Irr del saggio, irradiare le cellule a temperatura ambiente per 50 minuti attraverso il coperchio della piastra a 96 pozzetti con la dose massima di radiazione non citotossica (cfr. anche allegato II). Mantenere le piastre non irradiate (- Irr) a temperatura ambiente in una scatola al buio per 50 minuti (= tempo di esposizione alla luce).

Far decantare la soluzione di prova e lavare con cura due volte con 150 µL della soluzione tamponata usata per l'incubazione e non contenente materiale di prova. Sostituire il tampone con terreno di coltura e incubare (cfr. punto 1.4.1.2) per una notte (18-22 ore).

1.4.3.3 *Terzo giorno*

1.4.3.3.1 Esame al microscopio

Esaminare le cellule con un microscopio a contrasto di fase per verificare la crescita, la morfologia e l'integrità del monostrato. Registrare gli eventuali cambiamenti morfologici delle cellule e gli effetti sulla crescita cellulare.

1.4.3.3.2 Saggio di assunzione del rosso neutro (NRU)

Lavare le cellule con 150 µL di tampone preriscaldato. Eliminare la soluzione di lavaggio con lievi colpetti. Aggiungere 100 µl di rosso neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina cloridrato, numero Einecs 209-035-8; numero CAS 553-24-2; C.I. 50040) a 50 µg/ml nel terreno di coltura senza siero (16) e incubare per 3 ore secondo la procedura descritta al punto 1.4.1.2. Dopo l'incubazione, rimuovere il terreno al rosso neutro e lavare le cellule con 150 µL di tampone. Far decantare ed eliminare il tampone con materiale assorbente o per centrifugazione.

Aggiungere esattamente 150 µL di soluzione di estinzione del rosso neutro (49 parti di acqua + 50 parti di etanolo + 1 parte di acido acetico preparati di fresco).

Scuotere con attenzione la piastra di microtitolazione con un agitatore per 10 minuti fino ad estrazione del rosso neutro dalle cellule e formazione di una soluzione omogenea.

Misurare la densità ottica dell'estratto di rosso neutro a 540 nm con uno spettrofotometro, utilizzando i bianchi come riferimento. Salvare i dati nel formato elettronico più opportuno per le analisi successive.

2. DATI

2.1. QUALITÀ E QUANTITÀ DEI DATI

I dati devono permettere un'analisi significativa della concentrazione-risposta ottenuta in presenza e in assenza di irradiazione e, se possibile, la concentrazione della sostanza di prova alla quale la vitalità cellulare è ridotta al 50 % (IC_{50}). Se si rileva citotossicità, è necessario fissare sia il range di concentrazione che l'intervallo tra le singole concentrazioni in modo da adattare una curva ai dati sperimentali.

Per i casi evidentemente positivi e negativi (cfr. punto 2.3, primo paragrafo) è sufficiente procedere all'esperimento principale, sostenuto da uno o più esperimenti preliminari di definizione dei range delle dosi.

▼B

I risultati dubbi, borderline o non chiari devono essere definiti con altre prove (cfr. anche punto 2.4, secondo paragrafo). In tal caso si deve prendere in considerazione l'eventualità di modificare le condizioni dell'esperimento; tra le condizioni che possono essere modificate vi sono il range o l'intervallo tra le concentrazioni, il tempo di pre-incubazione e il tempo di esposizione all'irradiazione. Per le sostanze chimiche instabili in acqua può essere indicato un tempo di esposizione più breve.

2.2. TRATTAMENTO DEI DATI

Per poter valutare i dati è possibile calcolare il PIF (fattore di fotoirritazione) o l'MPE (foto-effetto medio).

Per il calcolo delle misure di fototossicità (cfr. sotto) la serie di valori dose-risposta discreti deve essere approssimata con un'adeguata curva continua dose-risposta (modello). L'adattamento della curva ai dati è in genere effettuato con il metodo di regressione non lineare (18). Per valutare come la variabilità dei dati incida sulla curva adattata si raccomando l'uso di un metodo *bootstrap*.

Il PIF è calcolato con la seguente formula:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Se non è possibile calcolare l'IC_{50} in presenza o in assenza di luce, non si può determinare il PIF per il materiale di prova. L'MPE si basa sulla comparazione delle curve complete di concentrazione-risposta (19) ed è definito come la media ponderata di una serie rappresentativa di valori di foto-effetto.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Il valore PE_C alla concentrazione C è definito come il prodotto dell'effetto di risposta RE_C per l'effetto alla dose DE_C, cioè $PE_C = RE_C \times DE_C$. L'effetto di risposta RE_C è uguale alla differenza tra le risposte osservate in assenza e in presenza di luce, cioè $RE_C = R_C$ (- Irr) - R_C (+ Irr). L'effetto rispetto alla dose è dato da:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

dove C* è la concentrazione di equivalenza, cioè la concentrazione alla quale la risposta + Irr è uguale alla risposta - Irr alla concentrazione C. Se non è possibile determinare C* perché i valori di risposta della curva + Irr sono sistematicamente superiori o inferiori a R_C(- Irr) l'effetto rispetto alla dose è fissato a 1. I fattori di ponderazione w_i sono dati dal valore di risposta più alto, cioè w_i = MAX {R_i (+ Irr), R_i (- Irr)}. La griglia di concentrazione C_i è scelta in modo tale che lo stesso numero di punti rientri in ciascuno degli intervalli di concentrazione definiti dai valori di concentrazione utilizzati nell'esperimento. Il calcolo dell'MPE è limitato al valore massimo di concentrazione al quale almeno una delle due curve mostra ancora un valore di risposta pari ad almeno il 10 %. Se questa concentrazione massima è superiore alla concentrazione più elevata utilizzata nell'esperimento + Irr, la parte residua della curva + Irr è fissata al valore di risposta «0». Se il valore MPE è superiore ad un valore discriminante adeguatamente scelto (MPE_C = 0,15) la sostanza è classificata come fototossica.

▼B

Un pacchetto software per il calcolo del PIF e dell'MPE è disponibile al sito indicato in bibliografia (20).

2.3. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In base allo studio di validazione (8), una sostanza di prova con un PIF < 2 o un MPE < 0,1 è indice di assenza di fototossicità. Un PIF > 2 e < 5 o un MPE > 0,1 e < 0,15 è indice di una probabile fototossicità e un PIF > 5 o un MPE > 0,15 predice fototossicità.

Per i laboratori che svolgono questo saggio per la prima volta i materiali di riferimento indicati nella tabella 1 devono essere testati prima delle sostanze di prova per verificarne le caratteristiche fototossiche. I valori del PIF o dell'MPE devono essere prossimi a quelli indicati nella tabella 1.

Tabella 1

Denominazione chimica	N. Einecs	N. CAS	PIF	MPE	Picco di assorbimento	Solvente ([1])
Amiodarone HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (spalla)	etanolo
Cloropromazina HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanolo
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrile
Antracene	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrile
Protoporfirina IX, Disodio	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanolo
L-Istidina		[7006-35-1]	nessun PIF	0,05-0,10	211 nm	acqua
Esaclorofene	200-733-8	[70-30-4]	1,1- 1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (spalla)	etanolo
Laurilsolfato di sodio	205-788-1	[151-21-3]	1,0- 1,9	0,00-0,05	Nessun assorbimento	acqua

([1]) Solvente impiegato per misurare l'assorbimento.

2.4. INTERPRETAZIONE DEI DATI

Se vengono rilevati effetti fototossici solo al valore massimo di concentrazione utilizzato nel saggio (in particolare per le sostanze di prova solubili in acqua) può essere necessario tener conto di altri elementi per la valutazione del rischio. Tali fattori possono includere dati sull'assorbimento cutaneo e l'accumulo della sostanza nella cute oppure dati ricavati da altre prove, ad esempio saggi in vitro della sostanza sulla cute umana o animale o modelli di cute.

▼B

Se non si rileva fototossicità (+ Irr e - Irr) e se la scarsa solubilità ha limitato le concentrazioni da testare, si può mettere in questione la compatibilità della sostanza di prova con il saggio e si deve considerare la possibilità di effettuare un saggio di conferma, ad esempio utilizzando un modello diverso.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza chimica di prova:

— dati di identificazione, denominazione generica e numeri IUPAC e CAS, se noti;

— caratteristiche fisiche e purezza;

— proprietà fisico-chimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio;

— spettro di assorbimento UV/visibile;

— stabilità e fotostabilità, se note.

Solvente:

— motivazione della scelta del solvente;

— solubilità della sostanza chimica di prova nel solvente;

— percentuale di solvente presente nel terreno di trattamento.

Cellule:

— tipo e origine;

— assenza di micoplasmi;

— numero di passaggi delle cellule, se noto;

— sensibilità delle cellule alle radiazioni, determinata con gli strumenti di irradiazione usati nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

Condizioni di prova (1); *incubazione prima e dopo il trattamento:*

— tipo e composizione del terreno di coltura;

— condizioni di incubazione (concentrazione di CO_2, temperatura, umidità);

— durata dell'incubazione (pre-trattamento, post-trattamento).

Condizioni di prova (2); *trattamento con la sostanza chimica:*

— criteri di scelta delle concentrazioni della sostanza chimica di prova usata sia in presenza che in assenza di irradiazione;

— in caso di solubilità limitata della sostanza chimica di prova e assenza di citotossicità, motivi della scelta della concentrazione più elevata;

— tipo e composizione del terreno di trattamento (soluzione tampone salina);

— durata del trattamento chimico.

Condizioni di prova (3); *irradiazione:*

— motivo della scelta della fonte di luce utilizzata nel saggio;

▼B

— fabbricante e tipo di fonte luminosa e radiometro;

— caratteristiche di irradianza spettrale della fonte di luce;

— caratteristiche di trasmissione/assorbimento del/i filtro/i usato/i;

— caratteristiche del radiometro e particolari sulla sua calibrazione;

— distanza della fonte di luce dal sistema di prova;

— irradianza UVA a tale distanza, espressa in mW/cm^2;

— durata dell'esposizione alla luce UV/visibile;

— dose UVA (irradianza × tempo), espressa in J/cm^2;

— temperatura delle colture cellulari durante l'irradiazione e delle colture cellulari mantenute al buio.

Condizioni di prova (4); *prova vitalità in rosso neutro:*

— composizione del terreno per il trattamento al rosso neutro;

— durata dell'incubazione nel rosso neutro;

— condizioni di incubazione (concentrazione di CO_2, temperatura, umidità);

— condizioni di estrazione del rosso neutro (agente di estrazione, durata);

— lunghezza d'onda usata per la lettura spettrofotometrica della densità ottica del rosso neutro;

— seconda lunghezza d'onda (riferimento), se utilizzata;

— contenuto del bianco spettrofotometrico, se utilizzato.

Risultati:

— vitalità cellulare ottenuta a ciascuna concentrazione della sostanza chimica di prova, espressa in vitalità percentuale media dei concomitanti controlli in solvente;

— curve concentrazione-risposta (concentrazione della sostanza chimica di prova rispetto a vitalità cellulare relativa), ottenute negli esperimenti simultanei + Irr e - Irr;

— analisi dei dati delle curve concentrazione-risposta: se possibile, computo/calcolo dell'IC_{50} (+ Irr) e dell'IC_{50} (- Irr);

— confronto delle due curve concentrazione-risposta ottenute in presenza e in assenza di irradiazione, tramite calcolo del PIF o dell'MPE;

— criteri di accettazione del saggio; controllo simultaneo in solvente:

— vitalità assoluta (densità ottica dell'estratto di rosso neutro) delle cellule irradiate e non irradiate;

— dati storici del controllo negativo e con solvente; deviazione media e standard;

— criteri di accettazione del saggio; controllo positivo simultaneo:

▼B

— IC_{50} (+ Irr) e IC_{50} (- Irr) e PIF/PME della sostanza chimica del controllo positivo:

— dati storici riguardanti la sostanza chimica del controllo positivo: IC_{50} (+ Irr) e IC_{50} (- Irr) e PIF/PME; deviazione media e standard.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Lovell W.W. (1993), «A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential», *Toxic. In Vitro*, 7:, pagg. 95-102.

2. Santamaria, L. e Prino, G. (1972), «List of the photodynamic substances», in *Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry,* Vol. 3, parte 1, North Holland Publishing Co. Amsterdam, pagg. XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. e Sladowski, D. (1994), «*In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2», *ATLA, 22,* pagg. 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989), «Photosensitization» in *The science of Photobiology,* a cura di K.C. Smith, Plenum Press, New York, seconda edizione, pagg. 79-110.

5. OCSE (1997), «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water», *Environmental Health and Safety Publications,* Series on *Testing and Assessment* N. 7, Environment Directorate, Parigi.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. e Willshaw, A. (1994), «EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay», *Toxi.c In Vitro, 8,* pagg. 793-796.

7. Anon (1998), «Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity)», Commissione europea, Centro comune di ricerca: ECVAM e DGXI/E/2, 3 novembre 1997, *ATLA,* 26, pagg. 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G,. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. e Brantom, P. (1998), «The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test», *Toxic. In Vitro* 12, pagg. 305-327.

9. OCSE (2002), Riunione estesa di consultazione di esperti su *The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal,* Berlino, 30-31 ottobre 2001, Relazione sintetica finale del Segretariato OCSE, 15 marzo 2002, OCSE ENV/EHS, disponibile presso il Segretariato, su richiesta.

10. Borenfreund, E. e Puerner, J.A. (1985), «Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption», *Toxicology Lett.,* 24, pagg. 119-124.

11. Hay, R.J. (1988), «The seed stock concept and quality control for cell lines», *Analytical Biochemistry,* 171, pagg. 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G. e Kornhauser A. (1996), «Animal models for phototoxicity testing» in *Dermatotoxicology,* a cura di F.N. Marzulli e H.I. Maibach, Taylor & Francis, Washington DC, quinta edizione, pagg. 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M. (1987), «Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes», *Cancer Res.,* 47, pagg. 1825-1829.

14. ISO 10977 (1993), *Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methodsfor measuring image stability.*

15. CIE (1993), *Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICAL REPORT,* n. 90, Vienna, ISBN 3 900 734 275.

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — *Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test,* versione finale, 7 settembre 1998, 18 pagg.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W. e Pfannenbecker, U. (1998), «A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test», *ATLA* 26, pagg. 679-708.

18. Holzhütter, H.G. e Quedenau, J. (1995), «Mathematical modeling of cellular responses to external signals», J. *Biol. Systems* 3, pagg. 127-138.

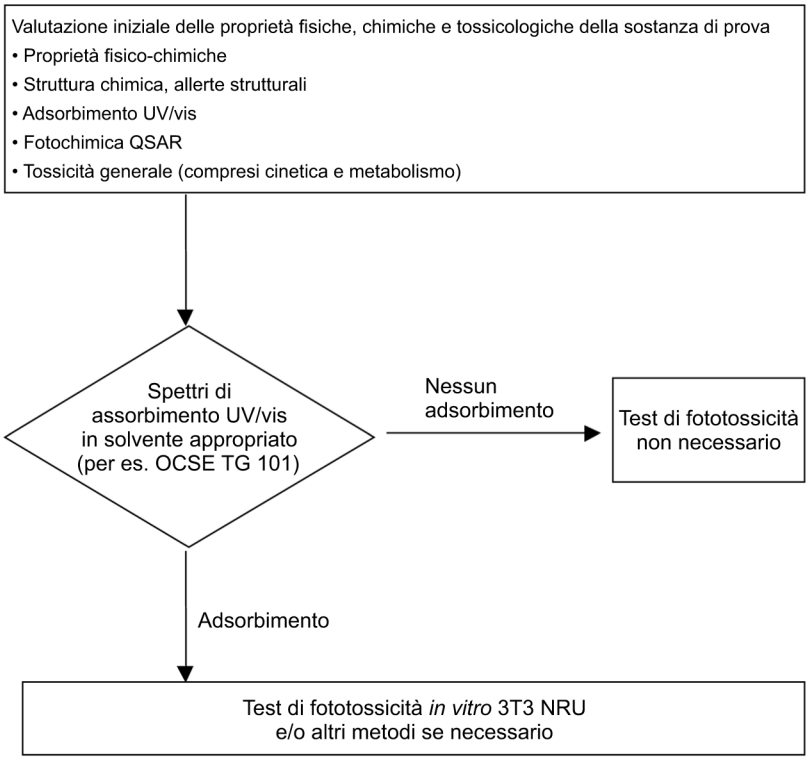
19. Holzhütter, H.G. (1997), «A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals», *ATLA,* 25, pagg. 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

Allegato 1

Ruolo del saggio 3T3 NRU PT in un approccio sequenziale ai saggi di fototossicità delle sostanze chimiche

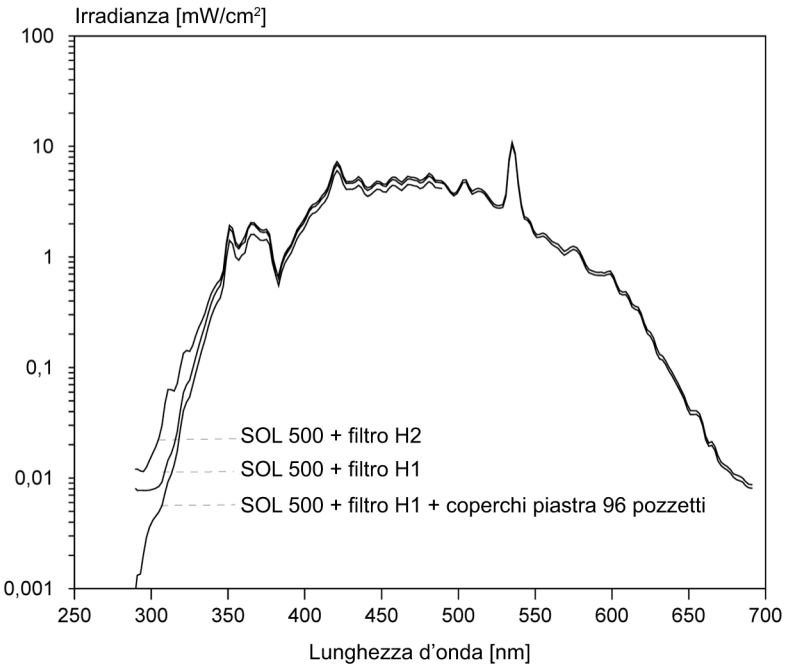


▼B

Allegato 2

Figura 1

Distribuzione spettrale della potenza di un simulatore solare con filtro



(cfr. punto 1.4.1.5, secondo paragrafo)

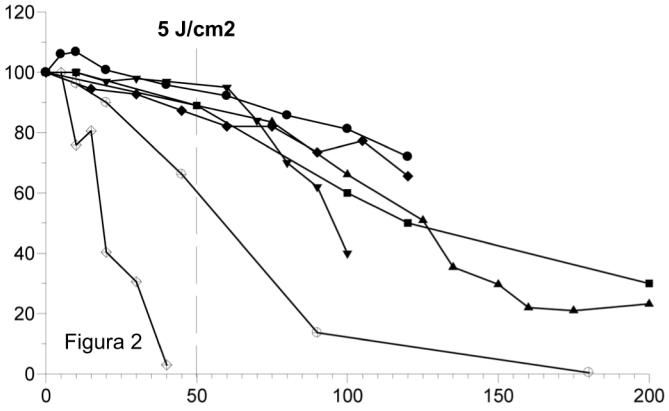
La figura 1 presenta un esempio di una distribuzione spettrale di potenza accettabile di un simulatore solare con filtro. È derivato dal simulatore ad alogenuri metallici (drogati) utilizzato nel trial di validazione del saggio 3T3 NRU PT (6)(8)(17). La figura mostra l'effetto di due diversi filtri e l'effetto filtrante aggiuntivo dato dal coperchio della piastra di coltura cellulare a 96 pozzetti. Il filtro H2 è stato utilizzato solo con sistemi di saggio in grado di tollerare un quantitativo superiore di UVB (saggio su un modello di cute e test di fotoemolisi degli eritrociti). Nel saggio 3T3 NRU-PT è stato usato il filtro H1. La figura mostra che l'effetto filtrante aggiuntivo dato dal coperchio della piastra si osserva principalmente nello spettro UVB, ma lascia ancora radiazioni UVB sufficienti nello spettro di irradiazione da eccitare le sostanze chimiche che in genere assorbono i raggi UVB, come l'amiodarone (cfr. tabella 1).

▼B

Figura 2

Sensibilità all'irradiazione delle cellule Balb/c 3T3 (nelle lunghezze d'onda UVA)

Vitalità cellulare (% assunzione del rosso neutro dei controlli al buio)



tempo di irradiazione (minuti)

(10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(cfr. punti 1.4.1.5.2, secondo paragrafo, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilità delle cellule Balb/c 3T3 all'irradiazione con il simulatore solare utilizzato nel trial di validazione del saggio di fototossicità 3T3 NRU, misurata nelle lunghezze d'onda UVA. La figura illustra i risultati ottenuti nello studio di pre-validazione in 7 laboratori diversi (1). Le due curve con i simboli in chiaro sono state ottenute con cellule vecchie (numero elevato di passaggi), che sono state sostituite da nuove popolazioni di cellule; le curve con i simboli scuri mostrano che le cellule presentano una tolleranza accettabile all'irradiazione.

Da questi dati è stata ricavata la più elevata dose di irradiazione non-citotossica pari a 5 J/cm^2 (linea tratteggiata verticale. La linea tratteggiata orizzontale indica anche l'effetto di irradiazione massimo accettabile fornito al punto 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY**

INTRODUZIONE

1. Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE fondati su tali linee guida vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il metodo di prova (TM) originale per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429; capitolo B.42 del presente allegato) era stato precedentemente adottato (1) e sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a questa associate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L'LLNA aggiornato poggia sulla valutazione dell'esperienza acquisita e dei dati scientifici (12). Questo metodo di prova è il secondo metodo concepito per valutare il potenziale di irritazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. L'altro metodo di prova (OCSE Test Guideline 406; capitolo B.6 del presente allegato) fa ricorso a saggi con porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (13). L'LLNA offre vantaggi rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) dal punto di vista del benessere degli animali. Questo metodo di prova aggiornato sull'LLNA comprende un insieme di standard di prestazione (appendice 1) che può essere usato per valutare lo stato di convalida di metodi di prova nuovi e/o modificati che sono simili, da un punto di vista funzionale e meccanico, all'LLNA, conformemente ai principi del documento orientativo dell'OCSE «OECD Guidance Document n. 34» (14).

2. L'LLNA studia la fase di induzione dell'irritazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per la valutazione dose-risposta. Si deve osservare che i sensibilizzanti di tipo leggero/medio che sono raccomandati come sostanze di controllo positivo (PC) per i saggi sui porcellini d'India (ossia metodo B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) sono adatti anche per l'LLNA (6) (8) (15). In questo metodo di prova è anche descritta l'opzione di un approccio ridotto all'LLNA (rLLNA), che potrebbe prevedere il ricorso fino al 40 % di animali in meno (16) (17) (18). L'rLLNA potrebbe essere impiegato quando vi sia l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di irritabilità cutanea potenziale, purché tutte le altre specifiche del protocollo LLNA siano rispettate, così come descritto nel presente metodo di prova. La previsione di un risultato negativo dovrebbe essere fatta sulla base di tutte le informazioni disponibili elencate al punto 4. Prima di applicare l'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se con l'rLLNA si ottiene, contrariamente alle aspettative, un risultato positivo o equivoco, potrebbe essere necessario effettuare ulteriori saggi per interpretare o chiarire tale risultato. L'rLLNA non è adatto a essere impiegato per l'identificazione dei pericoli delle sostanze irritanti per la cute quando sono necessarie informazioni sulla dose-risposta come la classificazione in una sottocategoria per il regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele e per il Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) delle Nazioni Unite.

DEFINIZIONI

3. Le definizioni utilizzate sono fornite nell'appendice 2.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. L'LLNA costituisce un metodo alternativo da usarsi per identificare le sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA vada usato in sostituzione del test sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili

▼M3

sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimiche-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza dell'LLNA per la sostanza (data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche con l'LLNA — cfr. il punto 5) e servono a scegliere la dose iniziale.

5. L'LLNA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo. Inoltre, l'LLNA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto. L'LLNA è basato sull'attenta valutazione delle manifestazioni immunologiche stimolate dalle sostanze chimiche durante la fase di induzione della sensibilizzazione. Diversamente dai saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), l'LLNA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India (13). Per questo motivo, l'LLNA riduce la sofferenza e il dolore fisico degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406, occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) (ad esempio, risposte falsi negativi nell'LLNA con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei [tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi] (19) (20), o solubilità della sostanza usata per il saggio). Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (21) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Infine, in considerazione della limitata banca dati di validazione, che consisteva prevalentemente in formulati pesticidi, l'LLNA ha maggiori possibilità del saggio sui porcellini d'India di fornire un risultato positivo per questi tipi di sostanze (22). Tuttavia, nel sottoporre a prova le formulazioni, si potrebbe valutare l'opportunità di inserire come sostanze di riferimento sostanze simili con risultati noti, per dimostrare che l'LLNA funziona correttamente (cfr. il punto 16). Fatte salve le restrizioni indicate, si dovrebbe ricorrere all'LLNA per testare qualsiasi sostanza, a meno che una sostanza non possieda proprietà che possono interferire con l'accuratezza dello stesso.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale alla base dell'LLNS è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione dei linfociti nei linfonodi responsabili del drenaggio della zona di applicazione della sostanza sperimentale. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa oggettiva della sensibilizzazione. La proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media osservata in ciascun gruppo sperimentale con quella del controllo trattato con il veicolo (gruppo VC). Occorre determinare il rapporto tra la proliferazione media in ciascun gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito «Indice di stimolazione» (SI), che deve essere ≥ 3 prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente classificata come potenziale. Le procedure qui descritte si basano sull'uso della marcatura radioattiva in vivo per misurare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio. È possibile però impiegare anche altri criteri per la valutazione del numero di cellule in fase di proliferazione, a condizione che lo standard di prestazione sia pienamente soddisfatto (appendice 1).

▼M3

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, del ceppo CBA/Ca o CBA/J, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile utilizzare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta all'LLNA non esistono differenze significative specifiche per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (23), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. Idealmente il valore dovrebbe essere pari al 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertare che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a una procedura di estrazione forzata in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo quando siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile, come una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta sia ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la comparabilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione > 3 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea

▼M3

o tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un indice > 20 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide [Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0] in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v) e un 5 % di mercaptobenzotiazolo (CAS 149-30-4) in *N,N*-dimetilformammide (cfr. l'appendice 1, tabella 1). In determinate circostanze, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).

13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche dovrebbero essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati storica pregressa.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, possono essere messi in dubbio i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico sul controllo positivo accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere i controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo dei controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (12).

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (24). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.

16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze sperimentali. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:

— somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame,

— caratteristiche fisiche/chimiche note,

— dati di supporto provenienti dall'LLNA,

— dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

▼M3

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-14). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (3) e (5). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (3) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).

19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone, olio di oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammide, metiletilchetone, glicole propilenico e dimetilsulfossido (19), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 35). Inoltre, quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale è possibile valutare l'opportunità di ridurre il numero di topi nel gruppo del controllo positivo (12). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. Tuttavia, alcune autorità di regolamentazione potrebbero accettare dati aggregati; in questi casi gli utilizzatori possono scegliere se raccogliere dati individuali o aggregati.

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di dose appropriato per l'LLNA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nello studio LLNA principale, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24) e/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 0). La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o alla concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

▼M3

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA principale, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppo di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazione per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 6). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione) e il giorno 6. Inoltre, il giorno 6, lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un giorno di misurazione qualsiasi (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazione	Punteggio
Nessun segno di eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (33) (34).

24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) (36) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 6, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (37).

▼M3

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

— *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi all'osservazione clinica. Applicare 25 µL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

— *Giorni 2 e 3:* Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

— *Giorni 4 e 5:* Nessun trattamento.

— *Giorno 6:* Registrare il peso di ciascun animale. Iniettare 250 µL di soluzione salina sterile tampone fosfato (PBS) contenente 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) di (^{3}H)-metil timidina triziata a tutti i topi trattati e di controllo, attraverso la vena caudale. In alternativa, iniettare 250 µL di PBS sterile contenente 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) di ^{125}I-iododeossiuridina e 10^{-5}M fluorodeossiuridina a tutti i topi, attraverso la vena caudale. Cinque ore (5 h) dopo, gli animali vanno sottoposti ad eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato per ciascun animale separatamente (sistema del singolo animale), oppure per gruppo sperimentale (sistema del gruppo di trattamento). I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano alla voce bibliografica (12). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante biopsie effettuate all'autopsia).

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Mediante attenta disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm o un'altra tecnica accettabile si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali asportate bilateralmente con il sistema del singolo animale o, in alternativa, con il sistema del gruppo di trattamento. Le cellule linfonodali vanno lavate due volte con abbondante PBS e il DNA è precipitato con acido tricloroacetico al 5 % (TCA) a 4 °C per 18 ore (3). I granuli vanno poi rimessi in sospensione in 1 mL di TCA e quindi trasferiti in fiale di scintillazione contenenti 10 mL di liquido di scintillazione per il conteggio del ^{3}H, oppure trasferiti direttamente in tubi per conteggio gamma per il conteggio dello ^{125}I.

Determinazione della proliferazione delle cellule (radioattività incorporata)

27. L'incorporazione di ^{3}H-metil timidina viene misurata mediante conteggio a β-scintillazione, in disintegrazione per minuto (DPM). L'incorporazione di ^{125}I-iododeossiuridina viene misurata mediante conteggio dello ^{125}I ed espressa ugualmente in DPM. A seconda dell'approccio usato, l'incorporazione viene espressa in DPM/topo (sistema del singolo animale) o DPM/gruppo di trattamento (sistema del gruppo di trattamento).

LLNA ridotto

28. In alcune situazioni, quando c'è l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di potenziale irritazione cutanea, si può ricorrere a un protocollo rLLNA opzionale (16) (17) (18) che prevede l'utilizzo di un numero inferiore di animali, purché siano rispettate tutte le altre specifiche del protocollo LLNA riportate in questo metodo di prova. Prima di ricorrere all'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se si ottiene un risultato positivo o equivoco, può essere necessario effettuare altri saggi per interpretare o chiarire il risultato.

▼M3

29. La riduzione del numero di gruppi di trattamento è l'unica differenza tra il protocollo del metodo LLNA e quello del metodo rLLNA; per tale ragione l'rLLNA non fornisce informazioni sul rapporto dose-risposta. Di conseguenza, l'rLLNA non deve essere usato allorché si devono raccogliere tali informazioni. Come l'LLNA effettuato con più dosi, la concentrazione della sostanza sperimentale valutata nell'rLLNA deve essere la concentrazione massima che non induce palese tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea a livello locale nel topo (cfr. il punto 18).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

30. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (37).

Peso corporeo

31. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre determinare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

32. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. Se si utilizza l'approccio a singolo animale, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi delle DPM per topo calcolate per ogni gruppo di trattamento, compreso il gruppo di controllo positivo, per le medie delle DPM per topo calcolate per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno. Se si applica il sistema del gruppo di trattamento, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo l'incorporazione radioattiva per ciascun gruppo di trattamento per l'incorporazione del gruppo di controllo trattato con veicolo; si ottiene così un SI medio.

33. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione SI $\geq$ 3. Tuttavia, per determinare se un risultato borderline vada considerato positivo possono anche essere utilizzati la potenza della dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi (4)(5)(6).

34. Qualora sia necessario chiarire i risultati ottenuti, occorre prendere in considerazione diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (7).

35. La raccolta di dati sulla radioattività a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo VC parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati «aberranti»).

▼M3

DATI E RELAZIONE

Dati

36. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella. Se si utilizza il sistema del singolo animale, si evidenziano i valori delle disintegrazioni per minuto (DPM) per ciascun animale, i valori DPM medi per gruppo e individuali, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo. Se si utilizza il sistema del gruppo di trattamento, si evidenziano i valori medio/mediano delle DPM e il valore medio degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo.

Relazione sull'esecuzione del saggio

37. La relazione sull'esecuzione del saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

— dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

— dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);

— giustificazione per la scelta del veicolo;

Animali sperimentali

— origine dei topi del ceppo CBA;

— condizioni microbiologice degli animali, se note;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

— dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;

— giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito);

— concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);

— dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri per considerare gli studi positivi o negativi;

— dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

— riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usati;

— dati sui controlli positivi e negativi, paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;

▼M3

— se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

— peso dei singoli topi all'inizio dell'applicazione delle dosi e alla soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;

— momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'irritazione cutanea nel punto di applicazione, per ciascun animale;

— tabella dei valori di DPM individuali (sistema del singolo animale) o valori medi/mediani (sistema del gruppo di trattamento) e dei valori degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di trattamento;

— termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per DPM/animale per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento se si ricorre al sistema del singolo animale;

— indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo, se si ricorre al sistema del singolo animale;

— rapporto dose-risposta;

— analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

— breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]

(13) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 406, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OCSE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OCSE (1987*), Acute Dermal Toxicity,* OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation,* Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Appendice 1

Standard di prestazione per la valutazione di metodi di prova LLNA simili o modificati proposti per l'irritazione cutanea

INTRODUZIONE

1. Scopo degli standard di prestazione (PS) è comunicare il fondamento in base al quale è possibile determinare nuovi metodi di prova, considerati o meno proprietari (ossia tutelati dal diritto d'autore, contrassegnati da marchio, registrati), per avere un'accuratezza e un'affidabilità sufficienti per specifici scopi sperimentali. Tali standard di prestazione, basati su metodi di prova convalidati e accettati, possono essere impiegati per valutare l'affidabilità e l'accuratezza di altri metodi simili (definiti metodi «strutturalmente analoghi»), basati su principi scientifici analoghi, e per misurare o prevedere lo stesso effetto biologico o tossico (14).

2. Prima dell'adozione di un metodo modificato (ossia di potenziali miglioramenti proposti rispetto a un metodo di prova approvato), si dovrebbe effettuare una valutazione per stabilire l'effetto delle modifiche proposte sulla prestazione del saggio e la portata di tali modifiche sulle informazioni disponibili per le altri componenti del processo di convalida. A seconda del numero e della natura delle modifiche proposte, dei dati generati e della documentazione giustificativa di tali modifiche, queste ultime devono essere sottoposte al medesimo processo di convalida descritto per un nuovo saggio o, se del caso, a una valutazione ristretta dell'affidabilità e della pertinenza, sulla scorta di un PS consolidato (14).

3. I metodi simili o le varianti di tali metodi, proposti nel quadro del presente metodo di prova, devono essere valutati per stabilirne l'affidabilità e l'accuratezza, con l'impiego di sostanze chimiche che rappresentano l'intervallo completo dei punteggi di irritazione dell'LLNA. Per evitare un uso ingiustificato degli animali si raccomanda vivamente agli sviluppatori del modello di consultare le autorità competenti prima di iniziare gli studi di convalida, in conformità con il PS e gli orientamenti forniti nell'ambito del presente metodo di prova.

4. Gli standard di prestazione qui specificati fanno riferimento ai seguenti standard armonizzati, usati per valutare la validità di versioni simili o modificate dell'LLNA: US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12). Il PS consiste di componenti essenziali del metodo di prova, sostanze chimiche di riferimento raccomandate e standard per l'accuratezza e l'affidabilità che il metodo proposto dovrebbe soddisfare o superare.

I. **Componenti essenziali del metodo di prova**

5. Per garantire che un metodo LLNA simile o modificato sia funzionalmente e meccanicamente analogo all'LLNA e misuri il medesimo effetto biologico, nel protocollo del metodo di prova devono essere inserite le seguenti componenti:

— la sostanza sperimentale deve essere applicata a livello locale su entrambe le orecchie del topo;

— la proliferazione dei linfociti deve essere misurata nei linfonodi drenanti dal sito di applicazione della sostanza sperimentale;

— la proliferazione dei linfociti deve essere misurata durante la fase di induzione dell'irritazione cutanea;

▼M3

— per le sostanze sperimentali, la dose più elevata selezionata dovrebbe essere la concentrazione massima che non induce tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo. Per le sostanze chimiche di riferimento positive, la dose massima dovrebbe essere almeno la stessa dei valori EC3 LLNA delle corrispondenti sostanze di riferimento (cfr. la tabella 1) senza produrre tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo;

— in ogni studio deve essere inserito un controllo trattato con veicolo (VC) parallelo e, se del caso, dovrebbe essere usato anche un controllo positivo parallelo;

— devono essere usati almeno quattro animali per gruppo di trattamento;

— possono essere raccolti dati individuali o aggregati.

Se uno qualsiasi di tali criteri non è soddisfatto, gli standard di riferimento non possono essere usati per convalidare il metodo simile o modificato.

II. **Elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento**

6. Gli standard armonizzati US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12) identificano un minimo di 18 sostanze chimiche di riferimento obbligatorie e 4 sostanze di riferimento facoltative (ossia sostanze che hanno prodotto risultati falsi positivi o falsi negativi nell'LLNA rispetto ai risultati ottenuti sull'uomo o sui porcellini d'India (B.6 o OCSE Test Guideline 406) (13), e pertanto offrono l'opportunità di dimostrare un rendimento uguale o migliore rispetto all'LLNA), che sono incluse nello standard di prestazione dell'LLNA. I criteri di selezione per individuare tali sostanze chimiche sono:

— l'elenco delle sostanze chimiche di riferimento conteneva i tipi di sostanze che solitamente vengono testate per il loro potenziale di irritazione cutanea e la gamma di risposte che l'LLNA è in grado di misurare o prevedere;

— le sostanze possedevano strutture chimiche ben definite;

— per ogni sostanza erano disponibili dati dell'LLNA ottenuti da saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) e (se del caso) dati ottenuti dall'uomo;

— le sostanze potevano essere facilmente reperite sul mercato.

Le sostanze chimiche di riferimento raccomandate sono elencate nella tabella 1. Gli studi che utilizzano le sostanze chimiche di riferimento proposte devono essere valutati nel veicolo con cui sono elencate nella tabella 1. Nell'eventualità in cui una sostanza elencata non sia disponibile, con un'adeguata giustificazione possono essere usate altre sostanze che soddisfano i criteri di selezione menzionati.

▼M3

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per lo standard di Prestazione dell'LLNA

Numero	Sostanze chimiche ([1])	CAS	Forma	Veic. ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
1	5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one (CMI)/2-metil-4-isotiazolin-3-one (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilediammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloruro di cobalto	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenolo	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citrale	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenolo	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil benzoato	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcol cinnamico	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil urea	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metilmetacrilato	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzene	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanolo	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Numero	Sostanze chimiche ([1])	CAS	Forma	Veic. ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
16	Acido lattico	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato di metile	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Acido salicilico	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Sostanze opzionali per dimostrare un migliorato rendimento relativo all'LLNA										
19	Laurilsolfato di sodio	151-21-3	Sol.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liq.	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xilene	1330-20-7	Liq.	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloruro di nichel	7718-54-9	Sol.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abbreviazioni: AOO = acetone: olio di oliva (4:1, v/v); CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetilformammide; DMSO = dimetilsolfossido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenzene; EC3 = concentrazione stimata necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a 3; GP = risultato del saggio sul porcellino d'India (ossia B. 6 o OCSE Test Guideline 406) (13); HCA = aldeide esil cinnamica; Liq = liquido; LLNA = risultato del saggio local lymph node assay eseguito sui topi (ossia. B. 42 o OCSE Test Guideline 429) (1); MEK = metiletilchetone; NA = non applicabile perché l'indice di stimolazione < 3; NC = non calcolato perché i dati sono stati ottenuti da un unico studio; Sol = solido; Veic. = veicolo del saggio.

(*) Si presume che sia un non irritante nell'uomo, per il fatto che non sono stati raccolti risultati da saggi epicutanei clinici, la sostanza non è stata inclusa come allergene in kit di saggi epicutanei e non sono stati segnalati casi di irritazione nell'uomo.

(**) non sono disponibili dati raccolti da saggi condotti su porcellini d'India.

([1]) Le sostanze chimiche devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

([2]) A causa del potenziale impatto di veicoli diversi sul rendimento dell'LLNA, per ogni sostanza di riferimento deve essere utilizzato il veicolo raccomandato (24)(32).

([3]) Valori medi nel caso in cui fossero disponibili più valori EC3. Per le sostanze negative (ossia con indice di stimolazione < 3) è fornita la concentrazione più elevata testata).

([4]) Numero di studi LLNA da cui sono stati ottenuti dati.

([5]) Disponibile in commercio con la denominazione Kathon CG (CAS 55965-84-9), che è una miscela 3:1 di CMI e MI. Le concentrazioni relative di ciascuna componente vanno dall'1,1 % all'1,25 % (CMI) e dallo 0,3 % allo 0,45 % (MI). Le componenti inattive sono sali di magnesio (dal 21,5 % al 24 %) e nitrato rameico (dallo 0,15 % allo 0,17 %), con la rimanente formulazione dal 74 % al 77 % d'acqua. Kathon CG è messa a disposizione da Sigma-Aldrich e da Rohm and Haas (ora Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Standard di affidabilità e accuratezza definiti**

7. L'accuratezza di un metodo simile o modificato rispetto all'LLNA deve soddisfare o superare gli standard di prestazione dell'LLNA allorché è valutata sulla base delle 18 sostanze di riferimento minime che è obbligatorio utilizzare. Il metodo nuovo o modificato deve poter essere classificato correttamente sulla base di una decisione «sì/no». Tuttavia, il metodo nuovo o modificato potrebbe non classificare correttamente tutte le sostanze chimiche di riferimento minime che devono essere utilizzate. Se, per esempio, uno degli irritanti deboli fosse erroneamente classificato, per dimostrare un rendimento equivalente si potrebbe considerare l'opportunità di spiegarne l'errata classificazione e di fornire dati supplementari adeguati (ad esempio, risultati di saggi che forniscono classificazioni corrette per altre sostanze con proprietà fisiche, chimiche e irritanti simili a quelle della sostanza chimica di riferimento in questione). In questi casi, lo stato di convalida del metodo di prova LLNA nuovo o modificato sarebbe valutato caso per caso.

Riproducibilità all'interno del laboratorio di prova

8. Per stabilire la riproducibilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, un metodo LLNA nuovo o modificato dovrebbe essere valutato utilizzando una sostanza irritante ben caratterizzata nell'LLNA. Pertanto, gli standard di riferimento dell'LLNA sono basati sulla variabilità dei risultati da saggi ripetuti dell'aldeide esil cinnamica (HCA). Al fine di valutare l'affidabilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, i valori soglia della concentrazione stimata (ECt) per l'HCA devono essere ottenuti in quattro distinte occasioni, lasciando trascorrere almeno una settimana tra ciascun test. Una riproducibilità accettabile all'interno del laboratorio è indicata dalla capacità del laboratorio di ottenere, per ciascun saggio con l'HCA, valori ECt compresi tra il 5 % e il 20 %, che rappresentano un intervallo di 0,5-2,0 volte il valore EC3 medio specificato per l'HCA (10 %) nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

Riproducibilità tra laboratori

9. Per stabilire la riproducibilità tra laboratori di un metodo LLNA nuovo o modificato si dovrebbero utilizzare due sostanze irritanti ben caratterizzate nell'LLNA. Gli standard di prestazione dell'LLNA dipendono dalla variabilità dei risultati dei saggi condotti con l'HCA e il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) in laboratori diversi. I valori ECt devono essere ottenuti in maniera indipendente da un unico studio condotto in almeno tre laboratori distinti. Per dimostrare una riproducibilità accettabile tra laboratori, ogni laboratorio dovrebbe ottenere valori ECt del 5 % fino al 20 % per l'HCA e dello 0,025 % fino allo 0,1 % per il DNCB, che rappresentano l'intervallo di 0,5-2,0 volte le concentrazioni EC3 medie specificate per l'HCA (10 %) e il DNCB (0,05 %), rispettivamente, nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

▼M3

Appendice 2

Definizioni

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza», per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (14).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonte o fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Soglia di concentrazione stimata (ECt): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione indicativo di una risposta positiva.

Concentrazione stimata tre (EC3): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a tre.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando la stessa sostanza di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (14).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: la misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (14).

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento convalidato e accettato. Tale metodo di prova potrebbe essere candidato a convalide accelerate (catch-up validation). Usato in maniera intercambiabile con un metodo di prova simile (14).

Osservazione aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Standard di prestazione (PS): standard basati su un metodo di riferimento convalidato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) i componenti essenziali del metodo; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento convalidato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento convalidato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (14).

Metodo di prova proprietario: un metodo di prova la cui fabbricazione e distribuzione è limitata da brevetti, diritti d'autore, marchi ecc.

▼**M3**

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti da coloro che eseguono le prove.

Sostanze chimiche di riferimento: sostanze chimiche selezionate per essere utilizzate nella procedura di convalida, di cui sono già note le risposte nel sistema di prova di riferimento in vitro o in vivo o le specie di interesse. Tali sostanze chimiche dovrebbero essere rappresentative delle classi di sostanze chimiche per le quali si prevede di utilizzare il metodo di prova, e dovrebbero rappresentare l'intera gamma di risposte prevedibili delle sostanze chimiche per le quali il metodo di prova può essere usato, ossia da forte a debole a negativa. Gruppi diversi di sostanze di riferimento possono essere richiesti per le diverse fasi del processo di convalida e per i diversi metodi di prova e utilizzi della prova (14).

Pertinenza: descrizione del rapporto del saggio con l'effetto di interesse e se esso è significativo e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui il saggio misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (14).

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (14).

Irritazione cutanea: un processo immunologico che si verifica quando un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di convalida per determinare la rilevanza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato (14).

▼B

B.43. **STUDI DI NEUROTOSSICITÀ NEI RODITORI**

1. **METODO**

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 424 (1997).

Il suo scopo è permettere di ricavare le informazioni necessarie per confermare o caratterizzare in modo più accurato la potenziale neurotossicità di sostanze chimiche in animali adulti. Può essere abbinato a metodi esistenti utilizzati per studi di tossicità per dose ripetuta, oppure essere utilizzato in uno studio a sé stante. Per la concezione di studi basati sul suo utilizzo, si raccomanda di consultare il documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), in particolare nel caso in cui siano previste modifiche delle osservazioni e dei procedimenti raccomandati per l'uso routinario di questo metodo. Tale documento, infatti, è stato elaborato allo scopo di facilitare la scelta di altri procedimenti da utilizzare in casi specifici.

La valutazione della neurotossicità sullo sviluppo non rientra nell'oggetto di questo metodo.

1.1 INTRODUZIONE

Per la valutazione delle caratteristiche tossiche delle sostanze chimiche, è importante prendere in considerazione la loro capacità potenziale di causare effetti neurotossici. Il metodo utilizzato per i saggi di tossicità sistemica per dose ripetuta prevede già osservazioni intese a individuare una potenziale neurotossicità. Il metodo oggetto del presente documento può essere utilizzato per disegnare uno studio che consenta di ricavare maggiori informazioni o di confermare gli effetti neurotossici osservati negli studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Tuttavia, per talune classi di sostanze chimiche, di cui è nota la potenziale neurotossicità, può essere opportuno utilizzare questo metodo anche in assenza di indicazioni di una potenziale neurotossicità emerse da studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Depongono a favore di questo approccio, ad esempio:

— l'osservazione di segni neurologici o lesioni neuropatologiche in studi di tossicità diversi dagli studi di tossicità per dose ripetuta, oppure

— l'affinità strutturale o altre informazioni che indicano una correlazione tra tali sostanze e neurotossici noti.

L'uso di questo metodo può essere opportuno anche in altri casi; per maggiori indicazioni a questo riguardo, si rimanda alla voce bibliografica (1).

Nell'elaborazione di questo metodo, si è posta particolare attenzione alla possibilità di un suo adattamento a necessità specifiche di conferma della specifica neurotossicità istopatologica e comportamentale di una sostanza chimica, nonché di caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche.

▼B

In passato, si faceva coincidere la neurotossicità con la neuropatia, che comporta lesioni neuropatologiche o disfunzioni neurologiche quali convulsioni, paralisi o tremore. La neuropatia è indubbiamente una manifestazione importante di neurotossicità, ma oggi appare evidente che vi sono molti altri segni di tossicità per il sistema nervoso centrale (p. es. la perdita della coordinazione motoria, i deficit sensoriali, le disfunzioni dell'apprendimento e della memoria) che possono non emergere negli studi sulla neuropatia o in altri tipi di studi.

Questo metodo per la conduzione di studi di neurotossicità ha lo scopo di consentire l'individuazione di effetti neurocomportamentali e neuropatologici di rilievo nei roditori adulti. Gli effetti comportamentali, anche in assenza di modificazioni morfologiche, possono essere indicativi di un effetto avverso sull'organismo; viceversa, non tutte le modificazioni comportamentali sono riconducibili in modo specifico al sistema nervoso centrale. Per questo motivo, tutte le modificazioni osservate devono essere valutate insieme a dati correlati di tipo istopatologico, ematologico o biochimico, nonché a dati riguardanti altri tipi di tossicità sistemica. Ai fini della caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche, questo metodo prevede tra l'altro specifici esami istopatologici e comportamentali che possono essere ulteriormente supportati da indagini elettrofisiologiche e/o biochimiche (1)(2)(3)(4).

I neurotossici possono agire su diversi target del sistema nervoso e con svariati meccanismi. Dato che non esiste un unico insieme di test che permetta di valutare in modo approfondito e completo il potenziale neurotossico di ogni sostanza, può essere necessario ricorrere ad altri test *in vivo* o in vitro specifici per il tipo di neurotossicità osservata o attesa.

Questo metodo di saggio può essere anche usato, insieme alle indicazioni riportate nel documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), per disegnare studi che permettano di caratterizzare in modo più accurato la quantificazione dose-risposta o migliorarne la sensibilità in modo da poter stimare meglio il NOAEL (livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi) o documentare rischi noti o sospetti associati alla sostanza chimica. Ad esempio, può essere utilizzato per disegnati studi intesi a identificare e valutare il meccanismo o i meccanismi di neurotossicità, oppure a integrare i dati già disponibili ricavati da procedure di base per l'osservazione degli effetti neurocomportamentali o neuropatologici. Non è necessario che tali studi producano gli stessi dati che si ricaverebbero applicando i procedimenti standard raccomandati in questo metodo, se tali dati sono già disponibili e non sono ritenuti necessari per l'interpretazione dei risultati dello studio.

Questo studio di neurotossicità, usato da solo o in abbinamento ad altri studi, permette di ricavare informazioni utili per:

— stabilire se la sostanza chimica esaminata provoca effetti permanenti o reversibili sul sistema nervoso;

— caratterizzare con maggior precisione le alterazioni del sistema nervoso associate all'esposizione alla sostanza chimica, e comprendere il meccanismo alla base di tali alterazioni;

▼B

— determinare le relazioni dose-risposta e tempo-risposta al fine di stimare un livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi (a sua volta utilizzabile per stabilire criteri di sicurezza per la sostanza chimica in questione).

Questo metodo di saggio prevede la somministrazione orale della sostanza da esaminare. In talune circostanze può essere preferibile usare altre vie di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione); in tal caso può essere necessaria una modifica dei procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione negli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche.

1.2 DEFINIZIONI

Effetto avverso: alterazione rispetto alle condizioni di base, riferibile al trattamento somministrato, che riduce la capacità di un organismo di sopravvivere, riprodursi o adattarsi all'ambiente.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso (g, mg), oppure in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg), oppure concentrazione costante nella dieta (ppm).

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Neurotossicità: modificazione avversa che si produce nella struttura o nella funzione del sistema nervoso centrale in seguito all'esposizione a un agente chimico, biologico o fisico.

Neurotossico: agente chimico, biologico o fisico potenzialmente in grado di causare neurotossicità.

NOAEL: abbreviazione dell'inglese no observed adverse effect level; designa il livello di dose massimo in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza chimica in esame viene somministrata per via orale in un range di dosi a diversi gruppi di roditori da laboratorio. Normalmente sono necessarie dosi ripetute, e il regime di somministrazione può essere di 28 giorni, subcronico (90 giorni) o cronico (1 anno o più). I procedimenti indicati in questo metodo sono utilizzabili anche per studi di neurotossicità acuta. Il saggio eseguito sugli animali ha lo scopo di consentire l'individuazione o la caratterizzazione di anomalie del comportamento e/o neurologiche. In ciascun periodo di osservazione viene valutata una serie di comportamenti che potrebbero essere influenzati dai neurotossici. Al termine del saggio, all'interno di ciascun gruppo un sottogruppo di animali di ciascun sesso viene sottoposto a perfusione in situ e prelievo di tessuti del cervello, del midollo spinale e dei nervi periferici, destinati a un successivo esame.

Nel caso di studi a sé stanti condotti per determinare la neurotossicità di una sostanza o per caratterizzarne gli effetti neurotossici, gli animali di ciascun gruppo non utilizzati per la perfusione e il successivo esame istopatologico (vedi tabella 1) possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici allo scopo di completare i dati ricavati dagli esami standard previsti da questo metodo (1). Questi esami supplementari possono essere particolarmente utili qualora osservazioni empiriche o gli effetti attesi indichino che l'azione neurotossica della sostanza in esame si esercita su un tipo specifico di bersaglio. Altrimenti, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per valutazioni analoghe a quelle previste da questo metodo nell'ambito di studi di tossicità per dose ripetuta nei roditori.

▼B

Quando gli esami previsti da questo metodo sono abbinati a esami previsti da altri metodi, è necessario disporre di un numero sufficiente di animali per poter eseguire le osservazioni richieste da entrambi gli studi.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta della specie di animali**

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori, fornendone adeguata motivazione. Gli animali utilizzati devono essere adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Di norma, la somministrazione deve iniziare quanto prima possibile dopo il divezzamento, preferibilmente prima che gli animali abbiano raggiunto le sei settimane di età e in ogni caso prima che abbiano raggiunto le nove settimane di età. Tuttavia, quando questo studio viene eseguito in abbinamento ad altri studi, può essere necessario un aggiustamento del criterio relativo all'età degli animali. All'inizio dello studio, il peso degli animali deve essere del ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Quando uno studio per dose ripetuta di breve durata serve da studio preliminare per uno studio a lungo termine, nei due studi devono essere utilizzati animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

1.4.2 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. I rumori forti intermittenti devono essere ridotti al minimo. Per l'alimentazione, si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscelazione della sostanza in esame, allorché essa viene somministrata con questo metodo. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso.

1.4.3 **Preparazione degli animali**

L'assegnazione al gruppo di trattamento e al gruppo di controllo viene effettuata in modo casuale scegliendo animali giovani e sani. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali devono essere identificati in modo univoco e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Via di somministrazione e preparazione delle dosi**

Questo metodo prevede espressamente la somministrazione orale della sostanza da esaminare. La somministrazione può essere effettuata per via intragastrica, con gli alimenti, nell'acqua di bevanda o mediante capsule. Si possono utilizzare anche altre vie di somministrazione (ad es. cutanea o per inalazione), ma in questo caso può essere necessario modificare i procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione degli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche. Si devono comunque indicare i motivi della scelta della via di somministrazione e le conseguenti modifiche dei procedimenti previsti da questo metodo.

▼B

Se necessario, la sostanza da esaminare può essere disciolta o sospesa in un veicolo adatto. Ove possibile, si raccomanda di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, oppure, come seconda alternativa, una soluzione/sospensione in olio (per esempio olio di mais), o infine una soluzione/sospensione in altri veicoli. Le caratteristiche di tossicità del veicolo devono essere note. È opportuno inoltre verificare le seguenti caratteristiche del veicolo: effetti del veicolo sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza in esame che potrebbero alterare le caratteristiche tossiche di tale sostanza; ed effetti sul consumo di cibo o di acqua o sullo stato nutrizionale degli animali.

1.5 PROCEDIMENTI

1.5.1 **Numero e sesso degli animali**

Quando lo studio viene condotto come studio a sé stante, ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve essere composto almeno da 20 animali (10 femmine e 10 maschi) ai fini della valutazione delle osservazioni cliniche e funzionali dettagliate. Al termine dello studio, almeno cinque maschi e cinque femmine, scelti tra questi 10 maschi e 10 femmine, devono essere sottoposti a perfusione in situ e a esame neuroistopatologico dettagliato. Nei casi in cui solo un numero limitato di animali all'interno di un determinato gruppo di trattamento venga sottoposto a osservazione per rilevare segni di effetti neurotossici, è opportuno includere tali animali tra quelli scelti per la perfusione. Quando lo studio viene condotto in abbinamento a uno studio di tossicità per dose ripetuta, si deve prevedere l'utilizzo di un numero di animali sufficiente per gli obiettivi di entrambi gli studi. Nella tabella 1 è riportato, per varie combinazioni di studi, il numero minimo di animali da utilizzare per ciascun gruppo. Se sono previsti sacrifici intermedi nel corso dello studio, o gruppi di recupero per l'osservazione della reversibilità, della persistenza o della comparsa tardiva di effetti tossici dopo il trattamento, oppure se sono previste osservazioni supplementari, il numero di animali deve essere opportunamente aumentato affinché sia disponibile il numero di animali necessario per l'osservazione e l'esame istopatologico.

1.5.2 **Gruppi di trattamento e gruppo di controllo**

In genere si devono utilizzare almeno tre gruppi di trattamento a dosi diverse e un gruppo di controllo; tuttavia, se la valutazione di altri dati porta a prevedere l'assenza di effetti a una dose ripetuta di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, può essere eseguito un saggio limite. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati si può effettuare uno studio preliminare di tipo range finding. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari del gruppo di controllo. Qualora la sostanza da saggiare venga incorporata in un veicolo, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

1.5.3 **Controllo di attendibilità**

Il laboratorio che esegue lo studio deve presentare dati che dimostrino la capacità dello stesso di eseguire lo studio, nonché la sensibilità dei procedimenti utilizzati. Tali dati devono provare la capacità di individuare e quantificare, nel modo più opportuno, modificazioni dei diversi endpoint di cui è raccomandata l'osservazione, quali segni autonomici, reattività sensoriale, forza di prensione e attività motoria. Per informazioni su sostanze chimiche che causano vari tipi di risposte neurotossiche e che possono essere utilizzate come sostanze di controllo positivo si rimanda alle voci bibliografiche da (2) a (9). È ammesso l'uso di dati storici, che si raccomanda di aggiornare periodicamente, a condizione che siano identici gli aspetti essenziali dei procedimenti sperimentali. Nuovi dati che dimostrino che i procedimenti continuano a essere sensibili devono essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio o dei procedimenti.

▼B

1.5.4 **Scelta della dose**

I livelli di dose devono essere scelti tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e sulle caratteristiche cinetiche della sostanza da esaminare o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere tale da indurre effetti neurotossici o chiari effetti tossici sistemici. Deve essere inoltre definita una serie decrescente di livelli di dose al fine di individuare un'eventuale risposta dose-correlata e l'assenza di effetti avversi osservati al livello di dose più basso (NOAEL). In linea di massima, i livelli di dose devono essere tali da consentire di distinguere gli effetti tossici primari sul sistema nervoso dagli effetti legati alla tossicità sistemica. Per la determinazione dei livelli di dose decrescenti risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e tre; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (ad esempio superiore a un fattore 10) tra un dosaggio e l'altro. Se esistono stime attendibili sull'esposizione umana prevista, se ne deve tenere conto.

1.5.5 **Saggio limite**

Se uno studio effettuato conformemente al metodo descritto con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno non produce effetti neurotossici osservabili e se i dati relativi a composti di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario eseguire uno studio completo con tre livelli di dose. In funzione dell'esposizione umana prevista può essere opportuno utilizzare un livello di dose orale più elevato nel saggio limite. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio per inalazione o applicazione cutanea, il livello massimo di esposizione realizzabile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza da esaminare. La dose da utilizzare in un saggio limite per uno studio di neurotossicità acuta per via orale deve essere di almeno 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza viene somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di almeno 28 giorni. La scelta di somministrare la sostanza cinque giorni alla settimana o per un periodo più breve deve essere opportunamente motivata. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta sola dipende dalla taglia dell'animale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere fino a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo variando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta o con l'acqua, è importante verificare che le quantità da utilizzare non alterino il normale bilancio idrico o nutrizionale. Se la sostanza è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso degli animali, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata per via intragastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e all'occorrenza modificata per mantenere costante il livello di dose rispetto al peso dell'animale. Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare per dose ripetuta, la dieta degli animali deve essere identica nei due studi. Per gli studi acuti, nel caso in cui non sia possibile effettuare la somministrazione in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

▼B

1.6 OSSERVAZIONE

1.6.1 **Frequenza delle osservazioni e degli esami**

Negli studi per dose ripetuta, il periodo di osservazione deve coprire il periodo della somministrazione. Negli studi acuti, l'osservazione deve estendersi ai 14 giorni successivi al trattamento. Nel caso degli animali dei gruppi satellite, per i quali è previsto un periodo post-trattamento senza esposizione, l'osservazione deve comprendere anche questo periodo.

Le osservazioni devono essere effettuate con frequenza tale da assicurare la massima probabilità che vengano individuate le anomalie comportamentali e/o neurologiche. Le osservazioni devono essere effettuate preferibilmente ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. La frequenza delle osservazioni cliniche e degli esami funzionali è riassunta nella tabella 2. Se in base ai dati cinetici o di altro tipo ricavati in precedenza appare necessario effettuare le osservazioni o gli esami funzionali in momenti diversi rispetto a quelli previsti o variare i periodi post-osservazione, deve essere elaborato un programma alternativo che consenta di ricavare quante più informazioni possibile. Queste variazioni devono essere adeguatamente motivate.

1.6.1.1 *Osservazione delle condizioni generali di salute e della mortalità/-morbilità*

Tutti gli animali devono essere esaminati attentamente almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute e almeno due volte al giorno per determinare la morbilità e la mortalità.

1.6.1.2 *Osservazioni cliniche dettagliate*

Osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite su tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1) una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e successivamente a diversi intervalli, in funzione della durata dello studio (vedi tabella 2). Nel caso degli animali dei gruppi satellite di recupero, le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite al termine del periodo di recupero. Le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite fuori dalle gabbie, collocando gli animali in un recinto standard. Le osservazioni devono essere accuratamente registrate, possibilmente utilizzando sistemi di punteggio che comprendano criteri o scale di punteggi esplicitamente definiti dal laboratorio che esegue il saggio per ciascuna delle misurazioni effettuate. Le variazioni delle condizioni sperimentali devono essere minime (non legate sistematicamente al trattamento) e le osservazioni devono essere condotte da osservatori preparati non a conoscenza del trattamento somministrato.

Si raccomanda di eseguire le osservazioni in modo strutturato, così da applicare sistematicamente criteri ben definiti (compresa la definizione del range normale) a ciascun animale in ciascuna osservazione. Il range normale deve essere adeguatamente documentato. Tutti i segni osservati devono essere registrati. Ogniqualvolta ciò sia possibile, deve essere registrata anche l'entità dei segni osservati. Le osservazioni cliniche devono riguardare, tra l'altro, tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonomica (ad es. lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione, e variazione di colore dell'urina).

▼B

Deve essere registrata anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (ad es. maggiore o minore esplorazione del recinto standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (ad es. andatura anserina, atassia), della postura (ad es. gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipi (ad es. tolettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (ad es. tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

1.6.1.3 *Esami funzionali*

Analogamente alle osservazioni cliniche dettagliate, anche gli esami funzionali devono essere eseguiti una volta prima dell'esposizione e successivamente a intervalli frequenti in tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1). La frequenza degli esami funzionali dipende anche dalla durata dello studio (vedi tabella 2). Oltre che agli intervalli indicati nella tabella 2, nei gruppi satellite di recupero devono essere effettuate osservazioni funzionali anche quanto più vicino possibile al sacrificio finale. Tra gli esami funzionali dev'essere compresa la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo [ad es. stimoli uditivi, visivi e propriocettivi (5)(6)(7)], della forza di prensione (8) e dell'attività motoria (9). L'attività motoria deve essere misurata con un dispositivo automatizzato in grado di rilevare sia un aumento che una diminuzione della stessa. Se si utilizza un altro sistema, questo deve essere quantitativo e presentare sensibilità e affidabilità dimostrate. Ciascun dispositivo deve essere collaudato per garantire l'affidabilità nel tempo e l'omogeneità delle sue caratteristiche rispetto a quelle degli altri dispositivi. Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Se non esistono dati (ad es. struttura-attività, dati epidemiologici, altri studi tossicologici) che indicano i potenziali effetti neurotossici, è opportuno prevedere l'esecuzione di esami più specifici sulla funzione sensoriale e motoria o sull'apprendimento e sulla memoria per valutare in maggior dettaglio questi possibili effetti. Per ulteriori informazioni sugli esami più specifici e sul loro impiego, si rimanda alla voce bibliografica (1).

In via eccezionale, gli animali che presentano segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con gli esami funzionali possono essere esclusi da tali esami, fornendone opportuna motivazione.

1.6.2 **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua**

Negli studi di durata fino a 90 giorni, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana e almeno settimanalmente deve essere determinato il loro consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua). Negli studi a lungo termine, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta ogni quattro settimane. Il consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua) deve essere misurato almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente a intervalli di circa tre mesi, sempreché non appaia opportuno modificare tale frequenza alla luce dello stato di salute degli animali o di variazioni del loro peso corporeo.

▼B

1.6.3 **Esame oftalmologico**

Per studi di durata superiore a 28 giorni deve essere effettuato un esame oftalmologico, utilizzando un oftalmoscopio o uno strumento equivalente adatto, prima della somministrazione della sostanza in esame e al termine dello studio, preferibilmente su tutti gli animali e in ogni caso almeno sugli animali del gruppo di trattamento a dose elevata e del gruppo di controllo. In presenza di modificazioni degli occhi o di segni clinici che ne indichino l'opportunità, l'esame deve essere effettuato su tutti gli animali. Negli studi a lungo termine, l'esame oftalmologico deve essere effettuato anche alla tredicesima settimana. Gli esami oftalmologici non sono necessari se i relativi dati possono essere ricavati da altri studi di durata e con livelli di dose simili.

1.6.4 **Esami ematologici e biochimici clinici**

Quando lo studio di neurotossicità viene effettuato in abbinamento a uno studio di tossicità sistemica per dose ripetuta, devono essere eseguiti gli esami ematologici e biochimici-clinici previsti dal metodo dello studio di tossicità sistemica. Il prelievo dei campioni deve avvenire in modo da ridurre al minimo i potenziali effetti neurocomportamentali.

1.6.5 **Esame istopatologico**

L'esame neuropatologico deve integrare e ampliare le osservazioni effettuate nella fase *in vivo* dello studio. A tal fine, si deve procedere alla fissazione in situ dei tessuti di almeno 5 animali/sesso/gruppo (vedi tabella 1 e il seguente paragrafo), utilizzando tecniche di perfusione e fissazione generalmente accettate [vedi voce bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Tutte le modificazioni macroscopiche osservabili devono essere registrate. Se lo studio è eseguito come studio a sé stante per la valutazione della neurotossicità o la caratterizzazione degli effetti neurotossici, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali (10)(11), neuropatologici (10)(11)(12)(13), neurochimici (10)(11)(14)(15) o elettrofisiologici (10)(11)(16)(17) a integrazione dei test e degli esami qui descritti, o sottoposti anch'essi a esame istopatologico. Questi esami supplementari sono particolarmente utili quando, in base a osservazioni empiriche o agli effetti attesi, si prevede un tipo specifico di neurotossicità o un target specifico (2)(3). In alternativa, gli animali rimanenti possono essere anch'essi utilizzati per le valutazioni patologiche di routine descritte nel metodo relativo agli studi per dose ripetuta.

Tutti i campioni di tessuti, inclusi in paraffina, devono essere colorati con un procedimento di colorazione generale, ad esempio con ematossilina-eosina, quindi sottoposti a esame microscopico. Se si osservano o si sospettano segni di neuropatia periferica, si deve procedere all'esame di campioni di tessuti di nervi periferici inclusi in plastica. In base ai segni clinici, può essere opportuno estendere l'esame ad altri siti o utilizzare procedure di colorazione speciali. Per indicazioni sugli ulteriori siti da esaminare si rimanda alle voci bibliografiche (3)(4). Può essere utile anche utilizzare opportuni coloranti speciali per provare tipi specifici di modificazioni patologiche (18).

▼B

Sezioni rappresentative del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico devono essere sottoposte a esame istologico [vedi voce bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Di norma, i prelievi tissutali devono essere effettuati almeno su: prosencefalo, area centrale del cervello, compresa una sezione che attraversi l'ippocampo, mesencefalo, cervelletto, ponte, midollo allungato, occhio con nervo ottico e retina, midollo spinale a livello dei rigonfiamenti cervicale e lombare, gangli della radice dorsale, fibre della radice dorsale e ventrale, nervo sciatico prossimale, nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e ramificazioni del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e i nervi periferici, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali. Deve essere osservata la vascolarizzazione del sistema nervoso. Deve essere esaminato anche un campione di muscolo scheletrico, in particolare dei muscoli del polpaccio. Particolare attenzione deve essere rivolta a punti del SNC e SNP con strutture e modelli cellulari e delle fibre notoriamente molto sensibili all'azione dei neurotossici.

Indicazioni sulle alterazioni neuropatologiche tipiche indotte dall'esposizione a tossici sono contenute nelle voci bibliografiche (3)(4). Si raccomanda di sottoporre i campioni tissutali a un esame articolato in più fasi. Innanzitutto, si devono confrontare sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo trattato con dose elevata a sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo di controllo. Se non vengono osservate alterazioni neuropatologiche, non sono necessarie ulteriori analisi. Se invece vengono osservate alterazioni neuropatologiche nel gruppo trattato con dose elevata, si procede assegnando un numero di codice ed esaminando sequenzialmente campioni di ciascuno dei tessuti potenzialmente interessati prelevati da esemplari dei gruppi trattati con dose intermedia e con dose bassa.

Se all'esame qualitativo vengono riscontrate alterazioni neuropatologiche, deve essere effettuato un secondo esame su tutte le regioni del sistema nervoso che manifestano tali alterazioni. Dopo aver assegnato un codice a tutte le sezioni prelevate da ciascuna delle regioni potenzialmente interessate in tutti i gruppi trattati, si fanno esaminare le sezioni in modo casuale da persone all'oscuro del significato dei codici e si registrano la frequenza e la gravità di ciascuna lesione. Terminata la classificazione di tutte le regioni di tutti i gruppi trattati, si apre il codice e si procede all'analisi statistica per valutare le relazioni dose-risposta, avendo cura inoltre di descrivere esempi dei diversi livelli di gravità di ciascuna lesione.

I reperti neuropatologici devono essere valutati nel contesto delle osservazioni e misurazioni comportamentali, come pure di altri dati ricavati da studi precedenti o contemporanei sulla tossicità sistemica della sostanza in esame.

2. DATI

2.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di trattamento o di controllo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, nonché il momento del decesso di ciascun animale morto spontaneamente o sottoposto a eutanasia, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati con indicazione del momento di insorgenza, della durata, del tipo e della gravità degli effetti tossici, il numero di animali che hanno manifestato lesioni, con indicazione del tipo e della gravità delle lesioni.

▼B

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio devono essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti neurocomportamentali e neuropatologici (compresi gli effetti neurochimici o elettrofisiologici, nonché gli effetti riscontrati con gli eventuali esami supplementari effettuati) e qualsiasi altro effetto avverso osservato. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

— natura fisica (compresi isomerismo, purezza e proprietà fisico-chimiche);

— dati identificativi.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, acclimatazione, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione della dieta, sulla concentrazione utilizzata, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica del preparato somministrato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;

— motivazione della scelta dei livelli di dose;

— motivazione della scelta della via e della durata di esposizione;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— informazioni dettagliate sulla qualità degli alimenti e dell'acqua.

Osservazione e procedimenti del saggio:

— informazioni dettagliate sull'assegnazione degli animali di ciascun gruppo ai sottogruppi destinati alla perfusione;

— informazioni dettagliate sui sistemi di punteggio utilizzati, compresi criteri e scale di punteggio impiegati per ciascuna misurazione effettuata nel corso delle osservazioni cliniche dettagliate;

▼B

— informazioni dettagliate sugli esami funzionali per la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo (p. es. uditivi, visivi e propriocettivi), della forza di prensione, dell'attività motoria (comprese indicazioni particolareggiate sui dispositivi automatizzati impiegati per rilevare l'attività); altri esami eseguiti;

— informazioni dettagliate sugli esami oftalmologici e, se del caso, sugli esami ematologici e sugli esami di biochimica clinica con i rispettivi valori di riferimento;

— informazioni dettagliate su specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici.

Risultati:

— peso corporeo e relative modificazioni, compreso il peso corporeo al momento del sacrificio;

— consumo di cibo e consumo d'acqua, se del caso;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per livello di dose, compresi i segni di tossicità o mortalità;

— natura, gravità e durata (momento di insorgenza e successivo decorso) degli effetti clinici osservati (sia reversibili che non reversibili);

— descrizione dettagliata di tutti i risultati degli esami funzionali;

— reperti necroscopici;

— descrizione dettagliata dei risultati di tutti gli eventuali esami neurocomportamentali, neuropatologici e neurochimici o elettrofisiologici;

— eventuali dati sull'assorbimento e sul metabolismo;

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati:

— informazioni sulla relazione dose-risposta;

— relazione tra eventuali altri effetti tossici e la conclusione sul potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame;

— NOAEL.

Conclusioni:

— viene incoraggiata l'inclusione di una indicazione specifica della neurotossicità complessiva della sostanza chimica esaminata.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OCSE, Parigi. In preparazione.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparazione.

(3) World Health Organisation (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer P.S., Schaumburg H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. A cura di Spencer, P.S. e Schaumburg, H.H., Williams e Wilkins, Baltimora/Londra.

▼B

(5) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(8) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., *1,* 233-236.

(9) Crofton K.M., Haward J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reirer L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson H.A., Mitchell C.L. (a cura di). (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang L.W. (a cura di). (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser V.C., Anthony D.C., Sette W.F., MacPhail R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P., Miller D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes H.E., Birkamper G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. A cura di Mitchell C.L. Raven Press, New York, pagg. 299-335.

(17) Johnson B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. A cura di Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Williams and Wilkins Co., Baltimora/Londra, pagg. 726-742.

(18) Bancroft J.D., Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Capitolo 17, Neuropathological Techniques. A cura di Lowe, James e Cox, Gordon. Churchill Livingstone.

▼B

Tabella 1

Numero minimo di animali necessari per ciascun gruppo per uno studio di neurotossicità a sé stante o abbinato ad altri studi

	STUDIO DI NEUROTOSSICITÀ ESEGUITO COME:			
	Studio a sé stante	Studio abbinato a uno studio su 28 giorni	Studio abbinato a uno studio su 90 giorni	Studio abbinato a uno studio di tossicità cronica
Numero totale di animali per gruppo	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	15 maschi e 15 femmine	25 maschi e 25 femmine
Numero di animali scelti per gli esami funzionali, comprese le osservazioni cliniche dettagliate	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine
Numero di animali scelti per la perfusione in situ e l'esame neuroistopatologico	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine
Numero di animali scelti per le osservazioni sulla tossicità per dose ripetuta/subcronica/cronica, gli esami ematologici, di biochimica clinica, istopatologici, ecc. conformemente alle indicazioni delle rispettive linee guida		5 maschi e 5 femmine	10 maschi † e 10 femmine †	20 maschi † e 20 femmine †
Eventuali osservazioni supplementari	5 maschi e 5 femmine			

† Compresi cinque animali scelti per gli esami funzionali e le osservazioni cliniche dettagliate nello studio di neurotossicità.

▼B

Tabella 2

Frequenza dell'osservazione clinica e degli esami funzionali

Tipo di ossservazioni		Durata dello studio			
		Acuto	28 giorni	90 giorni	Cronico
In tutti gli animali	Condizioni di salute generali	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno
	Mortalità/morbilità	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno
Negli animali scelti per le osservazioni funzionali	Osservazioni cliniche dettagliate	— prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7 e 14 giorno dopo la somministrazione	— prima dell'esposizione iniziale — successivamente una volta alla settimana	— prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese	— prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi
	Esami funzionali	— prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7º e 14º giorno dopo la somministrazione	— prima dell'esposizione iniziale — durante la quarta settimana di trattamento il più vicino possibile alla fine del periodo di esposizione	— prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese	— prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi

▼B

B.44. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VIVO*

1. METODO

Il presente metodo corrisponde alle linee guida OCSE TG 427 (2004).

1.1 INTRODUZIONE

L'esposizione a molte sostanze chimiche avviene principalmente attraverso la pelle, ma la maggior parte degli studi tossicologici eseguiti su animali da laboratorio ricorre alla somministrazione orale. Lo studio dell'assorbimento percutaneo *in vivo* presentato in queste linee guida fornisce il collegamento necessario per estrapolare, da studi basati sulla somministrazione orale, dati utili per la valutazione dell'innocuità in caso di esposizione cutanea.

Prima di entrare in circolazione, una sostanza deve attraversare molti strati cellulari cutanei. Lo strato cineticamente determinante per la maggior parte delle sostanze è lo strato corneo, costituito da cellule morte. La permeabilità percutanea dipende sia dalla lipofilia della sostanza chimica che dallo spessore dello strato esterno dell'epidermide, nonché da fattori quali il peso molecolare e la concentrazione della sostanza. Generalmente, la pelle dei ratti e dei conigli è più permeabile di quella dell'uomo, mentre la permeabilità cutanea delle cavie e delle scimmie è più simile a quella umana. I metodi di misurazione dell'assorbimento percutaneo possono essere suddivisi in due categorie: metodi *in vivo* e metodi in vitro. Il metodo *in vivo* permette di ottenere buone informazioni sull'assorbimento cutaneo in varie specie animali di laboratorio. Più recentemente sono stati sviluppati i metodi in vitro, basati sul trasporto attraverso un campione di pelle umana o animale, di spessore totale o parziale, verso un serbatoio di fluidi.

Il metodo in vitro è descritto in un altro metodo di prova (1). Ai fini della scelta del metodo più idoneo per una determinata situazione, si raccomanda di consultare il documento dell'OCSE Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2), che contiene maggiori informazioni sull'idoneità dei metodi *in vivo* e in vitro.

Il metodo *in vivo* descritto nel presente documento permette di determinare la penetrazione della sostanza di prova attraverso la pelle fino al compartimento sistemico. Questa tecnica è ampiamente utilizzata da molti anni (3) (4) (5) (6) (7). Benché in molti casi sia possibile ricorrere a studi sull'assorbimento percutaneo in vitro, potrebbero esservi situazioni in cui soltanto uno studio *in vivo* permette di ottenere i dati necessari.

Il metodo *in vivo* presenta diversi vantaggi: utilizza un sistema intatto dal punto di vista fisiologico e metabolico, fa ricorso ad una specie comunemente utilizzata negli studi sulla tossicità e può essere adattato in modo da poter essere impiegato su altre specie. Gli svantaggi sono il ricorso ad animali vivi, la necessità di utilizzare sostanze radiomarcate per poter ottenere risultati affidabili, le difficoltà connesse alla determinazione della fase iniziale di assorbimento e le differenze di permeabilità tra la pelle della specie generalmente utilizzata (il ratto) e la pelle umana. La pelle degli animali è generalmente più permeabile, cosicché si rischia di sovrastimare l'assorbimento percutaneo umano (6)(8)(9). Le sostanze caustiche/corrosive non devono essere testate su animali vivi.

▼B

1.2 DEFINIZIONI

Dose non assorbita: la dose presente nell'acqua di risciacquo dell'epidermide dopo esposizione e sul bendaggio non occlusivo, ivi comprese le dosi che evaporano dalla pelle durante l'esposizione.

Dose assorbita (*in vivo*): comprende i residui presenti nell'urina, nell'acqua di risciacquo delle gabbie, negli escrementi, nell'aria espirata (se misurata), nel sangue, nei tessuti (se raccolti) e nella carcassa restante dopo il prelievo della pelle nel punto di applicazione della sostanza.

Dose assorbibile: dose presente sulla o nella pelle dopo il lavaggio.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova, preferibilmente radiomarcata, è applicata sulla pelle rasata degli animali in una o più concentrazioni idonee, sotto forma di preparazione rappresentativa delle preparazioni in uso. La preparazione di prova è lasciata a contatto con la pelle per un determinato periodo di tempo, ed è coperta con idoneo bendaggio (non occlusivo, semi-occlusivo o occlusivo) per evitarne l'ingestione. Al termine del periodo di esposizione, il bendaggio è rimosso e la pelle è pulita con un apposito prodotto detergente. Il bendaggio e il materiale utilizzato per la pulizia sono conservati per essere poi analizzati ed è applicato un nuovo bendaggio. Prima, durante e dopo il periodo di esposizione, gli animali sono collocati in gabbie metaboliche individuali e gli escrementi e l'aria espirata nelle diverse fasi sono raccolti ai fini della successiva analisi. Si può evitare di raccogliere l'aria espirata se i dati disponibili sono sufficienti a concludere che la formazione di metaboliti radioattivi è scarsa o assente. Ciascuno studio prevede generalmente l'esposizione di più gruppi di animali alla preparazione di prova. Gli animali di uno dei gruppi sono soppressi alla fine del periodo di esposizione. Gli animali degli altri gruppi sono soppressi successivamente, a intervalli prestabiliti. Al termine del periodo di campionamento, gli animali restanti vengono soppressi, il loro sangue viene raccolto per essere poi analizzato, la zona di pelle su cui era stata applicata la sostanza viene prelevata ai fini della successiva analisi e la carcassa viene esaminata per individuare l'eventuale presenza di materia non escreta. Si procede quindi all'analisi dei campioni con metodi adeguati e alla stima del grado di assorbimento percutaneo (6) (8) (9).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta della specie animale**

Il ratto è la specie più frequentemente utilizzata, ma possono essere utilizzati anche ceppi glabri e specie che presentano tassi di assorbimento cutaneo più vicini a quelli umani (3) (6) (7) (8) (9). Di preferenza sono impiegati giovani animali adulti sani dello stesso sesso (maschi, ove non espressamente indicato), appartenenti ai ceppi di laboratorio generalmente utilizzati. All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali utilizzati non può superare ± 20 % del peso medio. A titolo di esempio, sono adatti i ratti maschi di peso compreso tra 200 e 250 g, specialmente quelli il cui peso è situato nella metà superiore di tale intervallo.

▼B

1.4.2 **Numero e sesso degli animali**

Per ciascuna preparazione di prova e ciascuna fase di soppressione programmata deve essere utilizzato un gruppo di almeno quattro animali dello stesso sesso. Ciascun gruppo di animali è soppresso a intervalli di tempo differenti, ad esempio alla fine del periodo di esposizione (in genere, 6 o 24 ore) e in momenti successivi (ad esempio, dopo 48 e 72 ore). Se i dati disponibili indicano differenze sostanziali a livello della tossicità cutanea tra maschi e femmine, sarà selezionato il sesso più sensibile. In assenza di dati di questo tipo, si potrà utilizzare indifferentemente l'uno o l'altro sesso.

1.4.3 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio. L'illuminazione deve essere artificiale, con un'alternanza di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Per l'alimentazione, si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio, con cibo liberamente disponibile e acqua potabile in quantità illimitata. Durante lo studio e preferibilmente anche durante il periodo di acclimatazione, gli animali sono alloggiati in gabbie metaboliche individuali. Poiché la fuoriuscita accidentale di cibo e di acqua rischia di compromettere i risultati, sarà necessario ridurre al minimo la probabilità che tale evento si verifichi.

1.4.4 **Preparazione degli animali**

Gli animali sono contrassegnati in modo da poter essere identificati e lasciati nella loro gabbia per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio, onde permetterne l'acclimatazione alle condizioni del laboratorio.

Al termine del periodo di acclimatazione e circa 24 ore prima della somministrazione della sostanza di prova, si rasa una zona di pelle nella regione delle spalle e del dorso di ciascun animale. Poiché la capacità di penetrazione della pelle danneggiata è diversa da quella della pelle intatta, si deve aver cura di non procurare abrasioni cutanee. Dopo la rasatura e circa 24 ore prima dell'applicazione della sostanza di prova sulla pelle (cfr. sezione 1.4.7), la superficie cutanea è lavata con acetone per rimuovere il sebo. Non è opportuno lavare ulteriormente la pelle con acqua saponata, poiché i residui di sapone rischiano di favorire l'assorbimento della sostanza di prova. La zona di applicazione deve essere abbastanza grande (preferibilmente almeno 10 cm^2) da consentire un calcolo affidabile della quantità di sostanza chimica di prova assorbita per cm^2 di pelle. Una zona di tali dimensioni può essere facilmente individuata in ratti di peso compreso fra 200 e 250 g. Dopo la preparazione, gli animali sono collocati nuovamente nelle gabbie metaboliche.

1.4.5 **Sostanza di prova**

La sostanza di prova è la sostanza di cui si intendono studiare le caratteristiche di penetrazione. Preferibilmente tale sostanza deve essere radiomarcata.

1.4.6 **Preparazione della sostanza di prova**

La preparazione della sostanza di prova (ad esempio, materiale puro, diluito o formulato contenente la sostanza di prova e applicato sulla pelle) deve essere la stessa a cui possono essere esposti gli esseri umani o le altre specie potenzialmente interessate, o un adeguato sostituto. Qualsiasi variazione dalla preparazione d'uso deve essere giustificata. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Per veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di assorbimento e l'interazione potenziale con la sostanza di prova.

▼B

1.4.7 **Applicazione sulla pelle**

Si delimita sulla superficie cutanea una zona di applicazione di dimensioni prestabilite. Successivamente si applica su questa zona, in maniera uniforme, una quantità nota della preparazione di prova. Normalmente la quantità applicata deve simulare l'esposizione umana potenziale (generalmente 1-5 mg/cm^2 per i solidi e fino a 10 $\mu l/cm^2$ per i liquidi). L'utilizzo di altre quantità deve essere giustificato in base alle condizioni di uso previste, agli obiettivi dello studio o alle caratteristiche fisiche della preparazione di prova. Dopo l'applicazione, la zona di pelle trattata deve essere protetta in modo che l'animale non possa effettuare la tolettatura. La figura 1 mostra un esempio di dispositivo tipicamente utilizzato a tal fine. Normalmente la zona di pelle su cui è effettuata l'applicazione è protetta con un bendaggio non occlusivo (ad es. garza di nylon permeabile). Tuttavia, in caso di applicazioni illimitate occorre un bendaggio occlusivo. Qualora il saggio riguardi sostanze semivolatili, se l'evaporazione provoca una riduzione inaccettabile del tasso di recupero della sostanza di prova (cfr. anche la prima parte del punto 1.4.10) è necessario raccogliere la sostanza evaporata in un filtro a carbone che copra il dispositivo di applicazione (cfr. figura 1). È importante che il dispositivo utilizzato non danneggi la pelle e non assorba il preparato di prova né reagisca con esso. Gli animali sono poi nuovamente collocati nelle gabbie metaboliche individuali per la raccolta degli escrementi.

1.4.8 **Durata dell'esposizione e campionamento**

La durata dell'esposizione è l'intervallo di tempo tra l'applicazione e la rimozione del preparato di prova mediante lavaggio della pelle. Il periodo di esposizione utilizzato (normalmente 6 o 24 ore) deve essere scelto in funzione della probabile durata dell'esposizione umana. Dopo il periodo di esposizione, gli animali sono tenuti nelle gabbie metaboliche fino alla loro soppressione programmata e sono sottoposti ad osservazione periodica per l'intera durata del saggio, onde rilevare eventuali segni di tossicità o reazioni anomale. Al termine del periodo di esposizione la pelle trattata deve essere esaminata al fine di rilevare segni visibili di irritazione.

Le gabbie metaboliche devono consentire la raccolta separata dell'urina e delle feci durante tutto lo studio, nonché la raccolta del biossido di carbonio 14C e dei composti volatili del carbonio 14C, che devono essere analizzati qualora siano prodotti in quantità significativa (> 5 %). L'urina, le feci e i fluidi trattenuti (ad es. il biossido di carbonio 14C e i composti volatili del carbonio 14C) devono essere raccolti individualmente per ciascun gruppo in ciascun intervallo di campionamento. Se i dati disponibili sono sufficienti a concludere che la formazione di metaboliti radioattivi volatili è scarsa o assente, è possibile utilizzare gabbie aperte.

Gli escrementi sono raccolti durante il periodo di esposizione e fino a 24 ore dopo il contatto iniziale con la pelle, e in seguito con cadenza giornaliera fino alla fine dell'esperimento. Se normalmente sono sufficienti tre intervalli di raccolta degli escrementi, potrebbe essere opportuno prevedere intervalli di tempo supplementari o più pertinenti per lo studio, a seconda della finalità alla quale è destinata la preparazione di prova o dei dati cinetici esistenti.

Al termine del periodo di esposizione il dispositivo di protezione è rimosso da ogni animale e conservato ai fini della successiva analisi. La pelle trattata deve essere lavata almeno 3 volte con un prodotto detergente, utilizzando appositi tamponi. Occorre fare attenzione per evitare di contaminare altre parti del corpo. Il prodotto detergente deve essere rappresentativo delle normali pratiche igieniche (ad es. una soluzione acquosa di sapone). Infine, la pelle deve essere asciugata. Tutti i tamponi e i residui del lavaggio devono essere conservati per essere poi analizzati. Agli animali appartenenti ai gruppi da sottoporre ad ulteriori osservazioni viene applicato un nuovo bendaggio prima del ritorno nelle gabbie individuali.

▼B

1.4.9 **Procedure finali**

I singoli animali di ciascun gruppo sono soppressi al momento previsto e il loro sangue è raccolto e analizzato. Il bendaggio o dispositivo di protezione è rimosso e analizzato. La pelle del punto di applicazione e una zona simile di pelle rasata non trattata sono prelevate da ciascun animale e analizzate separatamente. La pelle del punto di applicazione può essere frazionata per separare lo strato corneo dall'epidermide sottostante e ottenere in tal modo maggiori informazioni sulla distribuzione della sostanza di prova. La determinazione di tale distribuzione in un periodo di tempo predefinito dopo il periodo di esposizione dovrebbe fornire alcune indicazioni sul destino della sostanza di prova eventualmente presente nello strato corneo. Per facilitare il frazionamento della pelle (dopo il lavaggio finale e la soppressione dell'animale) viene rimosso il bendaggio protettivo. La pelle del punto di applicazione, insieme ad un'areola di pelle circostante, è asportata dal ratto e fissata su una tavola. Con una leggera pressione, viene applicata sulla pelle una striscia di nastro adesivo, che viene poi rimossa insieme a parte dello strato corneo. Successivamente sono applicate altre strisce di nastro adesivo fino al momento in cui, essendo stato rimosso tutto lo strato corneo, il nastro cessa di aderire alla superficie della pelle. Tutte le strisce di adesivo utilizzate per lo stesso animale possono essere messe insieme in un unico recipiente, nel quale viene aggiunta una sostanza per la digestione dei tessuti, al fine di solubilizzare lo strato corneo. Tutti i tessuti potenzialmente interessati possono essere asportati e sottoposti a misurazione separata prima di analizzare il resto della carcassa per stabilire la dose assorbita da quest'ultima. Le carcasse dei singoli animali devono essere conservate ai fini della successiva analisi. Normalmente è sufficiente l'analisi del contenuto totale. Gli organi potenzialmente interessati possono essere asportati per essere analizzati individualmente (se indicato da altri studi). L'urina presente nella vescica al momento della soppressione è aggiunta all'urina raccolta in precedenza. Dopo la raccolta degli escrementi presenti nelle gabbie metaboliche al momento della soppressione programmata, le gabbie e i sistemi di raccolta devono essere lavati con un solvente adeguato. Occorre inoltre analizzare gli altri materiali potenzialmente contaminati.

1.4.10 **Analisi**

In tutti gli studi si deve ottenere un tasso di recupero adeguato (l'obiettivo deve essere una media di 100 ± 10 % della radioattività). L'eventuale scostamento da questi valori deve essere giustificato. La quantità di dose somministrata presente in ciascun campione deve essere analizzata mediante procedure opportunamente convalidate.

Le analisi statistiche devono prevedere la misurazione della varianza tra le diverse repliche di ciascuna applicazione.

2. **DATI**

Per determinare la presenza della sostanza di prova e/o di metaboliti per ciascun animale e a ciascun tempo di campionamento occorre effettuare le misurazioni di seguito indicate. Oltre ad essere presentati individualmente, i dati devono essere raggruppati in funzione dei tempi di campionamento e devono essere riportati sotto forma di medie.

— quantità associata ai dispositivi di protezione;

— quantità che può essere rimossa dalla pelle;

— quantità presente sulla o nella pelle e non eliminabile con il lavaggio;

▼B

— quantità presente nel campione di sangue;

— quantità presente negli escrementi e nell'aria espirata (eventualmente);

— quantità esistente nella carcassa e negli organi eventualmente asportati in vista di un'analisi individuale.

La quantità della sostanza di prova e/o dei metaboliti presenti negli escrementi, nell'aria espirata, nel sangue e nella carcassa permetterà di determinare la quantità totale assorbita in ogni intervallo di tempo. Potrà inoltre essere calcolata la quantità di sostanza chimica di prova assorbita per cm^2 di pelle esposta nel corso del periodo di esposizione.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA**

3.1 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere i dati richiesti dal protocollo, in particolare la giustificazione del sistema utilizzato, nonché le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— dati identificativi [ad es. numero CAS, se disponibile; purezza (purezza radiochimica); impurità note; numero di lotto];

— natura fisica, proprietà fisicochimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, peso molecolare e coefficiente di ripartizione — log P_{OW}).

Preparazione della sostanza di prova:

— formulazione e giustificazione dell'utilizzo;

— informazioni dettagliate riguardanti la preparazione della sostanza di prova, la quantità applicata, la concentrazione raggiunta, il veicolo impiegato, la stabilità e l'omogeneità.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo utilizzato;

— numero, età e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— peso dei singoli animali all'inizio dell'esperimento.

Condizioni di prova:

— modalità di somministrazione della preparazione di prova (punto di applicazione, metodi di determinazione, bendaggio occlusivo/non occlusivo, volume, estrazione, rilevazione);

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati:

— eventuali segni di tossicità;

— tabella dei valori di assorbimento (espressi sotto forma di tasso, quantità o percentuale);

▼B

— recuperi totali del saggio;

— interpretazione dei risultati, comparazione con i dati eventualmente esistenti sull'assorbimento percutaneo del composto di prova.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Metodo di prova B.45. Assorbimento cutaneo: *In vitro* Method.

2. OCSE (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCSE, Parigi.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

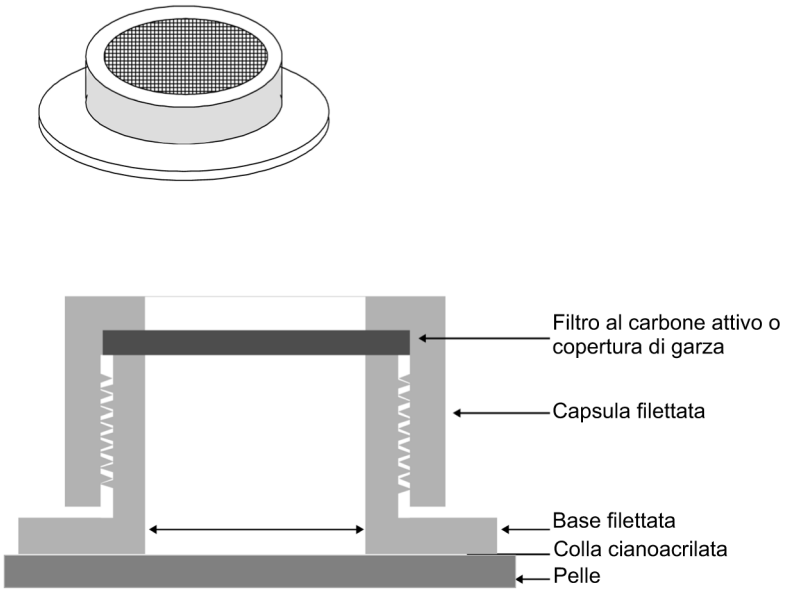
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Esempio di dispositivo generalmente utilizzato per delimitare e proteggere il punto di applicazione cutanea durante gli studi di assorbimento percutaneo *in vivo*



▼B

B.45. **ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO IN VITRO**

1. **METODO**

Il metodo di seguito descritto corrisponde alle linee guida dell'OCSE TG 428 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo è stato elaborato per ottenere informazioni sull'assorbimento di una sostanza di prova applicata su un campione di pelle asportata. Può essere associato al metodo di assorbimento cutaneo *in vivo* (1), o essere eseguito da solo. Si raccomanda di consultare il documento orientativo dell'OCSE sullo svolgimento di studi concernenti l'assorbimento cutaneo [*OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (2)] per l'elaborazione di studi che si basano su questo metodo. Tale documento è stato elaborato per agevolare la selezione di procedure in vitro adeguate, da utilizzare in circostanze specifiche al fine di garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti con tale metodo.

I metodi per la misurazione dell'assorbimento cutaneo e della diffusione cutanea possono essere divisi in due categorie: *in vivo* e in vitro. I metodi *in vivo* per la valutazione dell'assorbimento cutaneo sono di uso comune e forniscono informazioni di carattere farmacocinetico per una serie di specie animali. In un altro metodo di prova (1) viene descritto un metodo *in vivo*. I metodi in vitro sono anche utilizzati da molti anni per misurare l'assorbimento cutaneo. Sebbene non siano stati eseguiti studi di validazione ufficiale dei metodi in vitro di cui al presente metodo, gli esperti dell'OCSE hanno convenuto nel 1999 che esistevano dati sufficienti a sostegno del metodo in vitro (3). Ulteriori informazioni in questo senso, in particolare un numero importante di confronti diretti tra i metodi in vitro e *in vivo*, sono contenuti nel documento orientativo (2). Varie monografie trattano questo tema e forniscono informazioni dettagliate sull'uso del metodo in vitro (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). I metodi in vitro misurano la diffusione di sostanze chimiche nella pelle e attraverso la pelle verso un serbatoio di fluidi e possono servirsi di campioni di pelle non vitale per misurare unicamente la diffusione, o campioni di pelle appena asportati e che evidenziano un'attività metabolica, per misurare contemporaneamente la diffusione e il metabolismo cutaneo. Questi metodi sono utilizzati, in particolare, per confrontare la somministrazione cutanea e transcutanea di varie formulazioni di sostanze chimiche e possono fornire modelli utili per la valutazione dell'assorbimento transcutaneo nell'essere umano.

Tale metodo in vitro potrebbe non essere applicabile in tutte le situazioni e a tutte le classi di sostanze chimiche. Può essere utilizzato per una valutazione qualitativa iniziale della penetrazione cutanea. In alcuni casi potrebbe essere necessario completare detta valutazione con dati *in vivo*. È opportuno consultare il documento orientativo (2) per l'individuazione di altre situazioni in cui l'uso del metodo in vitro può rivelarsi opportuno. I riferimenti bibliografici (3) contengono informazioni dettagliate complementari che risulteranno utili ai fini della scelta del metodo.

Questo documento presenta i principi generali per la misura dell'assorbimento e della diffusione cutanee della sostanza di prova utilizzando pelle asportata. Si possono utilizzare campioni di pelle di molte specie di mammiferi diversi, esseri umani compresi. Le proprietà di permeabilità della pelle sono mantenute dopo l'asportazione dal corpo in quanto la principale barriera di diffusione è lo strato corneo non vitale; non è stato rilevato alcun trasporto transcutaneo attivo di sostanze chimiche. La pelle ha evidenziato la capacità di metabolizzare alcune sostanze chimiche durante l'assorbimento transcutaneo (6), ma questo processo non è limitativo della velocità in termini di dosi effettivamente assorbite, sebbene possa condizionare la natura del materiale che entra nella circolazione sanguigna.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Dose non assorbita: la dose presente nell'acqua di risciacquo dell'epidermide dopo l'esposizione e sulla copertura non occlusiva, ivi comprese le dosi che evaporano dalla pelle durante l'esposizione.

Dosa assorbita (in vitro): massa della sostanza di prova che raggiunge il fluido recettore o la circolazione sistemica entro un determinato periodo.

Dose assorbibile (in vitro): dose presente sulla o nella pelle dopo il lavaggio.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova, che può essere radiomarcata, viene applicata sulla superficie di un campione di pelle che separa le due camere di una cella di diffusione. La sostanza chimica viene lasciata sulla pelle per un periodo determinato in condizioni specifiche prima di essere eliminata con un'adeguata procedura di pulitura. Il fluido recettore è campionato in vari momenti durante l'esperimento e analizzato per stabilire la presenza della sostanza di prova e/o di metaboliti.

Qualora vengano utilizzati sistemi metabolicamente attivi, i metaboliti della sostanza di prova possono essere analizzati ricorrendo a metodi adeguati. Alla fine dell'esperimento, la distribuzione della sostanza di prova e i suoi metaboliti sono quantificati, se opportuno.

Nelle condizioni adeguate, descritte nel presente metodo e nel documento orientativo (2), l'assorbimento di una sostanza di prova in un periodo determinato viene misurata analizzando il fluido recettore e il campione di pelle trattato. La sostanza di prova che rimane nella pelle deve essere considerata assorbita, a meno che non si riesca a dimostrare che l'assorbimento può essere determinato anche solo dai valori del fluido recettore. L'analisi degli altri componenti (materiale eliminato dalla pelle mediante risciacquo che rimane negli strati cutanei) consente di procedere a ulteriori valutazioni dei dati, quali l'eliminazione totale della sostanza di prova e la percentuale di recupero.

Al fine di dimostrare le prestazioni e l'affidabilità del sistema nel laboratorio che esegue la prova, sarebbe opportuno disporre dei risultati ottenuti con dei prodotti chimici di riferimento pertinenti, conformemente alla letteratura pubblicata sul metodo in questione. Questo requisito potrebbe essere soddisfatto testando una sostanza di riferimento adeguata (di preferenza una sostanza con affinità per ambienti lipidici simili alla sostanza di prova) contemporaneamente alla sostanza di prova o fornendo dati storici pertinenti per una serie di sostanze di riferimento con affinità per ambienti lipidici diversi (ad esempio, caffeina, acido benzoico e testosterone).

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Cella di diffusione**

Una cella di diffusione è costituita da una camera «donatrice» e una camera «recettrice» in mezzo alle quali viene posto il campione di pelle (alla fig. 1 è riportato un modello standard). La cella di diffusione deve avere una buona tenuta intorno alla pelle, consentire un agevole campionamento e un'adeguata miscela della soluzione recettrice in contatto con la faccia inferiore della pelle, permettere un controllo adeguato della temperatura della cella e del suo contenuto. Si possono utilizzare celle di diffusione statiche e a flusso *(flow-through)*. Di norma le camere donatrici sono lasciate aperte al momento dell'esposizione ad una dose finita di un preparato di prova. Tuttavia, per applicazioni infinite e in alcuni casi di dosaggi finiti, le camere donatrici possono essere chiuse.

▼B

1.4.2. **Fluido recettore**

Si utilizzerà di preferenza un fluido recettore fisiologicamente adeguato, anche se è consentito l'uso di altri fluidi qualora il loro uso sia giustificato. Occorrerà fornire la composizione esatta del fluido recettore. Occorrerà dimostrare l'adeguata solubilità della sostanza di prova nel fluido recettore in modo che quest'ultimo non ostacoli l'assorbimento. Inoltre, il fluido recettore non deve intaccare l'integrità del campione di pelle. In un sistema a flusso la velocità di flusso non deve ostacolare la diffusione della sostanza di prova nel fluido recettore. In un sistema a cella statica, il fluido dovrebbe essere continuamente agitato e regolarmente campionato. Per lo studio del metabolismo il fluido recettore deve consentire la vitalità del campione di pelle per l'intera durata dell'esperimento.

1.4.3 **Preparati di pelle**

Potranno essere utilizzati campioni di pelle di origine umana e animale. È noto che l'utilizzo di pelle umana è oggetto di considerazioni etiche e soggetto a condizioni nazionali ed internazionali. Di preferenza si utilizzeranno campioni di pelle vitale, ma l'uso di campioni non vitali è consentito a condizione di poter dimostrare l'integrità della pelle. Possono essere utilizzate membrane epidermiche (separate mediante processi enzimatici, termici o chimici) o campioni di pelle di spessore parziale (di solito tra 200 e 400 μm) preparati con un dermatomo. I campioni di pelle a spessore totale sono consentiti, ma dovrebbero essere evitati spessori eccessivi (superiori a circa 1 mm), a meno che non siano specificatamente richiesti per determinare la sostanza chimica di prova negli strati epidermici. Occorre giustificare la scelta della specie, del sito anatomico e della tecnica di preparazione. Sono richiesti dati accettabili risultanti da almeno quattro repliche per preparato di prova.

1.4.4 **Integrità del preparato**

Il campione di pelle deve essere adeguatamente preparato. Eventuali manipolazioni inadeguate possono danneggiare lo strato corneo, pertanto è opportuno verificare l'integrità della pelle preparata. Per lo studio del metabolismo la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata il più rapidamente possibile e in condizioni che consentano di mantenere l'attività metabolica. A titolo orientativo, la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata nell'arco di 24 ore, ma il periodo di conservazione consentito potrebbe variare in funzione del sistema enzimatico che interviene nella metabolizzazione e delle temperature di stoccaggio (13). Qualora i campioni di pelle siano stati conservati prima dell'utilizzazione, occorrerebbe dimostrare che la funzione di barriera è stata mantenuta.

1.4.5 **Sostanza di prova**

La sostanza di prova è il prodotto di cui si intende studiare le caratteristiche di penetrazione. Preferibilmente detta sostanza sarà radiomarcata.

1.4.6 **Preparazione della sostanza di prova**

La preparazione della sostanza di prova (ad esempio, materiale puro, diluito o formulato contenente la sostanza di prova applicata sulla pelle) dovrebbe essere identica (o un sostituto adeguato) a quella cui gli esseri umani o le altre specie potenzialmente interessate possono essere esposti. Qualsiasi variazione dalla preparazione d'uso deve essere giustificata.

▼B

1.4.7 **Concentrazioni e formulazioni delle sostanze di prova**

In linea di massima si utilizzano più concentrazioni della sostanza di prova in modo da coprire i valori più elevati della potenziale esposizione umana. Analogamente, si potrebbero *analizzare* una serie di formulazioni tipo.

1.4.8 **Applicazione sulla pelle**

Nelle condizioni normali di esposizione umana alle sostanze chimiche, in linea di massima si riscontrano dosi finite. Sarà pertanto opportuno utilizzare un'applicazione che imiti le condizioni dell'esposizione umana, di solito pari a 1-5 mg/cm^2 di pelle per un solido e 10 $\mu l/cm^2$ per i liquidi. La quantità dovrebbe dipendere dalle condizioni di utilizzo previste, dagli obiettivi del saggio e dalle caratteristiche fisiche del preparato di prova. Ad esempio, le applicazioni sull'epidermide possono essere infinite dove si applicano importanti volumi per unità di superficie.

1.4.9 **Temperatura**

La temperatura condiziona la diffusione passiva delle sostanze chimiche (e pertanto il loro assorbimento cutaneo). La cella di diffusione e la pelle devono essere mantenute ad una temperatura costante vicina alla temperatura normale della pelle (32 ± 1 ^oC). I vari modelli di cella richiederanno temperature diverse per il bagnomaria e il blocco riscaldante in modo da garantire il rispetto della norma fisiologica del recettore/della pelle. L'umidità sarà preferibilmente compresa tra 30 e 70 %.

1.4.10 **Durata dell'esposizione e del campionamento**

Il campione di pelle può essere esposto al preparato di prova per l'intera durata del saggio o per periodi più brevi (ad esempio per simulare un tipo specifico di esposizione). Il lavaggio della pelle per eliminare l'eccesso di sostanza di prova dove essere eseguito con un agente di pulizia adeguato e l'acqua di risciacquo deve essere raccolta per essere analizzata. La procedura di eliminazione del preparato di prova dipenderà delle condizioni di uso previste e deve essere giustificata. Di norma è necessario un periodo di campionamento di 24 ore per ottenere l'adeguata caratterizzazione del profilo di assorbimento. Dal momento che l'integrità della pelle può cominciare a deteriorarsi dopo 24 ore, i periodi di campionamento non dovrebbero mai superare le 24 ore. Per le sostanze di prova che penetrano rapidamente nella pelle, il problema non si pone, ma per quelle che penetrano più lentamente possono essere necessari tempi più lunghi. La frequenza di campionamento del fluido recettore dovrebbe consentire di procedere alla rappresentazione grafica del profilo di assorbimento della sostanza di prova.

1.4.11 **Procedure finali**

Tutti i componenti del sistema di prova devono essere analizzati ed occorre determinare il tasso di recupero. Ciò riguarda la camera donatrice, l'acqua di risciacquo dell'epidermide, il preparato di pelle, il fluido recettore o la camera recettrice. In alcuni casi la pelle può essere frazionata nell'area esposta della pelle e nell'area della pelle sotto il bordo della cella e in frazioni di strato corneo, epidermide e derma per eseguire analisi separate.

1.4.12 **Analisi**

In tutti gli studi si dovrebbe ottenere un tasso di recupero sufficiente (l'obiettivo deve essere una media di 100 ± 10 % della radioattività, gli eventuali scartamenti da questi valori devono essere giustificati). La quantità di sostanza di prova nel fluido recettore, nel preparato di pelle, nelle acque di lavaggio dell'epidermide e nell'acqua di risciacquo dell'apparecchio devono essere analizzate con una tecnica adeguata.

▼B

2. **DATI**

Occorre fornire l'analisi del fluido recettore, la distribuzione della sostanza di prova nel sistema e il profilo d'assorbimento nel corso del tempo. In condizioni di esposizione a dosi finite, è necessario calcolare la quantità eliminata dalla pelle con il risciacquo, la quantità assimilata dalla pelle (e dai vari strati cutanei, se sono analizzati) e la quantità presente nel fluido recettore (tasso, quantità o percentuale della dose applicata). L'assorbimento cutaneo può a volte essere espresso unicamente utilizzando i dati relativi al fluido recettore. Tuttavia, quando la sostanza di prova rimane nella pelle alla fine dello studio, può essere necessario includerla nella quantità totale assorbita [cfr. paragrafo 66 nel riferimento bibliografico (3)]. In condizioni di esposizione a dosi infinite, i dati possono consentire di calcolare una costante di permeabilità (Kp). In tal caso, la percentuale assorbita è irrilevante.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere i requisiti stabiliti nel protocollo, in particolare la giustificazione del sistema utilizzato, nonché le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— natura fisica, proprietà fisicochimiche (almeno il peso molecolare e il coefficiente di ripartizione - log P_{OW}), purezza (purezza radiochimica);

— dati di identificazione (ad es. numero del lotto);

— solubilità nel fluido recettore.

Preparazione della sostanza di prova:

— formulazione e giustificazione dell'utilizzo;

— omogeneità.

Condizioni di prova:

— origini e sito della pelle, metodo di preparazione, condizioni di stoccaggio prima dell'uso, eventuali pretrattamenti (pulizia, trattamenti antibiotici ecc.), misure dell'integrità della pelle, stato metabolico, giustificazione dell'uso;

— modello di cella, composizione del fluido recettore, velocità di flusso del fluido recettore o intervalli e procedure di campionamento;

— informazioni sull'applicazione del preparato di prova e quantificazione della dose applicata;

— durata dell'esposizione;

— informazioni sull'eliminazione del preparato di prova dalla pelle (ad es. risciacquo della pelle);

— informazioni sull'analisi della pelle e le tecniche di frazionamento eventualmente utilizzate per dimostrare la distribuzione cutanea;

▼B

— procedure di lavaggio della cella e dell'apparecchiatura;

— metodi di saggio, tecniche di estrazione, limiti di rilevazione e validazione del metodo analitico.

Risultati:

— recuperi totali del saggio (dose applicata = liquido di lavaggio della pelle + pelle + fluido recettore + liquido di lavaggio della cella);

— tabella dei tassi di recupero in ciascun compartimento della cella;

— profilo di assorbimento;

— tabella dei valori di assorbimento (espressi sotto forma di tasso, quantità o percentuale).

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Metodo B.44. Assorbimento cutaneo: metodo *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCSE, Parigi.

3. OCSE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCSE, Parigi.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW.(1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pagg. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monografia n. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Bruxelles.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

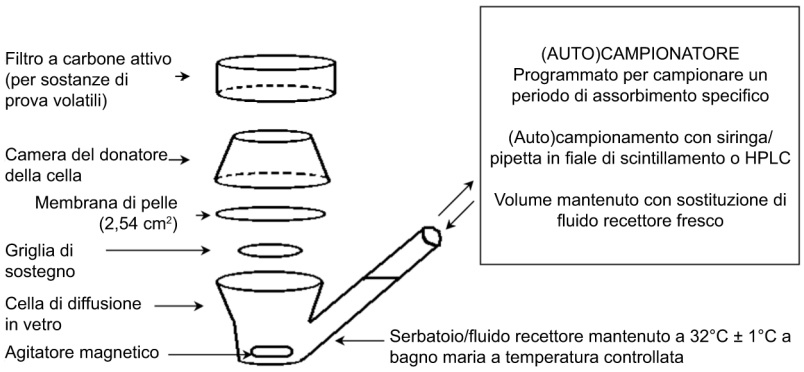
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basilea.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Esempio di un modello tipo di cella di diffusione statica concepita per studiare l'assorbimento transcutaneo *in vitro*



▼M3

B.46. IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: TEST SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

INTRODUZIONE

1. Per irritazione cutanea si intende la comparsa di lesioni reversibili della pelle in seguito all'applicazione della sostanza di prova per un massimo di 4 ore [secondo la definizione del *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – Sistema generale armonizzato di classificazione ed etichettatura dei prodotti chimici (GHS) delle Nazioni Unite e del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (regolamento CLP) (1)(3)]. Il presente metodo di prova (TM) propone una procedura in vitro che può essere utilizzata per individuare il rischio di sostanze irritanti (sostanze e miscele) corrispondenti alla categoria 2 del GHS delle Nazioni Unite e del regolamento CLP dell'UE (1) (2) (3). Nell'UE e in altre regioni, che non hanno adottato la categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti), questo metodo può anche essere impiegato per individuare sostanze chimiche non classificate (sostanze «senza categoria» del GHS delle Nazioni Unite e del CLP dell'UE) (1)(3). Infine, il presente metodo può essere usato per determinare il potere di irritazione cutanea delle sostanze e costituire un test sostitutivo a se stante per un test di irritazione cutanea in vivo nel quadro di una strategia di prova sequenziale (4 e capitolo B.4 del presente allegato).

2. Tradizionalmente, la valutazione dell'irritazione cutanea implicava il ricorso ad animali di laboratorio [linea guida OCSE Test Guideline 404; capitolo B.4 del presente allegato](4). Per via delle preoccupazioni legate al benessere degli animali, nel 2004 il metodo B.4 è stato rivisto per consentire di determinare la corrosione/irritazione cutanea tramite una strategia di prova sequenziale, ricorrendo a metodi in vitro o ex vivo convalidati, onde evitare di causare sofferenze agli animali. Sono stati adottati tre metodi per i test in vitro convalidati come linee guida OCSE Test Guidelines 430, 431 e 435 (5) (6) (7); di questi, due sono stati inseriti come capitoli B.40 e B.40 *bis* del presente allegato, da utilizzare per determinare la corrosività della strategia di prova sequenziale proposta dal metodo B.4 o dalla linea guida OCSE Test Guideline 404 (4).

3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana dell'irritazione cutanea. Il metodo si basa su epidermide umana ricostruita (RhE), che riproduce fedelmente le proprietà biochimiche e fisiologiche degli strati superiori della pelle umana (l'epidermide) nella struttura generale (uso di cheratinociti prelevati da epidermide umana non trasformati come origine per le cellule, tessuto e citoarchitettura rappresentativi). Il presente metodo è costituito inoltre da un insieme di standard di prestazione (PS) (appendice 2) per la valutazione di metodi simili basati su epidermide umana ricostituita o di varianti di tali metodi sviluppati dall'EC-ECVAM (8), in conformità ai principi del documento orientativo dell'OCSE n. 34 (OCSE Guidance Document No. 34) (9).

4. Esistono tre metodi convalidati conformi al presente metodo di prova. Sono stati svolti studi di prevalidazione, ottimizzazione e validazione per un metodo di prova in vitro (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), disponibile sul mercato con la denominazione EpiSkin™ (denominato metodo di riferimento convalidato o VRM), utilizzando modelli di epidermide umana ricostituita (RhE). Due ulteriori metodi di prova in vitro per l'irritazione cutanea basati sull'epidermide umana ricostituita, disponibili in commercio, sono stati convalidati conformemente agli standard di prestazione e danno risultati simili al metodo di riferimento convalidato (21). Si tratta del metodo EpiDerm™ SIT (EPI-200) e del metodo SkinEthic™ RHE (22).

▼**M3**

5. Prima di poter utilizzare a fini normativi un test basato su un modello di epidermide umana in vitro simile al metodo di riferimento convalidato, a EpiDerm™ SIT (EPI-200) o a SkinEthic™, oppure una variante di tali metodi, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto, al fine di assicurare che il test sia comparabile con il metodo di riferimento convalidato, come previsto dai requisiti degli standard di prestazione definiti nel presente metodo (appendice 2). Inoltre, prima di sviluppare e convalidare un metodo basato su un modello di epidermide umana in vitro e di presentarlo ai fini dell'adozione da parte delle autorità normative, si raccomanda di consultare il documento esplicativo generale dell'OCSE sulle prove di irritazione cutanea in vitro (23).

DEFINIZIONI

6. Le definizioni utilizzate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

7. Uno dei limiti del metodo di prova, evidenziato anche dallo studio di convalida (16), è che esso non consente di classificare le sostanze nella categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti) (1). Se il metodo è impiegato come test sostitutivo parziale, può essere necessario effettuare test in vivo di follow-up per caratterizzare pienamente il potenziale di irritazione cutanea (4 e capitolo B.4 del presente allegato). È riconosciuto che l'uso di pelle umana è soggetto a considerazioni e condizioni di carattere etico a livello nazionale e internazionale.

8. Il presente metodo riguarda la componente in vitro dell'irritazione cutanea della strategia di prova sequenziale del metodo B.4 (OCSE Test Guideline 404) sulla corrosione/irritazione cutanea (4). Se da un lato il metodo non fornisce informazioni adeguate in merito alla corrosione cutanea, dall'altro lato va detto che il metodo B.40 *bis* (OCSE Test Guideline 431) sulla corrosione cutanea ricorre al medesimo sistema di prova con modelli di epidermide umana ricostituita, sia pur sulla base di un diverso protocollo (capitolo B.40 *bis*). Il metodo in esame si basa su modelli di epidermide umana ricostituita utilizzando cheratinociti umani, che pertanto rappresentano in vitro l'organo bersaglio della specie di interesse. Oltretutto, esso riguarda direttamente la fase iniziale dell'attivazione della cascata infiammatoria/meccanismo d'azione (danno cellulare e tissutale dovuti a traumi localizzati) che si verifica durante l'irritazione in vivo. Nella procedura di convalida sottesa al presente metodo di prova è stata testata un'ampia gamma di sostanze chimiche e la banca dati empirica dello studio di convalida conteneva complessivamente 58 sostanze (16)(18)(23). Si trattava di solidi, liquidi, semisolidi e cere. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Quando possibile, prima dell'applicazione i solidi dovrebbero essere frantumati in polvere fine; non sono necessarie altre forme di pretrattamento del campione. I gas e gli aerosol non sono ancora stati valutati nell'ambito di uno studio di convalida (24). Se non si può escludere che tali sostanze possano essere testate utilizzando la tecnologia RhE, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol. Occorre precisare inoltre che sostanze chimiche molto colorate potrebbero interferire con le misurazioni della vitalità cellulare e rendono necessario l'utilizzo di controllo adattati per le correzioni (cfr. i punti 24-26).

9. Un singolo ciclo di prove costituito da tre tessuti replicati dovrebbe essere sufficiente per una sostanza sperimentale, se la classificazione è univoca. Tuttavia, in caso di risultati borderline, tra cui misurazioni replicate discordanti e/o una vitalità percentuale media pari a 50 ± 5 %, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire un secondo ciclo di prove, oltre che un terzo nell'eventualità di risultati discordanti tra i primi due cicli.

▼M3

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. La sostanza in esame viene applicata localmente ad un modello tridimensionale di epidermide umana ricostituita, composta da cheratinociti non trasformati prelevati da epidermide umana, messi in coltura per formare un modello multistrato, altamente differenziato, di epidermide umana. Il modello è costituito da uno strato basale, uno strato spinoso e uno strato granuloso organizzati e da uno strato corneo multiplo contenente strati di strutture lamellari lipidiche intercellulari disposte in modo analogo a quelle presenti in vivo.

11. L'irritazione cutanea indotta dalle sostanze chimiche, manifestata da eritema ed edema, scaturisce da una cascata di eventi che iniziano con la penetrazione nello strato corneo e con lesioni ai sottostanti strati di cheratinociti. Morendo, i cheratinociti rilasciano mediatori che scatenano la cascata infiammatoria, la quale agisce sulle cellule del derma, in particolare sulle cellule stromali ed endoteliali. Sono la dilatazione e l'accresciuta permeabilità delle cellule endoteliali a produrre l'eritema e l'edema (24). I metodi basati sull'epidermide umana ricostituita rilevano gli eventi iniziali della cascata.

12. La vitalità cellulare nei modelli di epidermide umana ricostituita è misurata tramite conversione enzimatica del colorante vitale MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromide, tiazolil blu; numero CAS 298-93-1 in un sale, il blu di formazan, misurato quantitativamente dopo l'estrazione dai tessuti (25). Le sostanze irritanti sono identificate per la loro capacità di diminuire la vitalità cellulare al di sotto di determinati livelli soglia (ossia ≤ 50 %, per gli irritanti appartenenti alla categoria 2 del sistema GHS delle Nazioni Unite/CLP dell'UE). A seconda del quadro regolamentare in cui sono usati i risultati del presente metodo di prova, le sostanze che danno vitalità cellulare superiore al livello soglia definito possono essere considerate non irritanti (> 50 %, senza categoria).

DIMOSTRAZIONE DEL RENDIMENTO

13. Prima di utilizzare sistematicamente uno dei tre metodi convalidati conformi al presente metodo di prova, è consigliabile che i laboratori ne verifichino il rendimento tecnico, utilizzando le dieci sostanze di riferimento elencate nella tabella 1. Per metodi analoghi messi a punto conformemente a questo metodo o per modifiche dei metodi convalidati occorre applicare gli standard di prestazione descritti nell'appendice 2 del presente metodo, prima di utilizzarli a fini regolamentari.

14. Nell'ambito della verifica del rendimento, si raccomanda che l'utente si accerti delle proprietà di barriera dei tessuti dopo averli ricevuti, in conformità delle specifiche del produttore del modello di epidermide umana ricostituita. Tale verifica è particolarmente importante se i tessuti vengono trasportati per lunghe distanze/per viaggi lunghi. Quando un metodo è consolidato e la sua correttezza d'impiego è stata dimostrata, non è più necessario effettuare la verifica in maniera routinaria. Tuttavia, se un metodo viene utilizzato di routine, si raccomanda di continuare a verificare le proprietà di barriera a intervalli regolari.

Tabella 1

Sostanze di riferimento (1)

Sostanza	CAS	Punteggio in vivo (2)	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP UE
acido 1-naftalenacetico	86-87-3	0	Solido	Senza cat.
isopropanolo	67-63-0	0,3	Liquido	Senza cat.

▼M3

Sostanza	CAS	Punteggio in vivo ([2])	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP UE
stearato di metile	112-61-8	1	Solido	Senza cat.
butirrato di eptile	5870-93-9	1,7	Liquido	Senza cat. (*Cat. opzionale 3*) ([3]), ([4])
salicilato di esile	6259-76-3	2	Liquido	Senza cat. (*Cat. opzionale 3*) ([3]), ([4])
aldeide ciclamenica	103-95-7	2,3	Liquido	Cat. 2
1-bromoesano	111-25-1	2,7	Liquido	Cat. 2
idrossido di potassio (5 % acq.)	1310-58-3	3	Liquido	Cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Solido	Cat. 2
eptanale	111-71-7	3,4	Liquido	Cat. 2

([1]) Queste sostanze di riferimento sono un sottoinsieme delle sostanze di riferimento usate nello studio di convalida.
([2]) Punteggio in vivo ai sensi del metodo B.4 e di OCSE Test Guideline 404 (4).
([3]) Nell'ambito del presente metodo di prova, la categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti) (1) è considerata una sostanza «senza categoria».
([4]) La categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite non si applica nell'ambito del regolamento CLP dell'UE.

PROCEDURA

15. Di seguito sono descritte le componenti e le procedure di un metodo su modello di epidermide umana ricostituita per la valutazione del potere di irritazione cutanea. Il modello dovrebbe essere ricostruito e può essere preparato internamente o acquistato sul mercato. Le procedure operative standard (SOP) per i modelli EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE sono disponibili (26)(27)(28). I test devono essere svolti come descritto di seguito.

Componenti del modello di epidermide umana ricostituita

Condizioni generali del modello

16. Per ricostruire l'epitelio devono essere utilizzati cheratinociti non trasformati di origine umana. Devono essere presenti molteplici strati di cellule epiteliali vitali (strato basale, strato spinoso, strato granuloso) sotto uno strato corneo funzionale. Lo strato corneo deve presentare molteplici strati con il profilo lipidico necessario per costituire una barriera funzionale solida capace di resistere alla penetrazione rapida dei marcatori tossici, ad esempio, sodio dodecil solfato (SDS) o Triton X-100. La funzione di barriera deve essere dimostrata e può essere valutata la concentrazione alla quale un marcatore riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso oppure determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % (ET_{50}) dopo l'applicazione del marcatore ad una concentrazione fissa predeterminata. Le proprietà di contenimento del modello devono essere tali da impedire il passaggio delle sostanze presenti attorno allo strato corneo verso i tessuti vitali, che inciderebbe negativamente sulla qualità della modellizzazione dell'esposizione cutanea. Il modello di pelle umana non deve essere contaminato da batteri, virus, micoplasmi o funghi.

▼M3

Condizioni funzionali del modello

Vitalità

17. Il saggio usato per la determinazione della vitalità è il test basato sull'MTT (25). Gli utilizzatori del modello devono accertarsi che ciascun lotto del modello impiegato soddisfi i criteri definiti per il controllo negativo (NC). La densità ottica (OD) del solo solvente di estrazione dovrebbe essere sufficientemente bassa, ossia OD< 0,1. Lo sviluppatore/il fornitore del modello stabilisce un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori OD del controllo negativo (nelle condizioni del metodo di prova dell'irritazione cutanea); gli intervalli di accettabilità per i tre metodi convalidati figurano nella tabella 2. Occorre documentare che i tessuti trattati con il controllo negativo sono stabili in coltura (ossia presentano misure di vitalità simili) nel corso del periodo di esposizione.

Tabella 2

Intervalli di accettabilità dei valori OD del controllo negativo

	Limite di accettazione inferiore	Limite di accettazione superiore
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Funzione barriera

18. Lo strato corneo e la relativa composizione lipidica devono essere sufficienti per resistere alla penetrazione rapida dei marcatori citotossici, come SDS o Triton X-100, valutata tramite i fattori IC_{50} o ET_{50} (tabella 3).

Morfologia

19. L'esame istologico del modello di epidermide umana ricostituita deve essere svolto in modo da dimostrare che la struttura è analoga all'epidermide umana (compreso lo strato corneo multiplo).

Riproducibilità

20. I risultati del controllo positivo (PC) e dei controlli negativi (NC) del metodo devono mostrare la riproducibilità nel tempo.

Controllo di qualità (QC)

21. Lo sviluppatore/fornitore del modello di epidermide deve garantire e dimostrare che ogni lotto del modello utilizzato rispetta determinati criteri di fabbricazione, i più rilevanti dei quali sono quelli relativi alla *vitalità* (punto 17), alla *funzione di barriera* (punto 18) e alla *morfologia* (punto 19). Tali informazioni devono essere fornite agli utilizzatori del metodo, perché possano inserirle nella relazione di prova. È opportuno che lo sviluppatore/il fornitore del modello di cute (o il ricercatore qualora si usi un modello prodotto internamente) stabilisca un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori di IC_{50} o di ET_{50}. Per una previsione affidabile degli effetti irritanti possono essere considerati accettabili solo i risultati ottenuti con tessuti idonei. A titolo di esempio, nella tabella 3 sono riportati gli intervalli di accettabilità per i tre metodi convalidati.

▼M3

Tabella 3

Esempi di criteri di QC dei lotti

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM) (trattamento di 18 ore con SDS)(26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	ET_{50} = 4,8 ore	ET_{50} = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(28)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 9,0 ore

Applicazione delle sostanze di prova e delle sostanze di controllo

22. Per ogni sostanza sperimentale e per i controlli devono essere utilizzate almeno tre repliche di tessuto per prova. Per le sostanze sia liquide che solide occorre applicare una quantità sufficiente della sostanza in esame fino a coprire uniformemente la superficie dell'epidermide evitando nel contempo una dose infinita, ossia un minimo di 25 µL/cm^2 o 25 mg/cm^2. Per le sostanze solide, la superficie dell'epidermide deve essere inumidita con acqua deionizzata o distillata prima dell'applicazione, al fine di migliorare il contatto tra la sostanza sperimentale e la superficie dell'epidermide. Quando possibile, i solidi dovrebbero essere testati sotto forma di polvere fine. Al termine del periodo di esposizione, la sostanza di prova deve essere tolta con cura dalla superficie dell'epidermide utilizzando un tampone acquoso o NaCl allo 0,9 %. In funzione del metodo RhE convalidato, il periodo di esposizione può variare da 15 a 60 minuti e la temperatura di incubazione da 20 a 37 °C. Questi periodi di esposizione e queste temperature sono ottimizzati per ciascun metodo basato su modelli di epidermide umana ricostituita e rappresentano le diverse proprietà intrinseche dei metodi; per maggiori dettagli consultare le procedure operative standard (SOP) per i tre metodi (26)(27)(28).

23. Occorre utilizzare simultaneamente controlli negativi (NC) e controlli positivi (PC) per ogni studio al fine di dimostrare che la vitalità (nell'NC), la funzione di barriera e la conseguente sensibilità (con il PC) dei tessuti rientrano in un intervallo di accettabilità storico determinato. La sostanza PC consigliata è una soluzione acquosa di SDS al 5 %. Le sostanze NC consigliate sono acqua o un tampone fosfato salino (PBS).

Misurazione della vitalità cellulare

24. L'elemento più importante del protocollo di prova è che le misure della vitalità non siano svolte immediatamente dopo l'esposizione alle sostanze in esame bensì dopo un periodo di incubazione post-trattamento sufficientemente lungo dei tessuti risciacquati in un mezzo fresco. Questo periodo consente sia il recupero da effetti citotossici blandi sia la comparsa di effetti citotossici evidenti. La fase di ottimizzazione del test (11) (12) (13) (14) (15) ha dimostrato che un periodo di incubazione post-trattamento di 42 ore è ottimale.

25. Il saggio MTT è un metodo quantitativo convalidato che dovrebbe essere utilizzato per misurare la vitalità cellulare nell'ambito del presente metodo di prova. È compatibile con l'utilizzo di un modello tridimensionale di tessuto. Il campione di tessuto è inserito in una soluzione MTT alla concentrazione adeguata (ad esempio, 0,3-1 mg/mL) per 3 ore. Il precipitato di formazan blu che si forma è successivamente estratto dal tessuto con un solvente (ad esempio, isopropanolo o con una soluzione isopropanolo/HCl 95:5), e ne viene misurata la concentrazione determinando la densità ottica a 570 nm con una banda passante massima di ± 30 nm.

▼M3

26. Le proprietà ottiche della sostanza in esame o la sua azione chimica sull'MTT potrebbero interferire con la prova, causando una stima errata della vitalità (perché la sostanza in esame potrebbe impedire o annullare la generazione di colore, oltre a causarla). Questo può verificarsi quando una specifica sostanza non viene completamente rimossa dal tessuto con il risciacquo o quando penetra nell'epidermide. Se la sostanza in esame agisce direttamente sull'MTT (riduttore dell'MTT), è naturalmente colorata o si colora durante il trattamento del tessuto, devono essere utilizzati controlli supplementari per individuare e correggere qualsiasi interferenza della sostanza di prova con la tecnica di misurazione della vitalità. Per una descrizione dettagliata di come correggere la riduzione diretta dell'MTT e le interferenze da parte degli agenti coloranti consultare le SOP dei metodi di riferimento convalidati (26)(27)(28).

Criteri di accettabilità

27. Per ogni metodo svolto utilizzando lotti di modelli di epidermide validi (cfr. il punto 21), i tessuti trattati con controllo negativo devono mostrare una densità ottica che rifletta la qualità dei tessuti sia dopo le fasi di spedizione e ricezione, sia durante l'applicazione di tutti i protocolli. I valori di OD dei controlli non devono essere inferiori ai limiti storici stabiliti. Allo stesso modo, i tessuti trattati con il controllo positivo, ossia soluzione acquosa di SDS al 5 %, devono riflettere la capacità dei tessuti di rispondere ad una sostanza irritante nelle condizioni del metodo di prova (26) (27) (28). È necessario definire misure correlate e adeguate di variabilità tra le repliche di tessuto (ad esempio, se vengono usate deviazioni standard, devono rientrare nell'intervallo di confidenza unilaterale al 95 %, calcolato da dati storici; per il metodo di riferimento convalidato le deviazioni standard devono essere < 18 %).

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

28. I valori di OD ottenuti per ciascun campione di prova possono essere utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità normalizzata rispetto al controllo negativo, il cui valore è fissato al 100 %. Il valore limite della percentuale di vitalità cellulare in base al quale si stabilisce la distinzione tra sostanze irritanti e sostanze non classificate e le procedure statistiche usate per analizzare i risultati e individuare le sostanze irritanti devono essere chiaramente definiti e documentati e deve esserne dimostrata l'idoneità. I valori limite per la previsione di irritazione sono riportati di seguito:

— La sostanza in esame è considerata irritante per la pelle conformemente alla categoria 2 del sistema GHS/CLP se la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è inferiore o uguale (≤) al 50 %.

— A seconda del quadro regolamentare in cui sono usati i risultati del presente metodo di prova, la sostanza di prova è considerata come non irritante per la cute (corrispondente alla voce «senza categoria» del sistema GHS/CLP) se la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è superiore (>) al 50 %.

DATI E RELAZIONI

Dati

29. Per ciascuna prova, i dati ottenuti da singole repliche dei tessuti (ad esempio, i valori OD e le percentuali di vitalità cellulare calcolate per ogni sostanza in esame, compresa la relativa classificazione) sono presentati sotto forma di tabella, compresi i dati delle prove ripetute, secondo le necessità. Sono inoltre registrati, per ogni prova, i valori medi ± la deviazione standard. Per ogni sostanza testata devono essere segnalate le interazioni osservate tra il reagente MTT e le sostanze in esame colorate.

▼**M3**

Relazione sull'esecuzione della prova

30. La relazione deve comprendere i seguenti dati:

Sostanze di prova e sostanze di controllo

— denominazioni chimiche, quali il nome e il numero CAS, il nome e il numero CE, se noti;

— purezza e composizione della sostanza (in percentuale ponderale);

— proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio (ad esempio, natura fisica, stabilità e volatilità, pH e solubilità in acqua, se nota);

— trattamento delle sostanze di prova/controllo prima del test, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— condizioni di conservazione;

Giustificazione per la scelta del modello di epidermide umana ricostituita e del metodo utilizzati

Condizioni di prova

— sistema cellulare utilizzato;

— informazioni complete sul modello di epidermide specifico utilizzato e sulla sua efficienza. Esse dovrebbero includere (elenco non esauriente):

  i) vitalità;

  ii) funzione di barriera;

  iii) morfologia;

  iv) riproducibilità e predittività;

  v) controlli di qualità (QC) del modello;

— dettagli del protocollo utilizzato;

— dosaggi usati per il test, durata dell'esposizione e del periodo di incubazione post-trattamento;

— descrizione di qualsiasi modifica del protocollo sperimentale;

— riferimenti a dati storici del modello. Essi dovrebbero includere (elenco non esauriente):

  i) accettabilità dei dati di QC rispetto ai dati storici del lotto;

  ii) accettabilità dei valori di controllo positivi e negativi rispetto alle medie e agli intervalli di controllo positivi e negativi;

— descrizione dei criteri di valutazione utilizzati, compresa la giustificazione per la scelta del valore o dei valori limite per il modello predittivo;

— riferimenti a dati storici del modello;

▼M3

Risultati

— presentazione sotto forma di tabella dei dati ottenuti da singole sostanze sperimentali per ciascuna prova e per ciascuna misurazione della replica;

— indicazione dei controlli usati per riduttori dell'MTT diretti e/o sostanze sperimentali coloranti;

— descrizione di altri effetti osservati;

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the «Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards», issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006, GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1.

(4) OCSE (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OCSE (2004),*In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OCSE (2004),*In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OCSE (2006),*In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OCSE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OCSE Series on Testing and Assessment No. 34, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The in vitro acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OCSE (2010), Explanatory background document to the OCSE draft Test Guideline on in vitro skin irritation testing. OCSE Series on Testing and Assessment, No. 137, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004),*In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for:*In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 *bis* test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Direttiva 2001/59/CE della Commissione, del 6 agosto 2001, recante ventottesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose, GU L 225, del 21.8.2001, pag. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

Appendice 1

Definizioni

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza» per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (9).

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale in una popolazione di cellule, per esempio la capacità delle deidrogenasi mitocondriali cellulari di ridurre il colorante vitale MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromide, tiazolil blu) che, in funzione del parametro misurato e del tipo di test utilizzato, corrisponde al numero totale e/o alla vitalità delle cellule viventi.

Concordanza: misura l'efficacia del metodo di prova per metodi che forniscono un risultato categorico e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato in modo intercambiabile con «accuratezza» ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze di prova che sono correttamente classificate come positive o negative. (9).

ET_{50}: può essere calcolato determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % in seguito all'applicazione del marcatore ad una concentrazione specifica e fissa; cfr. anche IC_{50}.

EU CLP [Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele]: attua nell'Unione europea (UE) il sistema GHS delle Nazioni Unite per la classificazione e l'etichettatura delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) (3).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) delle Nazioni Unite (ONU): un sistema di classificazione delle sostanze e miscele secondo tipi standardizzati e livelli di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di precauzioni e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

IC_{50}: può essere calcolato per determinazione della concentrazione alla quale un marcatore riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso, cfr. anche ET_{50}.

Dose infinita: quantità di sostanza in esame applicata all'epidermide che supera la quantità necessaria per coprire in maniera completa e uniforme la superficie dell'epidermide.

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento convalidato e accettato. Tale metodo di prova potrebbe essere candidato a convalide accelerate (catch-up validation). Usato in maniera intercambiabile con un metodo di prova simile (9).

Standard di prestazione (PS): standard basati su un metodo di riferimento convalidato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) i componenti essenziali del metodo; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento convalidato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento convalidato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (9).

▼**M3**

Sostanze chimiche di riferimento: sostanze chimiche selezionate per essere utilizzate nella procedura di convalida, di cui sono già note le risposte nel sistema di prova di riferimento in vitro o in vivo o le specie di interesse. Tali sostanze chimiche dovrebbero essere rappresentative delle classi di sostanze chimiche per le quali si prevede di utilizzare il metodo di prova, e dovrebbero rappresentare l'intera gamma di risposte prevedibili delle sostanze chimiche per le quali il metodo di prova può essere usato, ossia da forte a debole a negativa. Gruppi diversi di sostanze di riferimento possono essere richiesti per le diverse fasi del processo di convalida e per i diversi metodi di prova e utilizzi della prova (9).

Pertinenza: descrizione del rapporto del saggio con l'effetto di interesse e se esso è significativo e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui il saggio misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (9).

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (9).

Prova di sostituzione: una prova progettata per sostituire un saggio usato routinariamente e accettato per l'individuazione dei pericoli e/o la valutazione dei rischi, e che è stata determinata per fornire una protezione equivalente o maggiore della salute dell'uomo o degli animali oppure dell'ambiente, se del caso, rispetto alla prova accettata, per tutte le possibili situazioni sperimentali e le sostanze di prova (9).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze positive/attive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (9).

Irritazione cutanea: comparsa di danni reversibili sulla pelle a seguito dell'applicazione della sostanza di prova per una durata massima di 4 ore. L'irritazione cutanea è una reazione locale, non immunogenica, che si manifesta poco dopo la stimolazione (29). Si caratterizza essenzialmente per la reversibilità del processo, che comprende reazioni infiammatorie e la maggior parte dei segni clinici caratteristici dell'irritazione (eritema, edema, prurito e dolore) associati al processo infiammatorio.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze negative/inattive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (9).

Strategia di prova sequenziale: prove che ricorrono a metodi sperimentali in maniera sequenziale; i metodi di prova selezionati in ciascun livello consequenziale sono decisi in base ai risultati del precedente livello di prova (9).

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

▼M3

Appendice 2

Standard di prestazione per la valutazione di metodi in vitro simili basati su epidermide umana ricostituita (RHE), o di varianti di tali metodi, proposti per le prove di irritazione cutanea

INTRODUZIONE

1. Scopo degli standard di prestazione (PS) è comunicare il fondamento in base al quale è possibile determinare nuovi metodi, soggetti o meno al diritto di proprietà (ossia tutelati dal diritto d'autore, contrassegnati da marchio, registrati), per avere un'accuratezza e un'affidabilità sufficienti per specifici scopi sperimentali. Tali standard di prestazione, basati su metodi di prova convalidati e accettati, possono essere impiegati per valutare l'affidabilità e l'accuratezza di altri metodi analoghi (definiti metodi «strutturalmente analoghi»), basati su principi scientifici simili, e per misurare o prevedere lo stesso effetto biologico o tossico (9).

2. Prima dell'adozione di un metodo modificato (ossia di potenziali miglioramenti proposti rispetto a un metodo approvato), si dovrebbe effettuare una valutazione per stabilire l'effetto delle modifiche proposte sulla prestazione del saggio e la portata di tali modifiche sulle informazioni disponibili per le altri componenti del processo di convalida. A seconda del numero e della natura delle modifiche proposte, dei dati generati e della documentazione giustificativa di tali modifiche, queste ultime devono essere sottoposte al medesimo processo di convalida descritto per un nuovo saggio o, se del caso, a una valutazione ristretta dell'affidabilità e della pertinenza, sulla scorta di un PS consolidato (9).

3. I metodi simili («strutturalmente analoghi») rispetto ai tre metodi convalidati [EpiSkin™ (metodo di riferimento convalidato, VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE] o le varianti di tali metodi, proposti nel quadro del presente metodo di prova, devono essere valutati al fine di determinarne l'affidabilità e l'accuratezza utilizzando sostanze che rappresentano l'intervallo completo dei punteggi di irritazione di Draize. Se valutati utilizzando le 20 sostanze di riferimento consigliate dello standard di prestazione (tabella 1), i metodi simili proposti, o le varianti di tali metodi, devono avere valori di affidabilità e di accuratezza confrontabili o migliori rispetto a quelli ottenuti tramite il metodo di riferimento convalidato (tabella 2) (2) (16). I valori di affidabilità e accuratezza che dovrebbero essere raggiunti sono riportati nei punti da 8 a 12 della presente appendice. Le sostanze non classificate (ossia «senza categoria» nel sistema GHS/CLP) e classificate (nella categoria 2 del sistema GHS/CLP) (1) che rappresentano classi chimiche diverse sono incluse affinché i valori relativi all'affidabilità e all'accuratezza (sensibilità, specificità e accuratezza generale) del metodo proposto possano essere confrontati con quelli del metodo di riferimento convalidato. Prima di utilizzarlo per esaminare nuove sostanze determinare l'affidabilità del metodo e la sua capacità di individuare correttamente le sostanze irritanti di categoria 2 secondo il sistema GHS/CLP.

4. I presenti standard di prestazione sono basati sullo standard EC-ECVAM (8), aggiornato in conformità dei sistemi GHS dell'ONU e CLP dell'UE sulla classificazione e l'etichettatura (1) (3). Gli standard di prestazione originari erano stati definiti dopo il completamento dello studio di convalida (21) ed erano basati sul sistema di classificazione dell'UE previsto dalla direttiva 2001/59/CE della Commissione, del 6 agosto 2001, recante ventottesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose ([1]). In seguito all'adozione del

([1]) GU L 225 del 21.8.2001, pag. 1.

▼M3

sistema GHS delle Nazioni Unite per la classificazione e l'etichettatura nell'UE (regolamento CLP dell'UE) (3), avvenuta tra l'ultimazione dello studio di valutazione e il completamento del presente metodo di prova, gli standard di prestazione sono stati aggiornati (8). Tale aggiornamento consta prevalentemente di modifiche apportate: i) all'insieme delle sostanze di riferimento del PS; e ii) ai valori definiti per l'affidabilità e l'accuratezza (2) (23).

STANDARD DI PRESTAZIONE PER METODI DI PROVA RhE IN VITRO PER L'IRRITAZIONE CUTANEA

5. Gli standard di prestazione sono costituiti dai seguenti tre elementi (9):

I) componenti essenziali del metodo

II) elenco minimo di sostanze di riferimento

III) valori definiti di accuratezza e affidabilità

I) **Componenti essenziali del metodo**

6. Si tratta di elementi strutturali, funzionali e procedurali essenziali di un metodo convalidato che dovrebbero essere inclusi nel protocollo di un metodo proposto simile sotto il profilo meccanico e funzionale o di una sua variante. Tali componenti comprendono caratteristiche uniche del metodo, dettagli procedurali critici e misure di controllo della qualità. La conformità alle componenti essenziali del metodo di prova contribuirà a garantire che un metodo proposto simile o una sua variante poggi sui medesimi concetti del metodo di riferimento convalidato corrispondente (9). Le componenti essenziali del metodo di prova sono descritte nei punti da 16 a 21 del metodo di prova e le prove devono essere eseguite conformemente a:

— le condizioni generali (punto 16)

— le condizioni funzionali, che comprendono:

— la vitalità (punto 17);

— la funzione di barriera (punto 18);

— la morfologia (punto 19);

— la riproducibilità (punto 20);

— il controllo della qualità (punto 21).

II) **Elenco minimo di sostanze di riferimento**

7. Le sostanze di riferimento sono impiegate per determinare se l'affidabilità e l'accuratezza di un metodo di prova simile proposto, o di una sua variante, di cui è stata dimostrata una somiglianza sufficiente, sotto il profilo strutturale e funzionale, al metodo di riferimento convalidato, o che rappresenta una modifica di minore entità di uno dei tre metodi convalidati, sono comparabili o migliori rispetto all'affidabilità e all'accuratezza del metodo di riferimento convalidato (2) (8) (16) (23). Le 20 sostanze di riferimento raccomandate elencate nella tabella 1 comprendono le sostanze che rappresentano diverse classi chimiche di interesse (ossia categorie chimiche basate su gruppi funzionali) e l'intervallo completo dei punteggi di irritazione di Draize (da non irritante a fortemente irritante). Le sostanze incluse nell'elenco comprendono 10 sostanze appartenenti alla categoria 2 del sistema GHS/CLP e 10 sostanze non classificate, di cui 3 appartengono alla categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite. Per questo metodo, la categoria opzionale 3 non corrisponde a nessuna categoria. Le sostanze elencate nella tabella 1 sono selezionate tra le sostanze chimiche

▼M3

usate nella fase di ottimizzazione che è seguita alla pre-convalida e nello studio di convalida del metodo di riferimento convalidato, per quanto concerne la funzionalità chimica e lo stato fisico (14) (18). Tali sostanze di riferimento rappresentano il numero minimo di sostanze da utilizzare per valutare l'accuratezza e l'affidabilità di un metodo di prova simile proposto o di una sua variante, ma non devono essere usate per sviluppare nuovi metodi. Nelle situazioni in cui una delle sostanze elencate non sia disponibile possono essere utilizzate altre sostanze per le quali esistano adeguati dati di riferimento in vivo, prevalentemente selezionate dalle sostanze usate nella fase di ottimizzazione successiva alla pre-convalida o allo studio di convalida del metodo di riferimento convalidato. Facoltativamente, è possibile aggiungere all'elenco minimo di sostanze di riferimento altre sostanze che rappresentano classi chimiche diverse e per le quali sono disponibili adeguati dati di riferimento in vivo al fine di valutare più approfonditamente l'accuratezza del metodo proposto.

Tabella 1

Elenco minimo di sostanze di riferimento per la determinazione dei valori di accuratezza e affidabilità per metodi RhE simili o varianti di tali metodi per le prove di irritazione cutanea [1]

Sostanza	Numero CAS	Stato fisico	Punteggio in vivo	Cat. VRM in vitro	Categoria GHS/CLP in vivo
1-bromo-4-clorobutano	6940-78-9	Liquido	0	Cat. 2	Nessuna cat.
dietil ftalato	84-66-2	Liquido	0	Nessuna cat.	Nessuna cat.
acido 1-naftalenacetico	86-87-3	Solido	0	Nessuna cat.	Nessuna cat.
fenossiacetato di allile	7493-74-5	Liquido	0,3	Nessuna cat.	Nessuna cat.
isopropanolo	67-63-0	Liquido	0,3	Nessuna cat.	Nessuna cat.
4-metil-tio-benzaldeide	3446-89-7	Liquido	1	Cat. 2	Nessuna cat.
stearato di metile	112-61-8	Solido	1	Nessuna cat.	Nessuna cat.
butirrato di eptile	5870-93-9	Liquido	1,7	Nessuna cat.	Nessuna cat.
salicilato di esile	6259-76-3	Liquido	2	Nessuna cat.	Nessuna cat.
cinnamaldeide	104-55-2	Liquido	2	Cat. 2	Nessuna cat. (*Cat. opzionale 3*) [3]
1-decanolo [2]	*112-30-1*	*Liquido*	*2,3*	*Cat. 2*	*Cat. 2*
aldeide ciclamenica	103-95-7	Liquido	2,3	Cat. 2	Cat. 2
1-bromoesano	111-25-1	Liquido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
idrocloruro di 2-clorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina	86604-75-3	Solido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
disolfuro di di-n-propile [2]	*629-19-6*	*Liquido*	*3*	*Nessuna cat.*	*Cat. 2*
idrossido di potassio (5 % acq.)	1310-58-3	Liquido	3	Cat. 2	Cat. 2
benzenethiolo, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metile	7340-90-1	Liquido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Solido	3,3	Cat. 2	Cat. 2

▼M3

Sostanza	Numero CAS	Stato fisico	Punteggio in vivo	Cat. VRM in vitro	Categoria GHS/CLP in vivo
eptanale	111-71-7	Liquido	3,4	Cat. 2	Cat. 2
tetracloroetilene	127-18-4	Liquido	4	Cat. 2	Cat. 2

([1]) La selezione delle sostanze si basa sui seguenti criteri: i) le sostanze sono disponibili sul mercato; ii) sono rappresentative dell'intera gamma di punteggi di irritabilità di Draize (da non irritante a fortemente irritante); iii) hanno una struttura chimica ben definita; iv) sono rappresentative della funzionalità chimica usata nel processo di convalida; v) non sono associate ad un profilo estremamente tossico (ad esempio, cancerogeno o tossico per la riproduzione) e non comportano costi di smaltimento eccessivi.
([2]) Sostanze che sono irritanti nel coniglio ma per le quali esistono prove affidabili che non sono irritanti nell'uomo (31) (32) (33).
([3]) Nell'ambito del GHS, non menzionata nel CLP dell'UE

III) **Valori definiti di accuratezza e affidabilità**

8. Al fine di stabilire l'affidabilità e la pertinenza dei metodi simili proposti o di loro varianti da trasferire tra laboratori, tutte le 20 sostanze di riferimento della tabella 1 devono essere testate in almeno tre laboratori. Tuttavia, se il metodo proposto deve essere usato soltanto in un laboratorio, per la convalida non sono richieste prove effettuate in più laboratori. È comunque fondamentale che tali studi di convalida siano valutati in maniera indipendente da organismi di validazione riconosciuti a livello internazionale, in conformità delle linee guida internazionali (9). In ogni laboratorio, tutte le 20 sostanze di riferimento devono essere testate in tre prove indipendenti eseguite con diversi lotti di tessuto e in momenti sufficientemente distanziati tra loro. Ogni prova deve consistere in un minimo di tre repliche di tessuto testate simultaneamente per ogni sostanza sperimentale, per ogni campione negativo e per ogni campione positivo.

9. Il calcolo dei valori di affidabilità e accuratezza del metodo proposto dev'essere effettuato considerando tutti i quattro criteri riportati di seguito, garantendo che i valori di affidabilità e pertinenza siano calcolati in maniera predefinita e coerente:

   1. soltanto i dati di prove ottenuti da sequenze complete possono essere usati per calcolare la variabilità inter- e intralaboratoriale e la capacità predittiva (accuratezza) del metodo.

   2. La classificazione finale di ogni sostanza di riferimento in ogni laboratorio partecipante dev'essere ottenuta utilizzando il valore medio relativo alla vitalità nelle diverse prove di una sequenza completa.

   3. Soltanto i dati ottenuti per sostanze per le quali sono state condotte sequenze di prova complete in tutti i laboratori partecipanti possono essere utilizzati per calcolare la variabilità interlaboratorio del metodo.

   4. Il calcolo dei valori di accuratezza dev'essere fatto sulla base delle previsioni individuali di laboratorio ottenute per le 20 sostanze di riferimento dai vari laboratori partecipanti.

   In questo contesto, una **sequenza di prova** consiste in tre prove indipendenti condotte in un laboratorio per una sostanza sperimentale. Una **sequenza di prova completa** è una sequenza di prova condotta in un laboratorio per una sostanza sperimentale in cui tutte le prove siano valide. Ciò significa che un'eventuale prova non valida annulla la validità dell'intera sequenza di tre prove.

Riproducibilità intra-laborataorio

10. La valutazione della riproducibilità intra-laboratorio dovrebbe mostrare una concordanza delle classificazioni (categoria 2 e nessuna categoria del sistema GHS/CLP), ottenuta in prove diverse e indipendenti svolte sulle 20 sostanze di riferimento da uno stesso laboratorio, che deve essere pari o superiore (≥) al 90 %.

▼M3

Riproducibilità inter-laboratorio

11. La valutazione della riproducibilità inter-laboratorio non è essenziale se il metodo proposto deve essere utilizzato in un solo laboratorio. Per i metodi che devono essere trasferiti da un laboratorio all'altro, la concordanza delle classificazioni (categoria 2 e nessuna categoria del sistema GHS/CLP), ottenuta in prove diverse e indipendenti svolte sulle 20 sostanze di riferimento fra almeno tre laboratori, deve essere pari o superiore (≥) all'80 %.

Capacità predittiva (accuratezza)

12. L'accuratezza (sensibilità, specificità e accuratezza generale) del metodo simile proposto o di una sua variante dovrebbe essere comparabile o migliore a quella del metodo di riferimento convalidato, tenendo conto delle informazioni aggiuntive relative alla pertinenza nella specie di interesse (tabella 2). La sensibilità dovrebbe essere pari o superiore (≥) all'80 % (2) (8) (23). Tuttavia, un'ulteriore limitazione specifica si applica alla sensibilità del metodo in vitro proposto, nel senso che soltanto due sostanze in vivo della categoria 2, *1-decanolo e disolfuro di di-n-propile,* possono essere erroneamente considerate come non classificabili (senza categoria) da più di un laboratorio partecipante. La specificità dovrebbe essere pari o superiore (≥) al 70 % (2) (8) (23). Non esistono ulteriori limitazioni per quanto riguarda la specificità del metodo in vitro proposto, ossia qualsiasi laboratorio partecipante può erroneamente classificare qualsiasi sostanza in vivo senza categoria purché la specificità finale del metodo di prova rientri nell'intervallo accettabile. L'accuratezza generale dovrebbe essere pari o superiore (≥) al 75 % (2) (8) (23). Sebbene la sensibilità del metodo di riferimento convalidato calcolata per le 20 sostanze di riferimento elencate nella tabella 1 sia pari al 90 %, il valore minimo per la sensibilità richiesto per ogni metodo simile o una sua variante da considerare valido è fissato all'80 %, poiché sia *1-decanolo* (una sostanza borderline) sia e *disolfuro di di-n-propile* (un falso negativo del metodo di riferimento convalidato) sono note per essere prive di potenziale irritante nell'uomo (31) (32) (33), pur essendo state identificate come irritanti nel test sul coniglio. Poiché i modelli RhE si basano su cellule di origine umana, essi possono considerare tali sostanze come non irritanti («nessuna categoria» del sistema GHS/CLP).

Tabella 2

Valori predittivi richiesti per la sensibilità, la specificità e l'accuratezza generale per un qualsiasi metodo simile o sua variante da considerare validi

Sensibilità	Specificità	Accuratezza generale
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Criteri di accettazione dello studio

13. È possibile che una o più prove riguardanti una o più sostanze sperimentali non soddisfino i criteri di accettazione dello studio per le sostanze sperimentali e i controlli o non siano accettabili per altri motivi. Per integrare i dati mancanti, per ogni sostanza sperimentale è ammissibile un numero massimo di due prove aggiuntive («prove ulteriori»). Più precisamente, poiché in caso di prove ulteriori anche i controlli positivi e i controlli negativi devono essere testati simultaneamente, per ogni sostanza sperimentale può essere effettuato un numero massimo di due prove aggiuntive.

14. È possibile che, anche dopo le ulteriori prove, non si riesca a ottenere per ogni sostanza di riferimento il numero minimo di tre prove valide richiesto per ogni sostanza sperimentale in ogni laboratorio partecipante, il che comporterebbe la presenza di una matrice di dati incompleta. In questi casi, per poter considerare gli insiemi di dati accettabili, devono essere soddisfatti tutti i seguenti tre criteri:

    1. tutte le 20 sostanze di riferimento devono almeno avere una sequenza di prove completa.

▼**M3**

2. In ognuno di almeno tre laboratori partecipanti, almeno l'85 % delle sequenze di prova dev'essere completo (per 20 sostanze, ossia sono ammesse in un laboratorio 3 sequenze di prova non valide).

3. Almeno il 90 % di tutte le sequenze di prova possibili di almeno tre laboratori dev'essere completo (per 20 sostanze testate in 3 laboratori, ossia sono ammesse in totale 6 sequenze di prova non valide).

▼M2

B. 47 SAGGIO DI OPACITÀ E PERMEABILITÀ DELLA CORNEA NEI BOVINI (*BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY* – BCOP) PER L'IDENTIFICAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI

INTRODUZIONE

1. Il saggio di opacità e permeabilità della cornea nei bovini (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* - BCOP) è un metodo di saggio *in vitro* che può essere utilizzato, in determinate circostanze e con specifiche limitazioni, per la classificazione di sostanze e miscele come «agenti corrosivi e gravemente irritanti per gli occhi» (1) (2) (3). Ai fini del presente metodo di prova, sono definite sostanze gravemente irritanti le sostanze che inducono lesioni oculari che persistono nel coniglio per almeno 21 giorni dopo la somministrazione. Sebbene non sia considerato un metodo valido per sostituire completamente il saggio *in vivo* sugli occhi del coniglio, il metodo BCOP è consigliato quale parte integrante di una strategia di prove in sequenza per la classificazione e l'etichettatura, applicabile in uno specifico ambito normativo (4) (5). Le sostanze di prova e le miscele (6) possono essere classificate come sostanze corrosive o gravemente irritanti per gli occhi senza la necessità di condurre ulteriori prove sui conigli. Una sostanza che risulta negativa al saggio deve essere sottoposta a ulteriori saggi su coniglio facendo ricorso a una strategia di prove in sequenza, come descritto dalla linea guida OCSE 405, 7 (capitolo B. 5 del presente allegato).

2. Scopo di questo metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il potenziale di corrosione o di grave irritazione oculare di una sostanza di prova sulla base della capacità di tale sostanza di indurre opacità o aumentare la permeabilità di una cornea isolata di bovino. Gli effetti in termini di tossicità sulla cornea vengono misurati attraverso i) la diminuzione della luce trasmessa (opacità) e ii) l'aumento della quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che attraversa la cornea (permeabilità). Le valutazioni di opacità e permeabilità della cornea successivamente all'esposizione a una sostanza di prova vengono combinate per ottenere un punteggio di irritazione *in vitro* (*In Vitro Irritancy Score* – IVIS), utilizzato per classificare il livello di irritazione provocato dalla sostanza di prova.

3. Il metodo di prova BCOP è stato impiegato anche per analizzare sostanze irritanti per gli occhi in grado di causare lesioni che guariscono in meno di 21 giorni e sostanze non irritanti. Tuttavia, l'accuratezza e l'affidabilità del metodo di prova BCOP per le sostanze che rientrano nelle suddette categorie non sono state oggetto di valutazione formale.

4. L'appendice 1 riporta un elenco delle definizioni in uso.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITAZIONI

5. Il presente metodo di prova BCOP (8) si basa sul protocollo del Comitato di coordinamento interagenzia per la convalida dei metodi alternativi (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM), che è stato sviluppato in seguito ad uno studio internazionale in materia di convalida di metodi alternativi (4) (5) (9) con il contributo del Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) e del corrispondente organismo del Giappone (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM). Il protocollo si basa su informazioni ottenute dall'Istituto per le scienze in vitro (*Institute for In Vitro Sciences*, IIVS) e dal protocollo 124 della Banca dati tossicologici in vitro (*In-Vitro Toxicology data bank*, INVITTOX) (10), che costituisce il protocollo alla base dello studio sulla preconvalida del metodo di prova BCOP finanziato dalla Comunità europea nel 1997-1998. Entrambi i protocolli si basano sulla metodologia BCOP illustrata per la prima volta da Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Le limitazioni identificate per questo metodo di prova consistono nelle elevate percentuali di falsi positivi per alcoli e chetoni e nelle elevate percentuali di falsi negativi per i solidi, rilevate nella banca dati sulla convalida (cfr. paragrafo 44) (5). Quando si escludono dalla banca dati sostanze appartenenti a queste classi chimiche e fisiche si registra un marcato miglioramento dell'accuratezza del metodo di prova BCOP in tutti i sistemi di classificazione dell'Unione europea, dell'Agenzia di protezione ambientale statunitense (*Environmental Protection Agency* – EPA) e del Sistema mondiale armonizzato di classificazione e di etichettatura dei prodotti chimici delle Nazioni Unite (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — GHS) (5). Considerando l'obiettivo del presente saggio, che mira a identificare solamente sostanze corrosive/gravemente irritanti per gli occhi, le percentuali di falsi negativi non rappresentano un problema primario, poiché tali sostanze sarebbero oggetto di analisi successive nel coniglio o per mezzo di altri saggi *in vitro* debitamente convalidati, a seconda delle prescrizioni normative, applicando una strategia di saggio in sequenza, basata sulla forza probante dei dati disponibili. Inoltre, l'attuale banca dati di convalida non ha consentito di effettuare un'adeguata valutazione di alcune classi chimiche o di prodotto (ad esempio, delle miscele). I ricercatori potrebbero comunque considerare di utilizzare questo saggio per tutti i materiali di prova (comprese le miscele), accettando un risultato positivo come indicativo di una reazione a una sostanza corrosiva o gravemente irritante per gli occhi. I risultati positivi ottenuti con alcoli o chetoni andrebbero tuttavia interpretati con cautela, considerato il rischio di effettuare una sovrastima.

7. Tutte le procedure che prevedono l'impiego di occhi o cornee di bovini dovrebbero osservare le regolamentazioni e le procedure in vigore nella struttura che effettua l'analisi relativamente alla gestione dei materiali di derivazione animale che comprendono, tra l'altro, i tessuti e i liquidi tessutali. È raccomandata l'adozione delle comuni norme di cautela osservate nei laboratori (12).

8. Un limite del saggio è dato dal fatto che, sebbene esso prenda in esame alcuni degli effetti oculari valutati con il saggio di irritazione oculare nel coniglio e in certa misura anche la relativa gravità, non considera le lesioni della congiuntiva e dell'iride. Inoltre, nonostante il saggio BCOP non consenta di per sé di valutare la reversibilità delle lesioni corneali, studi condotti sugli occhi del coniglio suggeriscono di esaminare la profondità iniziale di una lesione corneale per distinguere se si è in presenza di effetti reversibili o irreversibili (13). Infine, il saggio BCOP non consente di valutare il potenziale di tossicità sistemica associato all'esposizione attraverso l'occhio.

9. Sono in atto studi per caratterizzare ulteriormente l'utilità e i limiti del metodo di prova BCOP per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi e di sostanze non irritanti (cfr. anche paragrafo 45). Gli utilizzatori sono altresì invitati a fornire campioni e/o dati di organismi di convalida per una valutazione formale della possibilità di impieghi futuri del saggio BCOP, anche per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi e di sostanze non irritanti.

10. Per i laboratori che ricorrono a questo tipo di saggio per la prima volta è consigliabile utilizzare le sostanze chimiche di riferimento indicate nell'appendice 2 per la verifica delle prestazioni del saggio. Un laboratorio può utilizzare tali sostanze chimiche per dimostrare le proprie competenze tecniche nell'esecuzione del saggio BCOP prima di presentare i dati del saggio BCOP a scopi normativi per la classificazione dei rischi.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

11. Il metodo di prova BCOP è un modello organotipico che mantiene a breve termine *in vitro* la normale funzionalità fisiologica e biochimica della cornea dei bovini. Questo metodo è utilizzato per la valutazione dei danni prodotti dalla sostanza di prova sulla base di misurazioni quantitative dei cambiamenti di opacità e permeabilità, effettuate rispettivamente con un opacimetro e uno spettrofotometro. Entrambe le misurazioni vengono impiegate per il calcolo del punteggio IVIS (*In Vitro Irritancy Score*), utilizzato per assegnare una categoria di classificazione di pericolo di irritazione *in vitro* per la previsione del potenziale di irritazione oculare *in vivo* di una sostanza di prova (cfr. criteri decisionali).

▼M2

12. Il metodo di prova BCOP impiega cornee isolate da occhi di bovini appena macellati. L'opacità corneale si misura con la quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. La permeabilità si misura con la quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che attraversa l'intero spessore della cornea ed é rilevata nel mezzo della camera posteriore. Le sostanze di prova vengono applicate alla superficie epiteliale della cornea e aggiunte alla camera anteriore del supporto corneale. L'appendice 3 riporta una descrizione e un diagramma del supporto corneale utilizzato per il saggio BCOP. I supporti corneali possono essere acquistati sul mercato da diversi fornitori o possono essere costruiti.

Origine ed età degli occhi dei bovini e selezione delle specie animali

13. I bovini inviati ai macelli vengono di norma abbattuti per il consumo umano o altri usi commerciali. Le cornee utilizzate per i saggi BCOP provengono esclusivamente da animali sani ritenuti idonei a essere immessi nella catena alimentare umana. Poiché i capi di bestiame sono di peso diverso a seconda della razza, dell'età e del sesso, non vi sono raccomandazioni relative al peso dell'animale al momento della macellazione.

14. L'impiego di animali di età diversa può comportare variazioni nelle dimensioni della cornea. Le cornee di diametro orizzontale > 30,5 mm e spessore corneale centrale (*central corneal thickness* – CCT) ≥ 1 100 μm si ottengono di norma da bovini di età superiore a otto anni, mentre le cornee che presentano un diametro orizzontale < 28,5 mm e un valore di CCT < 900 μm derivano solitamente da capi di bestiame di età inferiore a cinque anni (14). Per questo motivo non si utilizzano di norma occhi di bovini di età superiore a 60 mesi. Gli occhi dei bovini di età inferiore a 12 mesi non sono normalmente impiegati, in quanto sono ancora in fase di sviluppo e i valori relativi allo spessore e al diametro della cornea sono notevolmente inferiori rispetto ai corrispondenti parametri rilevati nei bovini adulti. L'impiego di cornee di animali giovani (ovvero di età compresa fra 6 e 12 mesi) è tuttavia ammesso in quanto comporta alcuni vantaggi, quali la maggiore disponibilità, la limitata fascia di età e la riduzione dei rischi legati alla potenziale esposizione del lavoratore all'encefalopatia spongiforme bovina (15). Sarebbe utile valutare ulteriormente gli effetti delle dimensioni o dello spessore corneali sulla capacità di reazione a sostanze corrosive e irritanti, pertanto si raccomanda agli utilizzatori di indicare la stima dell'età e/o del peso degli animali da cui provengono le cornee utilizzate in uno studio.

Prelievo e trasporto degli occhi in laboratorio

15. Gli occhi sono prelevati dai dipendenti del mattatoio. Per ridurre al minimo i danni meccanici o di altro tipo agli occhi, è consigliabile procedere all'enucleazione oculare appena possibile dopo l'abbattimento dell'animale. Durante il risciacquo della testa dell'animale è opportuno che i dipendenti del mattatoio non facciano uso di detergenti al fine di evitare l'esposizione degli occhi a sostanze potenzialmente irritanti.

16. Gli occhi vanno immersi completamente nella soluzione salina bilanciata di Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBBS) in un contenitore di dimensioni adeguate e trasportati in laboratorio in modo da ridurre al minimo il relativo deterioramento e/o la contaminazione batterica. Gli occhi sono prelevati durante il processo di macellazione e potrebbero pertanto essere esposti al sangue o ad altre sostanze biologiche, compresi batteri e microorganismi di altra natura. Per questo motivo è importante assicurare che il rischio di contaminazione sia ridotto al minimo (ad esempio, tenendo il contenitore degli occhi in ghiaccio o aggiungendo antibiotici alla soluzione HBSS utilizzata per conservare gli occhi durante il trasporto [ad esempio, penicillina a 100 IU/mL e streptomicina a 100 μg/mL]).

▼M2

17. È consigliabile ridurre al minimo l'intervallo temporale che intercorre fra il prelievo degli occhi e l'utilizzo delle cornee per il saggio BCOP (idealmente, gli occhi andrebbero raccolti e utilizzati nell'arco della stessa giornata) e accertare che tale intervallo non pregiudichi i risultati del saggio. I risultati in questione si basano sui criteri di selezione degli occhi e sulle reazioni dei controlli positivi e negativi. Per il saggio si suggerisce di utilizzare occhi prelevati nella medesima giornata e appartenenti ad uno stesso gruppo di prelievo.

Criteri di selezione degli occhi impiegati nel saggio BCOP

18. Giunti in laboratorio, gli occhi sono sottoposti a un attento esame volto a evidenziare la presenza di eventuali difetti, quali ad esempio aumento dell'opacità, graffi e neovascolarizzazione. Possono essere utilizzate solamente cornee provenienti da occhi privi di tali difetti.

19. La qualità di ciascuna cornea é valutata anche durante le fasi successive del saggio. Vanno scartate le cornee che presentano un valore di opacità superiore a sette unità (NOTA: l'opacimetro va tarato a valori di opacità standard impiegati per definire le unità di opacità, cfr. appendice 3) dopo un periodo di equilibratura iniziale di un'ora.

20. Ciascun gruppo di trattamento (sostanza di prova, controlli negativi e positivi paralleli) consiste di un minimo di tre occhi. Tre cornee dovrebbero essere utilizzate per le cornee di controllo negativo nel saggio BCOP. Poiché tutte le cornee sono tagliate dal bulbo intero e montate nelle camere corneali, vi è il rischio che maneggiando tali dispositivi vengano alterati i valori di opacità e permeabilità (compresi i valori relativi ai controlli negativi). Inoltre, i valori di opacità e permeabilità delle cornee di controllo negativo sono utilizzati per correggere i valori di opacità e permeabilità corneali relativi alla sostanza da saggiare e al controllo positivo nei calcoli IVIS.

PROCEDURA

Preparazione degli occhi

21. Le cornee prive di difetti sono dissezionate lasciando un bordo di 2-3 mm di sclera per permettere di maneggiarle più agevolmente in seguito e facendo attenzione a non danneggiare l'epitelio e l'endotelio corneale. Le cornee così separate sono montate in appositi supporti corneali composti da una sezione anteriore e una posteriore, che si interfacciano rispettivamente ai lati epiteliale ed endoteliale della cornea. Entrambe le camere sono riempite fino all'orlo con mezzo minimo essenziale di Eagle (EMEM) preriscaldato, riempiendo per prima la camera posteriore e facendo attenzione a evitare la formazione di bolle. L'apparecchio é poi equilibrato a 32 ± 1 °C per almeno un'ora per consentire alle cornee di equilibrarsi con il mezzo e raggiungere per quanto possibile la normale attività metabolica (la temperatura approssimativa della superficie corneale *in vivo* è di 32 °C).

22. Dopo il periodo di equilibratura si aggiunge il mezzo EMEM fresco preriscaldato in entrambe le camere e si rilevano i valori base di opacità per ciascuna cornea. Si scartano tutte le cornee che presentano danni macroscopici ai tessuti (ad esempio, graffi, pigmentazione, neovascolarizzazione) o un valore di opacità > 7 unità di opacità. Si calcola poi il valore medio dell'opacità di tutte le cornee equilibrate. Almeno tre cornee con valori di opacità prossimi al valore medio di tutte le cornee sono selezionate come controllo negativo (non trattate o trattate con il veicolo). Le cornee restanti sono poi allocate al gruppo di trattamento e al gruppo dei controlli positivi.

▼M2

23. La capacità termica dell'acqua è più elevata di quella dell'aria, di conseguenza l'acqua offre condizioni di temperatura più stabili per l'incubazione. Si suggerisce pertanto di utilizzare un bagno ad acqua per mantenere il supporto corneale e il relativo contenuto a una temperatura pari a 32 ± 1 °C. Si possono comunque utilizzare anche incubatori ad aria, a condizione che si adottino le necessarie cautele per il mantenimento di condizioni di temperatura stabili (ad esempio, preriscaldando i supporti e il mezzo in essi contenuto).

Applicazione della sostanza di prova

24. Si seguono due diversi protocolli di trattamento, uno per i liquidi e i tensioattivi (solidi o liquidi) e uno per i solidi non tensioattivi.

25. I liquidi sono analizzati non diluiti, mentre il saggio sui tensioattivi è eseguito a una concentrazione del 10 % w/v in una soluzione composta da cloruro di sodio 0,9 %, acqua distillata o altro solvente che abbia dimostrato di non avere ripercussioni negative sul sistema di saggio. Le sostanze semisolide, le creme e le cere sono di norma analizzate come liquidi. L'impiego di diluizioni diverse deve essere opportunamente motivato. Le cornee sono esposte ai liquidi e ai tensioattivi per 10 minuti. La scelta di altri tempi di esposizione va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche.

26. I solidi non surfattanti sono di norma analizzati sotto forma di soluzioni o sospensioni a una concentrazione del 20 % w/v, in una soluzione composta da cloruro di sodio 0,9 %, acqua distillata o altro solvente, che abbia dimostrato di non avere ripercussioni negative sul sistema di prova. In determinate circostanze e con opportune giustificazioni scientifiche i solidi possono anche essere analizzati non diluiti e applicati direttamente sulla superficie della cornea utilizzando il metodo della camera aperta (cfr. paragrafo 29). Le cornee sono esposte ai solidi per quattro ore, mentre in caso di applicazione di liquidi e tensioattivi è possibile scegliere tempi di esposizione alternativi a condizione che vengano fornite opportune motivazioni scientifiche.

27. A seconda della natura fisica e delle caratteristiche chimiche della sostanza di prova (ad esempio solidi, liquidi, liquidi viscosi vs. liquidi non viscosi) possono essere adottati diversi metodi di trattamento. La criticità sta nel garantire che la sostanza di prova copra adeguatamente la superficie epiteliale e che venga correttamente rimossa durante il risciacquo. Il metodo della camera chiusa é di norma impiegato per sostanze liquide da non viscose a leggermente viscose, mentre il metodo della camera aperta si utilizza di regola per sostanze di prova liquide da semiviscose a viscose e per solidi non diluiti.

28. Il metodo della camera chiusa prevede l'introduzione nella camera anteriore di una sostanza di prova in quantità sufficiente (750 µL) a coprire il lato epiteliale della cornea attraverso i fori di dosaggio posti sulla superficie superiore della camera. I fori sono successivamente sigillati con dei tappi durante l'esposizione. È importante assicurare che ciascuna cornea sia esposta alla sostanza di prova per l'intervallo di tempo necessario per il saggio.

29. Nel metodo della camera aperta, prima di eseguire il trattamento, occorre rimuovere dalla camera anteriore l'anello di chiusura della finestra e la finestra in vetro. La sostanza di controllo o di prova (750 µL o una quantità della sostanza di prova sufficiente a coprire interamente la cornea) é applicata direttamente alla superficie epiteliale della cornea con una micropipetta. Se una sostanza di prova è difficile da prelevare, può essere caricata a pressione in una pipetta a spostamento positivo per facilitare il dosaggio. Il puntale di una pipetta a spostamento positivo é inserito nel puntale di erogazione della siringa al fine di caricare sotto pressione il materiale nel puntale di spostamento. Contemporaneamente, lo stantuffo della siringa é premuto man mano che il pistone della pipetta è tirato verso l'alto. Se si formano delle bolle d'aria nel puntale della pipetta, occorre rimuovere (espellere) la sostanza di prova e ripetere il processo finché il puntale non sarà riempito senza che si creino bolle d'aria. È possibile all'occorrenza utilizzare una normale siringa (senza ago), poiché tale metodo consente la misurazione di un volume preciso di sostanza di prova e facilita l'applicazione della sostanza alla superficie epiteliale della cornea. Dopo il dosaggio, la finestra é riposizionata sulla camera anteriore per ricreare un sistema chiuso.

▼M2

Incubazione post-esposizione

30. Dopo il periodo di esposizione la sostanza di prova, la sostanza usata per il controllo negativo o la sostanza per il controllo positivo sono rimosse dalla camera anteriore e si lava l'epitelio é almeno tre volte (o comunque fino a che non restino ulteriori tracce visibili della sostanza di prova) con EMEM (contenente rosso fenolo). Si utilizza per il risciacquo il mezzo contenente rosso fenolo, in quanto è possibile monitorare l'eventuale cambiamento di colore del rosso fenolo per determinare l'efficacia del risciacquo di sostanze di prova acide o alcaline. Le cornee sono lavate più di tre volte nel caso in cui il rosso fenolo continui a scolorirsi, divenendo giallo o porpora, o se vi siano ancora tracce visibili della sostanza di prova. Non appena la sostanza di prova è stata completamente eliminata, le cornee sono sottoposte a un ultimo risciacquo con EMEM (senza rosso fenolo). Si impiega l'EMEM (senza rosso fenolo) per il risciacquo finale per assicurare che il rosso fenolo sia stato completamente rimosso dalla camera anteriore prima della misurazione dell'opacità. Si riempie la camera anteriore nuovamente con EMEM fresco senza rosso fenolo.

31. In caso di saggio su liquidi o tensioattivi, dopo il risciacquo le cornee restano in incubazione per ulteriori due ore a una temperatura di 32 ± 1°C. Un periodo più lungo di post-esposizione può rivelarsi utile in determinate circostanze e va valutato caso per caso. Le cornee trattate con i solidi sono risciacquate accuratamente al termine delle quattro ore di esposizione, ma non richiedono un ulteriore periodo di incubazione.

32. Al termine del periodo di post-incubazione per liquidi e tensioattivi e delle quattro ore di esposizione per i solidi non tensioattivi sono registrati i valori di opacità e permeabilità di ciascuna cornea. Inoltre, ogni cornea é sottoposta a esame visivo e sono registrate altre osservazioni utili (ad esempio, desquamazione dei tessuti, presenza di residui della sostanza di prova, opacità non uniforme). Queste osservazioni potrebbero essere importanti in quanto possono determinare eventuali variazioni dei dati registrati con l'opacimetro.

Sostanze di controllo

33. Ogni prova deve includere controlli positivi o negativi (solvente o mezzo disperdente) paralleli.

34. Nelle prove con sostanze liquide al 100 % il saggio BCOP comprende un controllo negativo parallelo (ad esempio, soluzione di cloruro di sodio allo 0,9 % o acqua distillata) al fine di rilevare eventuali cambiamenti non specifici nel sistema di prova e offrire una base di riferimento per i risultati del saggio. La presenza del controllo garantisce inoltre che non si verifichino reazioni irritanti a causa delle condizioni del saggio.

35. Nelle prove con liquidi diluiti, tensioattivi o solidi, il saggio BCOP comprende un gruppo di controlli (solventi o mezzi disperdenti) paralleli al fine di rilevare eventuali cambiamenti non specifici nel sistema di prova e offrire una base di riferimento per i risultati del saggio. Può essere utilizzato solo un solvente/mezzo disperdente che abbia dimostrato di non influire negativamente sul sistema di prova.

36. Ciascuna prova comprende un controllo positivo parallelo (noto irritante per occhi) per verificare la possibilità di indurre una reazione adeguata. Poiché il presente saggio utilizza il metodo di prova BCOP per l'identificazione di sostanze corrosive o gravemente irritanti, il controllo positivo ideale dovrebbe essere una sostanza di riferimento che induca una reazione grave con questo metodo di prova. Tuttavia il grado dell'irritazione non dovrebbe essere eccessivo, per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

37. Gli esempi di controlli positivi per le sostanze di prova liquide comprendono la dimetilformammide o una soluzione di idrossido di sodio all'1 %. Un esempio di controllo positivo per le sostanze di prova solide è il 20 % di imidazolo (peso per volume) in soluzione di cloruro di sodio allo 0,9 %.

▼M2

38. L'impiego di sostanze di riferimento è un modo utile per valutare il potenziale di irritazione oculare di sostanze chimiche sconosciute appartenenti a determinate classi di sostanze chimiche o prodotti o per la valutazione del potenziale di irritazione relativo di una sostanza irritante per occhi nell'ambito di una gamma specifica di reazioni irritanti.

Risultati misurati

39. L'opacità è determinata dalla quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. L'opacità corneale é misurata quantitativamente per mezzo di un opacimetro, che consente di ottenere valori di opacità misurati su una scala continua.

40. La permeabilità è determinata dalla quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che penetra negli strati cellulari della cornea (ovvero, l'epitelio sulla superficie esterna della cornea attraverso l'endotelio sulla superficie corneale interna). Si aggiunge 1 mL di soluzione di fluoresceina sodica (rispettivamente 4 o 5 mg/mL nella prova con sostanze tensioattivi o solidi non tensioattivi) alla camera anteriore del supporto corneale. Tale soluzione é a contatto con l'epitelio della cornea, mentre la camera posteriore, che è a contatto con il lato endoteliale della cornea, é riempita con EMEM fresco. Il supporto é poi messo in incubazione in posizione orizzontale per 90 ± 5 min a 32 ± 1 °C. La quantità di fluoresceina sodica che giunge alla camera posteriore é misurata attraverso la spettrofotometria UV/VIS. I dati spettrofotometrici rilevati a 490 nm sono registrati come valori di densità ottica (OD_{490}) o assorbanza e misurati su una scala continua. I valori di permeabilità della fluoresceina sono determinati utilizzando valori OD_{490} a partire da uno spettrofotometro a luce visibile impostato su una lunghezza di percorso standard di 1 cm.

41. In alternativa, è possibile utilizzare un lettore per piastra per microtitolazione a 96 pozzetti a condizione che: i) sia possibile stabilire la sequenza lineare sul lettore di piastra per la determinazione dei valori di fluoresceina OD_{490}; e ii) venga utilizzato il giusto volume di campione di fluoresceina nella piastra a 96 pozzetti al fine di ottenere valori di OD_{490} equivalenti alla lunghezza di percorso standard di 1 cm (a tal fine potrebbe essere necessario riempire i pozzetti interamente [di norma 360L]).

DATI E RENDICONTAZIONE

Valutazione dei dati

42. Appena saranno stati corretti i valori di opacità e permeabilità media (OD_{490}) con i valori dell'opacità di fondo e i valori di permeabilità OD_{490} dei controlli negativi, i valori medi di opacità e permeabilità OD_{490} relativi a ciascun gruppo di trattamento saranno utilizzati nella seguente formula empirica per il calcolo del punteggio di irritazione in vitro (*In Vitro Irritancy Score* – IVIS) per ciascun gruppo di trattamento:

IVIS = valore medio di opacità + (15 × valore medio di permeabilità OD_{490})

Secondo Sina *et al*. (16) suddetta formula è stata ottenuta grazie a studi interni e inter-laboratorio. I dati generati per una serie di 36 composti nell'ambito di uno studio che ha coinvolto più laboratori sono stati oggetto di un'analisi multivariata per la determinazione dell'equazione più appropriata per la correlazione fra dati *in vivo* e *in vitro*. L'analisi è stata eseguita dai ricercatori di due diverse aziende, che sono giunti a equazioni pressoché identiche.

43. I valori di opacità e permeabilità dovrebbero essere valutati separatamente per determinare se la sostanza di prova ha indotto corrosività o irritazione grave solo per uno dei due risultati (cfr. criteri decisionali).

▼M2

Criteri decisionali

44. Una sostanza che fa registrare un punteggio IVIS ≥ 55,1 é definita come corrosiva o gravemente irritante. Come indicato al paragrafo 1, se la sostanza di prova non è identificata come corrosiva o gravemente irritante per gli occhi è comunque consigliabile condurre altri saggi per la classificazione e l'etichettatura della sostanza stessa. Il metodo di prova BCOP ha un'accuratezza complessiva compresa fra il 79 % (113/143) e l'81 % (119/147), una percentuale di falsi positivi fra il 19 % (20/103) e il 21 % (22/103) e una percentuale di falsi negativi compresa fra il 16 % (7/43) e il 25 % (10/40), se si paragonano i risultati con i dati del saggio *in vivo* sugli occhi del coniglio secondo i sistemi di classificazione EPA (1), UE (2) o GHS (3). Se si escludono dalla banca dati sostanze che rientrano in determinate classi chimiche (ad esempio, alcoli, chetoni) o fisiche (ad esempio, solidi), l'accuratezza del saggio BCOP nei sistemi di classificazione UE, EPA e GHS varia fra l'87 % (72/83) e il 92 % (78/85), le percentuali di falsi positivi sono comprese fra il 12 % (7/58) e il 16 % (9/56) e le percentuali di falsi negativi sono fra lo 0 % (0/27) e il 12 % (3/26).

45. Anche nei casi in cui la sostanza di prova non possa essere classificata come corrosiva o gravemente irritante, i dati del saggio BCOP possono essere utili se associati ai dati del saggio *in vivo* sugli occhi del coniglio o di un saggio *in vitro* opportunamente convalidato, al fine di valutare ulteriormente l'utilità e i limiti del metodo di prova BCOP quale strumento per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi o sostanze non irritanti (è attualmente in corso la preparazione di linee guida sull'uso di metodi di prova *in vitro* per la tossicità oculare).

Criteri di accettazione dello studio

46. Un saggio è considerato accettabile se il punteggio IVIS risultante dal controllo positivo rientra fra due deviazioni standard dalla media storica, che va aggiornata con cadenza almeno trimestrale o comunque ogni volta in cui si effettui un saggio accettabile in laboratori nei quali le prove sono svolte con scarsa frequenza (ovvero, meno di una volta al mese). Le reazioni dei controlli negativi o dei veicoli dovrebbero corrispondere a valori di opacità e permeabilità inferiori ai limiti superiori stabiliti per i valori storici di opacità e permeabilità di cornee di bovini trattati con i relativi controlli negativi.

Rapporto di prova

47. Il rapporto di prova dovrebbe comprendere le seguenti informazioni, se pertinenti alla conduzione dello studio:

Sostanze di prova e di controllo

Denominazioni chimiche, quali le denominazioni strutturali utilizzate dal CAS (*Chemical Abstracts Service*) seguite da altri nomi, se conosciuti;

numero di registro CAS (RN), se conosciuto;

purezza e composizione della sostanza o della miscela (in percentuale ponderale), nella misura in cui l'informazione è disponibile;

proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali lo stato fisico, la volatilità, il pH, la stabilità, la classe chimica e la solubilità in acqua;

trattamento delle sostanze di prova/di controllo prima del saggio, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

stabilità, se conosciuta.

▼M2

Informazioni relative allo sponsor e ai centri di prova

Nome e indirizzo dello sponsor, del centro di prova e del responsabile dello studio;

identificazione dell'origine degli occhi (ovvero, la struttura presso la quale sono stati prelevati);

condizioni di conservazione e trasporto degli occhi (ad esempio, data e ora del prelievo, intervallo di tempo prima dell'inizio della prova, mezzi di trasporto e condizioni di temperatura, eventuali antibiotici usati);

se disponibili, informazioni relative a caratteristiche specifiche degli animali dai quali sono stati prelevati gli occhi (ad esempio, età, sesso, peso dell'animale donatore).

Giustificazione del metodo di prova e del protocollo utilizzato

Integrità del metodo di prova

Procedura utilizzata per assicurare l'integrità (ovvero, l'accuratezza e l'affidabilità) del metodo di prova nel tempo (ad esempio, attraverso saggi periodici delle sostanze di riferimento per la verifica delle prestazioni, utilizzo di dati storici sui controlli negativi e positivi).

Criteri di accettabilità del saggio

Serie di controlli positivi e negativi paralleli accettabili, basati su dati storici;

se applicabili, serie di controlli di riferimento paralleli, basati su dati storici.

Condizioni di prova

Descrizione del sistema di prova utilizzato;

tipo di supporto corneale impiegato;

informazioni di taratura per gli apparecchi utilizzati per le misurazioni di opacità e permeabilità (ad esempio, opacimetro e spettrofotometro);

informazioni sulle cornee bovine utilizzate, comprese dichiarazioni relative alla loro qualità;

dettagli delle procedure di prova adottate;

concentrati della sostanza di prova utilizzati;

descrizione di ogni eventuale modifica alla procedura;

riferimento ai dati storici del modello (ad esempio, controlli negativi e positivi, sostanze per la verifica delle prestazioni del modello, sostanze di riferimento);

descrizione dei criteri di valutazione impiegati.

Risultati

Presentazione in forma tabulare dei dati relativi ai singoli campioni di prova (ad esempio, valori di opacità e OD_{490} e punteggio IVIS calcolato per la sostanza di prova, i controlli positivi, negativi e di riferimento [se compresi], compresi i dati delle prove ripetute e i valori medi ± la deviazione standard per ciascuna prova);

descrizione degli altri effetti osservati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼**M2**

(2) Regolamento n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e reca modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006. GU L 353, 31.12.2008, pag. 1.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Online:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Online:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) CE (2006). Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE della Commissione. GU L 396, 30.12.2006, pag. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Online:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Online:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: prossimità fra i risultati del metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura il rendimento del metodo di prova e rappresenta un aspetto della «rilevanza». Il termine è spesso sostituibile con «concordanza», a indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova.

Affidabilità: misura la possibilità di eseguire un metodo di prova in maniera riproducibile nel tempo all'interno dei laboratori e fra di essi seguendo lo stesso protocollo. Si valuta calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori.

Categoria EPA 1: sostanza corrosiva (distruzione irreversibile del tessuto oculare) o interessamento o irritazione della cornea persistenti per oltre 21 giorni (1).

Categoria GHS 1: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza di prova sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione (3).

Categoria UE R41: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza di prova sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione (2).

Controllo negativo: un duplicato non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Il campione é saggiato con campioni trattati con la sostanza e altri campioni di controllo per determinare se il veicolo interagisce con il sistema di prova.

Controllo positivo: un duplicato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che si tratta con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Il grado dell'irritazione non dovrebbe essere eccessivo per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

Controllo solvente/mezzo disperdente: campione non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova, compreso il solvente e il mezzo disperdente (veicolo) usato con la sostanza di prova saggiato con gli altri campioni di controllo al fine di stabilire la reazione di base nei campioni trattati con la sostanza di prova disciolta nello stesso solvente o mezzo disperdente. Nelle prove con controlli negativi paralleli, questo campione dimostra anche se il veicolo è in grado di interagire con il sistema di prova.

Cornea: parte trasparente frontale del bulbo oculare che copre l'iride e la pupilla e consente il passaggio della luce verso l'interno.

Corrosivo oculare: a) sostanza che causa danni irreversibili ai tessuti oculari; b) sostanza classificata come irritante per gli occhi GHS categoria1, EPA categoria I o UE categoria R41 (1) (2) (3).

Forza probante: il processo che consiste nel tener conto dei punti di forza e di debolezza di informazioni diverse per conseguire e supportare una data conclusione relativa al potenziale di pericolo di una sostanza.

GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*): un sistema che propone la classificazione delle sostanze e miscele chimiche in base a tipi e livelli standardizzati di rischi fisici, per la salute e ambientali, e applica elementi di comunicazione corrispondenti, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede tecniche di sicurezza, al fine di trasmettere informazioni sui loro effetti nocivi e garantire la protezione di persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e operatori dei servizi di soccorso) e ambiente (3).

▼M2

Grave irritante oculare: a) sostanza che causa danni ai tessuti oculari in seguito all'applicazione sulla superficie anteriore dell'occhio non risolvibili entro 21 giorni dall'applicazione o indebolimento fisico grave della vista; b) sostanze classificate come irritanti per gli occhi GHS categoria 1, EPA categoria I o UE categoria R41 (1) (2) (3).

Irritante oculare: a) sostanza che produce cambiamenti reversibili negli occhi in seguito all'applicazione sulla superficie anteriore dell'occhio; b) sostanza classificata come irritante per gli occhi EPA categorie II e III, UE categorie R36 e GHS categorie 2A e 2B (1) (2) (3).

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di convalida per determinare la rilevanza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato.

Non-irritante: sostanza non classificata come irritante per gli occhi EPA categorie I, II e III; UE categorie R41 e R36; o GHS categorie 1, 2A e 2B (1)(2)(3).

Opacimetro: strumento impiegato per la misurazione dell'«opacità corneale» attraverso la determinazione della quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. Lo strumento tipico ha due comparti, ciascuno provvisto della sua fonte di luce e di una fotocellula. Un comparto é utilizzato per la cornea trattata, mentre l'altro per la taratura e l'azzeramento dello strumento. La luce emessa da una lampada alogena é irradiata attraverso un comparto di controllo (rappresentato da una camera vuota senza finestre o liquidi) a una fotocellula e confrontata con la luce trasmessa a una fotocellula attraverso il comparto di prova in cui si trova la camera contenente la cornea. Si confronta la differenza di luce trasmessa dalle fotocellule e un valore numerico di opacità è visualizzato su un display digitale.

Opacità corneale: misurazione del grado di opacità della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza di prova. Un aumento dell'opacità corneale è indice di danni alla cornea. L'opacità può essere valutata in modo soggettivo, come nel test sugli occhi dei conigli di Draize, o oggettivo utilizzando uno strumento come un «opacimetro».

Percentuale di falsi negativi: percentuale di tutte le sostanze positive erroneamente identificate come negative da un metodo di prova. È un indicatore della prestazione del metodo di prova.

Percentuale di falsi positivi: percentuale di tutte le sostanze negative erroneamente identificate come positive da un metodo di prova. È un indicatore della prestazione del metodo di prova.

▼M2

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione di causare potenzialmente effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

Permeabilità corneale: misurazione quantitativa dei danni all'epitelio corneale, effettuata attraverso la determinazione della quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che attraversa tutti gli strati cellulari della cornea.

Prove in sequenza: strategia di prove graduali in cui sono riesaminate tutte le informazioni disponibili su una sostanza di prova, secondo un ordine ben specificato, seguendo un approccio basato sulla forza probante dei dati disponibili per ciascuna prova, al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per una decisione sulla classificazione del pericolo prima di procedere alla fase successiva. Se è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza di prova in base alle informazioni disponibili, non è necessario svolgere prove aggiuntive. Se non è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza di prova in base alle informazioni disponibili, si svolge una procedura di prova graduale in sequenza su animali fino a che non é possibile effettuare una classificazione inequivocabile.

Punteggio di irritazione in vitro (*In Vitro Irritancy Score*, IVIS): formula empirica utilizzata nel saggio BCOP con la quale i valori medi di opacità e permeabilità relativi a ciascun gruppo di trattamento sono combinati per ottenere un unico punteggio in vitro per ogni gruppo di trattamento. *IVIS* = valore di opacità medio + (15 x valore di permeabilità medio)

Sostanza di riferimento: sostanza usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti, e) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

▼M2

Appendice 2

Sostanze chimiche per la verifica della prestazione nel metodo di prova BCOP

Prima di utilizzare regolarmente un metodo di prova che soddisfi i requisiti del presente metodo, i laboratori possono decidere di dimostrare le prestazioni tecniche identificando correttamente la classificazione di corrosività oculare delle 10 sostanze raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze sono state selezionate quali rappresentative di una serie di reazioni locali di irritazione/corrosione degli occhi, sulla base di risultati del saggio sugli occhi del coniglio *in vivo* (TG 405) (ovvero, categorie 1, 2A, 2B, o non classificato ed etichettato in base alla classificazione UN GHS (3) (7). Tuttavia, in considerazione dell'utilità comprovata di tali saggi (che consiste nell'identificare esclusivamente corrosivi/gravi irritanti oculari) esistono solo due risultati di prova utili ai fini di una classificazione (corrosivo/gravemente irritante o non corrosivo/non gravemente irritante) per dimostrare la prestazione. Gli altri criteri di selezione comprendevano la disponibilità delle sostanze sul mercato, la presenza di dati di elevata qualità che fungono da riferimento per gli studi *in vivo*, nonché di dati di qualità di riferimento concernenti i due metodi *in vitro* per i quali le linee guida dei saggi sono attualmente in fase di elaborazione. Per questa ragione, sono state selezionate sostanze irritanti dall'elenco raccomandato ICCVAM di 122 sostanze di riferimento per la convalida di saggi *in vitro* di tossicità oculare (cfr. appendice H: sostanze di riferimento raccomandate ICCVAM) (5). I dati di riferimento relativi sono disponibili nella documentazione ICCVAM relativa ai saggi BCOP e ICE (*ICCVAM Background Review Documents for BCOP and Isolated Chicken Eye (ICE) test method*) (17) (18).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica del rendimento tecnico con il metodo BCOP

Sostanza	CASRN	Classe chimica ([1])	Forma fisica	Classificazione ([2]) *in Vivo*	Classificazione ([3]) *in Vitro*
Cloruro di benzalconio (5 %)	8001-54-5	Composto ionico	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Clorexidina	55-56-1	Ammina, ammidina	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Acido dibenzoil-L-tartarico	2743-38-6	Acido carbossilico, estere	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Imidazolo	288-32-4	Composto eterociclico	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Acido tricloroacetico (30 %)	76-03-9	Acido carbossilico	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
2,6-Diclorobenzoilcloruro	4659-45-4	Acil-alogenuro	Liquido	Categoria 2A	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Etil 2-metilacetoacetato	609-14-3	Chetone, estere	Liquido	Categoria 2B	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Nitrato di ammonio	6484-52-2	Sale inorganico	Solido	Categoria 2A	Non corrosivo/Non gravemente irritante

▼**M2**

Sostanza	CASRN	Classe chimica (1)	Forma fisica	Classificazione (2) *in Vivo*	Classificazione (3) *in Vitro*
Glicerolo	56-81-5	alcol	Liquido	Non etichettato	Non corrosivo/Non gravemente irritante
n-esano	110-54-3	Idrocarburo (aciclico)	Liquido	Non etichettato	Non corrosivo/Non gravemente irritante

Abbreviazioni: CASRN = numero CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*).

(1) Ciascuna sostanza di prova è stata assegnata a classi chimiche definite in base a un sistema di classificazione standard, basato sul sistema di classificazione della *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibile online al sito http// www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Basata sui risultati del saggio sugli occhi dei conigli *in vivo* (OECD TG 405) e sul sistema di classificazione UN GHS (3)(7).

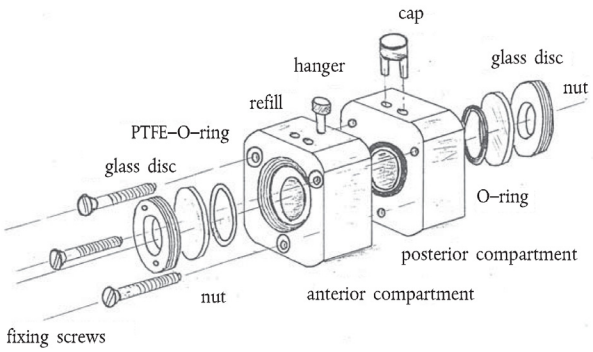
(3) Basata sui risultati dei test BCOP e ICE.

▼M2

Appendice 3

IL SUPPORTO CORNEALE PER IL SAGGIO BCOP

1. I supporti corneali impiegati per il test BCOP sono fatti di materiale inerte (ad esempio, polipropilene). I supporti constano di due metà (una camera anteriore e una posteriore) e presentano due camere cilindriche interne simili. Ciascuna camera ha una capacità di 5 mL e termina in una finestra di vetro attraverso la quale sono registrate le misurazioni relative all'opacità. Ciascuna camera interna ha un diametro di 1,7 cm ed è profonda 2,2 cm ([1]). Un anello ad O posto sulla camera posteriore serve a prevenire fuoriuscite. Le cornee sono posizionate dal lato dell'endotelio in basso sull'anello a O delle camere posteriori, mentre le camere anteriori sono poste dal lato dell'epitelio delle cornee. Le camere sono mantenute in posizione da tre viti in acciaio inossidabile poste sui bordi esterni della camera. L'estremità di ciascuna camera presenta una finestra in vetro che può essere rimossa per facilitare l'accesso alla cornea. Un anello a O è posizionato anche fra la finestra in vetro e la camera per prevenire fuoriuscite. Due aperture nella parte superiore di ciascuna camera consentono di introdurre ed estrarre il mezzo e i composti usati per la prova. Le aperture sono chiuse con tappi di gomma durante le fasi di trattamento e incubazione.



Legenda

Glass disc: disco di vetro

PTFE-O-ring: anello ad O di PFTE

Refill: camera di riempimento

Hanger: sospensore

Cap: tappo

Nut: dado

O-ring: anello ad O

Posterior compartment: camera posteriore

Anterior compartment: camera anteriore

Fixing screws: viti di fissazione

([1]) Le dimensioni fornite si riferiscono a un supporto corneale utilizzato per capi di bestiame di età compresa fra 12 e 60 mesi. Se l'esame è svolto su animali fra i 6 e i 12 mesi di età, il supporto deve essere realizzato in modo tale che ciascuna camera abbia una capacità di 4 mL e che ciascuna camera interna presenti un diametro di 1,5 cm e una profondità di 2,2 cm. Per ogni nuovo supporto corneale è necessario che fra l'area della cornea esposta e il volume della camera posteriore sia mantenuto lo stesso rapporto del supporto corneale tradizionale. Ciò è necessario per garantire la corretta determinazione dei valori di permeabilità per il calcolo dell'IVIS con la formula proposta.

▼**M2**

L’OPACIMETRO

2. L’opacimetro è un dispositivo di misurazione della luce trasmessa. La luce emessa da una lampada alogena é irradiata attraverso un comparto di controllo (una camera vuota senza finestre o liquidi) a una fotocellula e confrontata con la luce trasmessa a una fotocellula attraverso il comparto di prova in cui si trova la camera contenente la cornea. E’confrontata la differenza di trasmissione luminosa tra le fotocellule e un display digitale visualizza un valore numerico di opacità. Le unità di opacità sono predefinite.

3. L’opacimetro dovrebbe fornire una risposta lineare a partire da una serie di valori di opacità registrati, che coprono tutte le soglie critiche utilizzate per le diverse classificazioni descritte dal modello predittivo (ovvero, fino alla soglia critica che determina la presenza di corrosività/irritazione grave). Per garantire letture lineari e accurate fino a 75-80 unità di opacità occorre tarare l’opacimetro attraverso una serie di calibratori. I calibratori (fogli opachi di poliestere), sono disposti all’interno della camera di taratura (una camera corneale realizzata per sostenere i calibratori) e leggono i valori sull’opacimetro. La camera di taratura è concepita per alloggiare i calibratori all’incirca alla stessa distanza fra la luce e la fotocellula, alla quale sarebbero poste le cornee durante le misurazioni di opacità. L’opacimetro é inizialmente tarato a 0 unità di opacità utilizzando la camera di taratura senza calibratore. Tre diversi calibratori sono poi disposti all’interno della camera di taratura uno dopo l’altro e i valori di opacità sono successivamente registrati. I calibratori 1, 2 e 3 dovrebbero corrispondere a valori registrati di opacità pari alla rispettiva serie di valori rispettivamente di 75, 150 e 225 unità di opacità, con una tolleranza di ± 5 %.

▼M2

B 48 **METODO DI PROVA SULL'OCCHIO ISOLATO DEI POLLI (ISOLATED CHICKEN EYE - ICE) PER L'IDENTIFICAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI**

INTRODUZIONE

1. Il saggio sull'occhio isolato dei polli (*Isolated Chicken Eye* – ICE) è un metodo di test *in vitro* che può essere utilizzato in determinate circostanze ed entro certi limiti per la classificazione di sostanze e miscele come «agenti corrosivi e gravemente irritanti per gli occhi» (1) (2) (3). Ai fini delle presenti linee guida per il saggio, sono definite sostanze gravemente irritanti le sostanze che inducono lesioni oculari nel coniglio che permangono per almeno 21 giorni dopo la somministrazione. Sebbene non sia considerato un saggio atto a sostituire completamente il saggio *in vivo* sugli occhi del coniglio, l'utilizzo del metodo ICE è consigliato quale parte integrante di una strategia di prove in sequenza per la classificazione normativa e l'etichettatura nell'ambito di una specifica sfera di applicabilità (4) (5). Le sostanze e le miscele di prova (6) che risultano positive a questo tipo di saggio possono essere classificate come corrosive o gravi irritanti oculari senza la necessità di condurre ulteriori prove nel coniglio. Una sostanza che risulta negativa al saggio deve essere sottoposta a ulteriori saggi nel coniglio facendo ricorso a una strategia di prove in sequenza, come descritto dalla linee guida OCSE 405, 7 (capitolo B. 5 del presente allegato).

2. Scopo di questo metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il potenziale di corrosione o di grave irritazione oculare di una sostanza di prova sulla base della capacità di tale sostanza di indurre la tossicità in un occhio enucleato di pollo. Gli effetti tossici sulla cornea sono misurati attraverso i) una valutazione qualitativa dell'opacità, ii) una valutazione qualitativa dei danni all'epitelio in base all'applicazione di fluoresceina all'occhio (ritenzione della fluoresceina), iii) una misurazione quantitativa dell'aumento dello spessore (rigonfiamento), e iv) una stima qualitativa di eventuali danni morfologici macroscopici in superficie. L'opacità, il rigonfiamento e le stime dei danni della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza di prova sono valutati individualmente e poi cumulativamente per formulare un sistema di classificazione di irritazione oculare (*Eye Irritancy Classification*).

3. Il metodo di prova ICE è stato impiegato anche per analizzare sostanze irritanti per gli occhi in grado di causare lesioni che guariscono in meno di 21 giorni e sostanze non irritanti. Tuttavia, l'accuratezza e l'affidabilità del metodo di saggio ICE per le sostanze che rientrano nelle suddette categorie non sono state oggetto di valutazione formale.

4. L'appendice 1 riporta un elenco delle definizioni in uso.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITAZIONI

5. Il presente metodo di prova ICE (8) si basa sul protocollo del Comitato di coordinamento interagenzia per la convalida dei metodi alternativi (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM), che è stato sviluppato in seguito ad uno studio internazionale di convalida di metodi alternativi (4) (5) (9) con il contributo del Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) e del corrispondente organismo del Giappone (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM)) e del dipartimento di tossicologia e farmacologia applicata per la qualità della vita (TNO). Il protocollo si basa su informazioni ottenute da protocolli già pubblicati, nonché dal protocollo impiegato dalla TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Le limitazioni identificate per questo metodo sono relative alla percentuale di falsi positivi per gli alcoli e alle percentuali di falsi negativi per i solidi e i tensioattivi (cfr. paragrafo 47) (4). Quando si escludono dalla banca dati sostanze appartenenti a queste classi chimiche e fisiche si registra un marcato miglioramento dell'accuratezza del metodo di prova ICE in tutti i sistemi di classificazione dell'Unione europea, dell'Agenzia di protezione ambientale statunitense (*Environmental Protection Agency* – EPA) e del Sistema generale armonizzato di classificazione e di etichettatura dei prodotti chimici delle Nazioni Unite (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — GHS) (4). Considerando l'obiettivo del presente saggio, che mira a identificare solamente corrosivi e gravi irritanti oculari, le percentuali di falsi negativi non rappresentano un problema primario poiché tali sostanze sarebbero oggetto di analisi successive nel coniglio o per mezzo di altri saggi *in vitro* debitamente convalidati, a seconda delle prescrizioni normative, applicando una strategia di saggio in sequenza basata sulla forza probante dei dati disponibili. Inoltre, la banca dati di convalida attuale non ha consentito di effettuare un'adeguata valutazione di alcune classi chimiche o di prodotto (ad esempio, delle miscele). I ricercatori potrebbero comunque considerare di utilizzare questo saggio per tutti i materiali di prova (comprese le miscele), accettando un risultato positivo come indicativo di una reazione oculare a una sostanza corrosiva o gravemente irritante. I risultati positivi ottenuti con gli alcoli andrebbero tuttavia interpretati con cautela, considerato il rischio di effettuare previsioni non corrette.

7. Tutte le procedure che prevedono l'impiego di occhi di polli dovrebbero osservare le regole e le procedure in vigore nella struttura che effettua l'analisi relativamente alla gestione di materiali di derivazione umana o animale che comprendono, tra l'altro, i tessuti e i liquidi tessutali. È consigliabile adottare le comuni norme di cautela osservate nei laboratori (15).

8. Un limite del metodo di prova è che, sebbene il saggio prenda in esame alcuni degli effetti oculari valutati con il saggio di irritazione oculare nel coniglio e in certa misura anche la relativa gravità, non considerale lesioni della congiuntiva e dell'iride. Inoltre, nonostante il saggio ICE non consenta di per sé di valutare la reversibilità delle lesioni corneali, studi condotti sugli occhi del coniglio suggeriscono di esaminare la profondità iniziale di una lesione corneale per distinguere se si è in presenza di effetti reversibili o irreversibili (16). Infine, il saggio ICE non consente di valutare il potenziale di tossicità sistemica associato all'esposizione attraverso l'occhio.

9. Sono in atto studi per caratterizzare ulteriormente l'utilità e i limiti del metodo di prova ICE per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi e di sostanze non irritanti (cfr. anche paragrafo 48). Gli utilizzatori sono altresì invitati a mettere campioni e/o dati a disposizione di organismi di convalida in grado di valutare formalmente la possibilità di impieghi futuri del saggio ICE, anche per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi e di sostanze non irritanti per gli occhi.

10. Per i laboratori che ricorrono a questo tipo di saggio per la prima volta è consigliabile utilizzare le sostanze chimiche di riferimento indicate nell'appendice 2 per la verifica delle prestazioni del saggio. Un laboratorio può utilizzare tali sostanze chimiche per dimostrare le proprie competenze tecniche nell'esecuzione del saggio ICE prima di presentare i dati relativi al saggio ICE a fini normativi di classificazione dei rischi.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

11. Il metodo di prova ICE è un modello organotipico per il mantenimento di occhi di pollo a breve termine *in vitro*. Questo saggio consente di valutare i danni prodotti dalla sostanza di prova in base al rigonfiamento, all'opacità e alla ritenzione di fluoresceina della cornea. Mentre gli ultimi due parametri richiedono una valutazione qualitativa, l'analisi del rigonfiamento della cornea è di tipo quantitativo. Ciascuna misurazione é convertita in un punteggio quantitativo usato per calcolare un indice di irritazione complessivo, o in alternativa fatta rientrare in categorie qualitative volte ad attribuire una classificazione di corrosività e grave irritazione oculare *in vitro*. Ciascuno di questi due valori può poi essere usato per prevedere il potenziale di corrosività e irritazione oculare grave *in vivo* di una sostanza di prova (cfr. criteri decisionali).

▼M2

Origine ed età degli occhi dei polli

12. Storicamente, per questo tipo di saggio sono utilizzati occhi prelevati da polli abbattuti nei mattatoi per il consumo alimentare umano, ovviando in questo modo alla necessità di animali da laboratorio. Sono impiegati solamente occhi di animali sani ritenuti idonei a essere immessi nella catena alimentare umana.

13. Sebbene non sia stato condotto alcuno studio con controlli per identificare l'età ottimale del pollo, l'età e il peso degli animali storicamente impiegati per questo metodo di prova corrispondono a quelli dei pollastri tradizionalmente abbattuti nei macelli per pollame (ovvero, pollastri di circa 7 settimane e 1,5 – 2,5 kg di peso).

Prelievo e trasporto degli occhi in laboratorio

14. Si suggerisce di rimuovere le teste subito dopo aver sedato i polli, di norma con scossa elettrica, e aver praticato loro un'incisione sul collo per consentire il sanguinamento. È preferibile che l'allevamento da cui provengono i polli sia situato nelle vicinanze del laboratorio, per consentire di trasferire le loro teste dal macello in tempi sufficientemente rapidi e ridurre così al minimo il deterioramento e/o la contaminazione batterica. È consigliabile ridurre al minimo l'intervallo temporale che intercorre fra il prelievo delle teste dei polli e l'utilizzo degli occhi per il saggio ICE (di norma massimo due ore) e verificare che tale intervallo non pregiudichi i risultati del saggio. I risultati in questione si basano sui criteri di selezione degli occhi e sulle reazioni dei controlli positivi e negativi. Si suggerisce di utilizzare per il saggio occhi dello stesso gruppo di prelievo, ottenuti nella medesima giornata.

15. Gli occhi sono dissezionati in laboratorio, pertanto il trasporto delle teste intatte dal macello è a temperatura ambiente in scatole di plastica umidificate con panni inumiditi di soluzione salina isotonica.

Criteri di selezione degli occhi impiegati nel saggio ICE

16. Sono scartati gli occhi che presentano consistenti macchie di fluoresceina (> 0,5) o un punteggio di opacità corneale elevato (> 0,5) dopo l'enucleazione.

17. Ciascun gruppo di trattamento e di controllo positivo parallelo comprende almeno tre occhi. Il gruppo di controllo negativo o del veicolo (se si utilizza un veicolo diverso dalla soluzione salina) comprende almeno un occhio.

PROCEDURA

Preparazione degli occhi

18. Le palpebre sono asportate con cautela, facendo attenzione a non danneggiare la cornea. L'integrità della cornea é subito valutata con una goccia di fluoresceina sodica al 2 % (w/v) applicata alla superficie della cornea per alcuni secondi e poi risciacquata con soluzione salina isotonica. Gli occhi trattati con la fluoresceina sono poi esaminati al microscopio con lampada a fessura per assicurare che la cornea non presenti danni (ad esempio, ritenzione di fluoresceina e valori di opacità corneale ≤ 0,5).

19. Se non è danneggiato, l'occhio é ulteriormente dissezionato dal cranio facendo attenzione a non danneggiare la cornea. Il bulbo oculare é tirato via dall'orbita servendosi di pinze chirurgiche per tenere saldamente ferma la membrana nittitante e i muscoli oculari sono tagliati con forbici chirurgiche curve smusse. È importante non applicare una pressione eccessiva (ad esempio, artefatti da compressione) per evitare di danneggiare la cornea

20. Nel rimuovere l'occhio dall'orbita, dovrebbe restare attaccata una porzione visibile di nervo ottico. Rimosso dall'orbita, l'occhio é posto su un tappetino assorbente e sono recisi la membrana nittitante e il restante tessuto connettivo.

▼M2

21. L'occhio enucleato é montato in un morsetto in acciaio inossidabile con la cornea in posizione verticale. Il morsetto é poi trasferito all'interno di una camera dell'apparecchio di superfusione (16). I morsetti devono essere posizionati nell'apparecchio di superfusione in posizione tale che l'intera cornea sia irradiata dalle gocce di soluzione salita isotonica. Le camere dell'apparecchio di superfusione devono essere a temperatura controllata di 32 ± 1,5 °C. L'appendice 3 presenta un diagramma esemplificativo di apparecchio di superfusione e morsetti oculari, che sono disponibili sul mercato o possono essere costruiti. L'apparecchio può essere modificato a seconda delle esigenze dei singoli laboratori (ad esempio, per alloggiare un numero diverso di occhi).

22. Dopo l'inserimento nell'apparecchio di superfusione, gli occhi sono nuovamente esaminati con un microscopio con lampada a fessura per accertarsi che non siano stati danneggiati durante la procedura di dissezione. È opportuno misurare anche lo spessore corneale, questa volta all'apice della cornea, utilizzando lo strumento di misurazione della profondità del microscopio con lampada a fessura. È consigliabile sostituire gli occhi che presentano i) un valore di ritenzione di fluoresceina > 0,5; ii) opacità corneale > 0,5; o iii) ogni altro segno di danni. Fra gli occhi che non sono stati scartati per nessuno dei criteri suddetti, devono essere scartati gli occhi con una deviazione dello spessore corneale di oltre il 10 % dal valore medio di tutti gli occhi. È opportuno che gli utilizzatori siano consapevoli del fatto che i microscopi con lampade a fessura possono produrre misurazioni dello spessore corneale diverse a seconda delle diverse larghezze su cui è impostata la fessura. La larghezza della fessura dovrebbe essere impostata a 0,095 mm.

23. Dopo essere stati esaminati e selezionati, gli occhi sono incubati per un periodo di tempo compreso fra 45 e 60 minuti circa per l'equilibratura con il sistema prima del dosaggio. Successivamente al periodo di equilibratura é registrato il valore di riferimento per lo spessore e l'opacità della cornea, che funge da base per le altre misurazioni (ad esempio, tempo = 0). Il valore di fluoresceina determinato al momento della dissezione é usato come misurazione di base per questo risultato.

Applicazione della sostanza di prova

24. Subito dopo le misurazioni del valore di riferimento (zero) si estrae l'occhio (nel suo supporto) dall'apparecchio di superfusione, lo si dispone in posizione orizzontale e si applica alla cornea la sostanza di prova.

25. Le sostanze di prova liquide sono di norma analizzate non diluite, ma possono essere diluite se lo si ritiene necessario (ad esempio, se previsto dallo studio). Il solvente più frequentemente utilizzato per le sostanze diluite è la soluzione salina fisiologica. In determinate condizioni controllate possono tuttavia essere utilizzati anche solventi alternativi diversi dalla soluzione salina fisiologica, ma la loro idoneità deve essere comunque dimostrata.

26. Le sostanze di prova liquide sono applicate alla cornea in modo da coprire uniformemente l'intera superficie della cornea; il volume standard utilizzato è 0,03 mL.

27. Se possibile, è opportuno triturare le sostanze solide il più finemente possibile in un mortaio con un pestello o un strumento di macinatura simile. La polvere é applicata alla cornea in modo da coprirne uniformemente la superficie con la sostanza di prova; la quantità standard applicata è 0,03 g.

28. La sostanza di prova (liquida o solida) é applicata per 10 secondi e successivamente risciacquata dall'occhio con circa 20 mL di soluzione salina isotonica a temperatura ambiente. L'occhio (nel suo supporto) é in seguito posizionato nuovamente nell'apparecchio di superfusione nella posizione verticale originaria.

Sostanze di controllo

29. Ogni saggio dovrà comprendere controlli negativi o con solventi/mezzi disperdenti (veicolo) e controlli positivi paralleli.

▼M2

30. Le prove con i liquidi al 100 % o i solidi prevedono l'impiego di una soluzione salina fisiologica come controllo negativo parallelo nel saggio ICE per rilevare cambiamenti non specifici del sistema di prova e assicurare che le condizioni del saggio non causino una reazione irritante non desiderata.

31. Le prove con i liquidi diluiti comprendono un gruppo di controllo con solventi/mezzi disperdenti per rilevare cambiamenti non specifici del sistema di prova e assicurare che condizioni del saggio non causino una reazione irritante non desiderata. Come indicato al paragrafo 25, può essere utilizzato solo un solvente/mezzo disperdente per il quale si sia dimostrato che non ha ripercussioni negative sul sistema di prova.

32. Ciascuna prova comprende un controllo positivo parallelo (noto irritante per occhi) per verificare la possibilità di indurre una reazione adeguata. Poiché il presente metodo di prova utilizza il saggio ICE per l'identificazione di sostanze corrosive o gravemente irritanti, il controllo positivo ideale dovrebbe essere una sostanza di riferimento che consenta di indurre una reazione grave durante questo metodo di saggio. Tuttavia la portata dell'irritazione non dovrebbe essere eccessiva per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo. Dovrebbero essere generati dati *in vitro* sufficienti per il controllo positivo in modo da poter calcolare una serie statisticamente accettabile di dati per il controllo positivo. Se non sono disponibili dati storici idonei relativi al saggio ICE per un determinato controllo positivo, è opportuno condurre degli studi per ottenere questo tipo di informazioni.

33. L'acido acetico al 10 % o il cloruro di benzalconio al 5 % sono esempi di controlli positivi di sostanze di prova liquide, mentre esempi di controlli positivi per le sostanze di prova solide comprendono l'idrossido di sodio o l'imidazolo.

34. Le sostanze di riferimento sono utili per valutare il potenziale di irritazione oculare di sostanze chimiche sconosciute appartenenti a determinate classi di sostanze chimiche o prodotti o per la valutazione del potenziale di irritazione relativo di una sostanza irritante per occhi nell'ambito di una serie specifica di reazioni irritanti.

Risultati misurati

35. La valutazione delle cornee trattate avviene prima del trattamento e dopo 30, 75, 120, 180 e 240 minuti (con una tolleranza di ± 5 minuti) dal risciacquo successivo al trattamento. Queste scadenze temporali consentono di svolgere un numero idoneo di misurazioni nel corso del periodo complessivo di quattro ore previsto dal trattamento e lasciano al tempo stesso un periodo sufficiente fra una misurazione e l'altra per le necessarie osservazioni da effettuarsi su tutti gli occhi.

36. I risultati valutati sulla cornea comprendono fenomeni quali opacità, rigonfiamento, ritenzione di fluoresceina ed effetti morfologici (ad esempio, *pitting* o allentamento dell'epitelio). Tutti i risultati sono rilevati a ciascuna delle scadenze temporali sopra menzionate, ad eccezione della ritenzione della fluoresceina che é determinata prima del trattamento e 30 minuti dopo l'esposizione alla sostanza di prova.

37. È consigliabile servirsi di fotografie per documentare l'opacità corneale, la ritenzione della fluoresceina, gli effetti morfologici e l'istopatologia, se effettuata.

38. Dopo l'esame al termine delle quattro ore si suggerisce agli utilizzatori di conservare gli occhi in un apposito fissativo (ad esempio, formalina tamponata neutra) per un possibile esame istopatologico.

▼M2

39. Il rigonfiamento corneale si determina grazie a misurazioni dello spessore della cornea, condotte con un pachimetro ottico montato su un microscopio con lampada a fessura. Il valore relativo è espresso in percentuale e é calcolato sulla base delle misurazioni dello spessore della cornea secondo la seguente formula:

$$\left[\frac{\textit{corneal thickness at time } t - \textit{corneal thickness at time } = 0}{\textit{corneal thickness at time } = 0}\right] \times 100$$

40. La percentuale media di rigonfiamento corneale per tutti gli occhi sottoposti al saggio é calcolata a tutte le scadenze temporali di osservazione. In base al valore medio più elevato di rigonfiamento corneale, osservato a ciascuna scadenza, é poi assegnato un punteggio complessivo di categoria per ciascuna sostanza di prova.

41. L'opacità corneale é calcolata ai fini del punteggio utilizzando l'area della cornea più opacizzata. La percentuale media di opacità corneale per tutti gli occhi sottoposti al saggio é calcolata a tutte le scadenze temporali di osservazione. In base al punteggio medio più elevato di opacità corneale, osservato a ciascuna scadenza, é poi assegnato un punteggio complessivo di categoria per ciascuna sostanza di prova (tabella 1).

Tabella 1

Punteggi di opacità corneale

Punteggio	Osservazione
0	Assenza di opacità
0,5	Opacità molto lieve
1	Opacità distribuita o diffusa in varie zone; dettagli dell'iride chiaramente visibili
2	Area traslucida facilmente visibile; dettagli dell'iride leggermente oscurati
3	Grave opacità corneale; nessun dettaglio specifico dell'iride visibile; dimensioni della pupilla appena discernibili
4	Opacità corneale completa; iride invisibile

42. Il valore di ritenzione della fluoresceina medio per tutti gli occhi esaminato é calcolato solamente a 30 minuti dal trattamento e vale come punteggio di categoria assegnato a ciascuna sostanza di prova (tabella 2).

Tabella 2

Punteggi di ritenzione della fluoresceina

Punteggio	Osservazione
0	Assenza di ritenzione della fluoresceina
0,5	Lievi macchie nelle singole cellule
1	Macchie nelle singole cellule diffuse in tutta l'area trattata della cornea
2	Macchie focalizzate o addensate e confluenti delle singole cellule
3	Vaste aree confluenti della cornea con ritenzione di fluoresceina

▼M2

43. Gli effetti morfologici comprendono il «*pitting*» delle cellule epiteliali corneali, l'«allentamento» dell'epitelio, l'«irruvidimento» della superficie corneale e l'«incollamento» della sostanza di prova alla cornea. Questi risultati possono variare in termini di gravità e presentarsi contemporaneamente. La classificazione dei risultati suddetti è soggettiva e dipende dall'interpretazione del ricercatore.

DATI E RENDICONTAZIONE

Valutazione dei dati

44. I risultati delle misurazioni relative a opacità, rigonfiamento e ritenzione di fluoresceina della cornea dovrebbero essere valutati separatamente per creare una classe ICE per ciascun risultato. Le classi ICE relative a ciascun risultato sono poi associate per generare una classificazione di irritazione per ciascuna sostanza di prova.

Criteri decisionali

45. Dopo aver valutato ciascun risultato, è possibile assegnare le classi ICE sulla base di una serie predefinita. L'interpretazione dello spessore della cornea (tabella 3), dell'opacità (tabella 4) e della ritenzione della fluoresceina (tabella 5),utilizzando quattro classi ICE, avviene in base alle seguenti scale di classificazione:

Tabella 3

Criteri di classificazione ICE di spessore corneale

Rigonfiamento corneale medio (%) (*)	Classe ICE
da 0 a 5	I
> 5 a 12	II
> 12 a 18 (> 75 minuti dopo il trattamento)	II
> 12 a 18 (≤ 75 minuti dopo il trattamento)	III
> 18 a 26	III
> 26 a 32 (> 75 minuti dopo il trattamento)	III
> 26 a 32 (≤ 75 minuti dopo il trattamento)	IV
> 32	IV

(*) Punteggi di rigonfiamento corneale applicabili solo se lo spessore è misurato con microscopio con lampada a fessura Haag-Streit BP900 con dispositivo di misurazione della profondità n. I e larghezza della fessura impostata a 9½, pari a 0,095 mm. È opportuno richiamare l'attenzione degli utilizzatori sul fatto che i microscopi con lampade a fessura possono produrre misurazioni dello spessore della cornea diverse a seconda delle diverse larghezze su cui è impostata la fessura.

Tabella 4

Criteri di classificazione ICE di opacità

Punteggio medio di opacità massima (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Cfr. tabella 1.

▼**M2**

Tabella 5

Criteri di classificazione ICE di ritenzione media di fluoresceina

Punteggio medio di ritenzione della fluoresceina a 30 minuti dopo il trattamento (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Cfr. tabella 2.

46. La classificazione di irritazione *in vitro* complessiva per una sostanza di prova é valutata rilevando la classificazione di irritazione che corrisponde ai dati combinati di rigonfiamento corneale, opacità corneale e ritenzione della fluoresceina e applicando lo schema riportato nella tabella 6.

Tabella 6

Classificazioni di irritazione complessiva *in vitro*

Classificazione	Combinazione dei 3 risultati
Corrosivo/Grave irritante	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacità corneale ≥ 3 a 30 min (in almeno 2 occhi) Opacità corneale = 4 a ogni scadenza di rilevazione (in almeno 2 occhi) Grave allentamento dell'epitelio (in almeno 1 occhio)

(*) Combinazioni meno probabili.

47. Come indicato al paragrafo 1, se la sostanza di prova non è identificata come corrosiva o gravemente irritante per gli occhi è comunque consigliabile condurre altri saggi per la classificazione e l'etichettatura della sostanza stessa. Il metodo di saggio ICE ha un'accuratezza complessiva compresa fra l'83 % (120/144) e l'87 % (134/154), una percentuale di falsi positivi fra il 6 % (7/122) e l'8 % (9/116) e una percentuale di falsi negativi compresa fra il 41 % (13/32) e il 50 % (15/30), se si paragonano tali risultati con i dati del saggio *in vivo* sugli occhi del coniglio secondo i sistemi di classificazione EPA (1), UE (2) o GHS (3). Se si escludono dalla banca dati sostanze che rientrano in determinate classi chimiche (ad esempio, alcoli e tensioattivi) e fisiche (ad esempio, solidi), l'accuratezza del saggio ICE nei sistemi di classificazione UE, EPA e GHS varia fra il 91 % (75/82) e il 92 % (69/75), le percentuali di falsi positivi sono comprese fra il 5 % (4/73) e il 6 % (4/70) e le percentuali di falsi negativi sono fra il 29 % (2/7) e il 33 % (3/9) (4).

48. Anche nei casi in cui la sostanza di prova non possa essere classificata come corrosiva oculare o gravemente irritante, i dati del saggio ICE possono essere utili se associati ai dati del saggio *in vivo* sugli occhi dei conigli o di un saggio *in vitro* opportunamente convalidato per valutare ulteriormente l'utilità e i limiti del saggio ICE quale strumento per l'identificazione di sostanze irritanti non gravi o sostanze non irritanti (è in corso la preparazione di linee guida sull'uso di metodi di prova *in vitro* per la tossicità oculare).

▼M2

Criteri di accettazione dello studio

49. Un saggio si ritiene accettabile se i controlli negativi o su mezzi disperdenti/-solventi (veicolo) e i controlli positivi condotti parallelamente generano una classificazione di irritazione che rientra rispettivamente nelle classi delle sostanze non irritanti e gravemente irritanti/corrosive.

Rapporto di prova

50. Il rapporto di prova dovrebbe includere le seguenti informazioni, se pertinenti alla conduzione dello studio:

Sostanze di prova e di controllo

Denominazioni chimiche, quali le denominazioni strutturali CAS (*Chemical Abstracts Service*) seguite da altri nomi, se conosciuti;

numero di registro CAS (RN), se conosciuto;

purezza e composizione della sostanza o della miscela (in percentuale ponderale), nella misura in cui l'informazione è disponibile;

proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali la natura fisica, la volatilità, il pH, la stabilità, la classe chimica e la solubilità in acqua;

trattamento delle sostanze di prova/di controllo prima del saggio, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

stabilità, se conosciuta;

Informazioni relative allo sponsor e ai centri di prova

Nome e indirizzo dello sponsor, del centro di prova e del responsabile dello studio;

identificazione dell'origine degli occhi (ovvero, la struttura presso la quale sono stati prelevati);

condizioni di conservazione e trasporto degli occhi (ad esempio, data e ora del prelievo degli occhi, intervallo di tempo antecedente al saggio);

se disponibili, informazioni relative a caratteristiche specifiche degli animali dai quali sono stati prelevati gli occhi (ad esempio, età, sesso, peso dell'animale donatore).

Giustificazione del metodo di prova e del protocollo utilizzato

Integrità del metodo di prova

La procedura utilizzata per assicurare l'integrità (ovvero, l'accuratezza e l'affidabilità) del metodo di prova nel tempo (ad esempio, saggi periodici delle sostanze per la verifica delle prestazioni, utilizzo di dati storici sui controlli negativi e positivi).

Criteri di accettabilità del saggio

Se applicabili, serie di controlli di riferimento paralleli, basati su dati storici.

Condizioni di prova

Descrizione del sistema di prova utilizzato;

microscopio con lampada a fessura usato (indicare, ad esempio, il modello);

impostazioni relative al microscopio con lampada a fessura utilizzata;

informazioni relative agli occhi di pollo utilizzati, comprese dichiarazioni relative alla loro qualità;

▼M2

dettagli delle procedure di prova adottate;

concentrazione/i della sostanza di prova utilizzati;

descrizione di ogni eventuale modifica alla procedura di prova;

riferimento ai dati storici del modello (ad esempio, controlli negativi e positivi, sostanze per la verifica del rendimento, sostanze di riferimento);

descrizione dei criteri di valutazione impiegati.

Risultati

Descrizione di eventuali altri effetti osservati;

se del caso, fotografie dell'occhio.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Regolamento n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e reca modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006. GU L 353, 31.12.2008, pag. 1.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Online:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Online:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) CE (2006). Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE della Commissione. GU L 396, 30.12.2006, pag. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Online:

[http://www.oecd.org/document/40/-0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Online:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/-prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Online:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Online:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: prossimità fra i risultati del metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura il rendimento del metodo di prova e rappresenta un aspetto della «rilevanza.». Il termine è spesso sostituibile con «concordanza», a indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova.

Affidabilità: misura la possibilità di eseguire un metodo di prova in maniera riproducibile all'interno dei laboratori e fra di essi nel tempo seguendo lo stesso protocollo. É valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori.

Categoria EPA 1: sostanza corrosiva (distruzione irreversibile del tessuto oculare) o interessamento o irritazione della cornea persistenti per oltre 21 giorni (1).

Categoria GHS 1: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza di prova sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione (3).

Categoria UE R41: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza di prova sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione (2).

Controllo negativo: un duplicato non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Il campione é saggiato con campioni trattati con la sostanza e altri campioni di controllo per determinare se il veicolo interagisce con il sistema di prova.

Controllo positivo: un duplicato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che é trattato con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Il grado dell'irritazione non dovrebbe essere eccessivo per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

Controllo solvente/mezzo disperdente: campione non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova, compreso il solvente e il mezzo disperdente (veicolo) usato con la sostanza di prova saggiato con gli altri campioni di controllo al fine di stabilire la reazione di base nei campioni trattati con la sostanza di prova disciolta nello stesso solvente o mezzo disperdente. Nelle prove con controlli negativi paralleli, questo campione dimostra anche se il veicolo è in grado di interagire con il sistema di prova.

Cornea: parte trasparente frontale del bulbo oculare che copre l'iride e la pupilla e consente il passaggio della luce verso l'interno.

Corrosivo oculare: a) sostanza che causa danni irreversibili ai tessuti oculari; b) sostanza classificata come irritante oculare di categoria GHS 1, EPA I o UE R41 (1) (2) (3).

Forza probante: il processo che consiste nel tener conto dei punti di forza e di debolezza di informazioni diverse per conseguire e supportare una data conclusione relativa al potenziale di pericolo di una sostanza.

GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*): un sistema che propone la classificazione delle sostanze e miscele chimiche in base a tipi e livelli standardizzati di rischi fisici, per la salute e ambientali, e applica elementi di comunicazione corrispondenti, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede tecniche di sicurezza, al fine di trasmettere informazioni sui loro effetti nocivi e garantire la protezione di persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e operatori dei servizi di soccorso) e ambiente (3).

▼M2

Grave irritante oculare: a) sostanza che causa danni ai tessuti oculari in seguito all'applicazione sulla superficie anteriore dell'occhio non risolvibili entro 21 giorni dall'applicazione o indebolimento grave della vista; b) sostanze classificate come irritanti oculari di categoria GHS 1, EPA I o UE R41 (1) (2) (3).

Irritante oculare: a) sostanza che produce cambiamenti reversibili negli occhi in seguito all'applicazione sulla superficie anteriore dell'occhio; b) sostanza classificata come irritante oculare di categoria EPA II o III, UE R36 o GHS 2A o2B (1) (2) (3).

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di convalida per determinare la rilevanza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato.

Microscopio con lampada a fessura: strumento utilizzato per esaminare direttamente l'occhio sotto l'ingrandimento di un microscopio binoculare e creando un'immagine stereoscopica e diritta. Nel metodo di prova ICE, questo strumento é usato per visualizzare le strutture anteriori dell'occhio del pollo e per misurare in modo oggettivo lo spessore corneale con uno strumento accessorio di misurazione in profondità.

Non-irritante: sostanza non classificata come irritante oculare di categoria EPA I, II o III; UE R41 o R36; o GHS 1, 2º o 2B (1) (2) (3).

Opacità corneale: misurazione del grado di opacità della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza di prova. Un aumento dell'opacità corneale è indice di danni alla cornea.

Percentuale di falsi negativi: percentuale di tutte le sostanze positive erroneamente identificate come negative da un metodo di prova. È un indicatore della prestazione del metodo di prova.

Percentuale di falsi positivi: percentuale di tutte le sostanze negative erroneamente identificate come positive da un metodo di prova. È un indicatore della prestazione del metodo di prova.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione di causare potenzialmente effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

Prove in sequenza: strategia di prove graduali in cui vengono riesaminate tutte le informazioni disponibili su una sostanza di prova, secondo un ordine ben specificato, seguendo un approccio basato sulla forza probante dei dati disponibili per ciascuna prova al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per una decisione sulla classificazione del pericolo prima di procedere alla fase successiva. Se è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza di prova in base alle informazioni disponibili, non è necessario svolgere prove aggiuntive. Se non è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza di prova in base alle informazioni disponibili, é svolta una procedura di prova graduale su animali in sequenza fino a che non sarà possibile effettuare una classificazione inequivocabile.

▼M2

Rigonfiamento corneale: misurazione obiettiva del saggio ICE dell'ingrossamento della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza di prova. È espresso in percentuale e si ottiene dalle misurazioni dello spessore corneale di partenza (prima del dosaggio) e dallo spessore registrato a intervalli regolari dopo l'esposizione al materiale di prova nel saggio ICE. Il grado di rigonfiamento corneale è indice di danni alla cornea.

Ritenzione di fluoresceina: misurazione soggettiva nell'ambito del saggio ICE del grado di fluoresceina trattenuto dalle cellule epiteliali della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza di prova. Il grado di ritenzione di fluoresceina è indice di danni all'epitelio della cornea.

Sostanza di riferimento: sostanza usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti, e v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

▼M2

Appendice 2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA PRESTAZIONE NEL METODO DI PROVA ICE

Prima di utilizzare regolarmente un metodo di prova che soddisfi i requisiti delle presenti linee guida, i laboratori possono decidere di dimostrare le prestazioni tecniche identificando correttamente la classificazione di corrosività oculare delle 10 sostanze raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze sono state selezionate quali rappresentative di una serie di reazioni di irritazione/corrosione topica dell'occhio, basata sui risultati del saggio sugli occhi del coniglio *in vivo* (TG 405) (ovvero, categorie 1, 2A, 2B, o Non classificato o etichettato in base alla classificazione UN GHS (3) (7). Tuttavia, in considerazione dell'utilità comprovata di tali saggi (che consiste nell'identificare esclusivamente corrosivi/gravi irritanti oculari) esistono solo due risultati di prova ai fini di una classificazione (corrosivo/gravemente irritante o non corrosivo/non gravemente irritante) per dimostrare la prestazione. Gli altri criteri di selezione comprendevano la disponibilità delle sostanze sul mercato, la presenza di dati di qualità che fungono da riferimento per gli studi in vivo, nonché di dati di qualità di riferimento concernenti i due metodi *in vitro* per i quali le linee guida dei saggi sono attualmente in fase di elaborazione. Per questa ragione, sono state selezionate sostanze irritanti dall'elenco raccomandato ICCVAM di 122 sostanze di riferimento per la convalida del saggio *in vitro* di tossicità oculare (cfr. appendice H: sostanze di riferimento raccomandate *ICCVAM*) (4). I dati di riferimento relativi sono disponibili nella documentazione ICCVAM relativa ai saggi di opacità e permeabilità della cornea nei bovini (Bovine Corneal Opacity and Permeability - BCOP) e ICE (*ICCVAM Background Review Documents for BCOP and Isolated Chicken Eye (ICE) test method*) (18) (19).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica del rendimento tecnico con il metodo ICE

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica [1]	Forma fisica	Classificazione [2] *in Vivo*	Classificazione [3] *in Vitro*
Cloruro di benzalconio (5 %)	8001-54-5	Composto ionico	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Clorexidina	55-56-1	Ammina, ammidina	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Acido dibenzoil-L-tartarico	2743-38-6	Acido carbossilico, estere	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Imidazolo	288-32-4	Composto eterociclico	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Acido tricloroacetico (30 %)	76-03-9	Acido carbossilico	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
2,6-Diclorobenzoilcloruro	4659-45-4	Acil-alogenuro	Liquido	Categoria 2A	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Etil 2-metilacetoacetato	609-14-3	Chetone, estere	Liquido	Categoria 2B	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Nitrato di ammonio	6484-52-2	Sale inorganico	Solido	Categoria 2A	Non corrosivo/Non gravemente irritante

▼**M2**

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica (1)	Forma fisica	Classificazione (2) *in Vivo*	Classificazione (3) *in Vitro*
Glicerolo	56-81-5	alcol	Liquido	Non etichettato	Non corrosivo/Non gravemente irritante
n-esano	110-54-3	Idrocarburo (aciclico)	Liquido	Non etichettato	Non corrosivo/Non gravemente irritante

Abbreviazioni: CASRN = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*).

(1) Ciascuna sostanza di prova è stata assegnata a classi chimiche definite in base a un sistema di classificazione standard, basato sul sistema di classificazione della *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibile online al sito http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Basata sui risultati del test sugli occhi dei conigli *in vivo* (OECD TG 405) e sul sistema di classificazione UN GHS (3)(7).

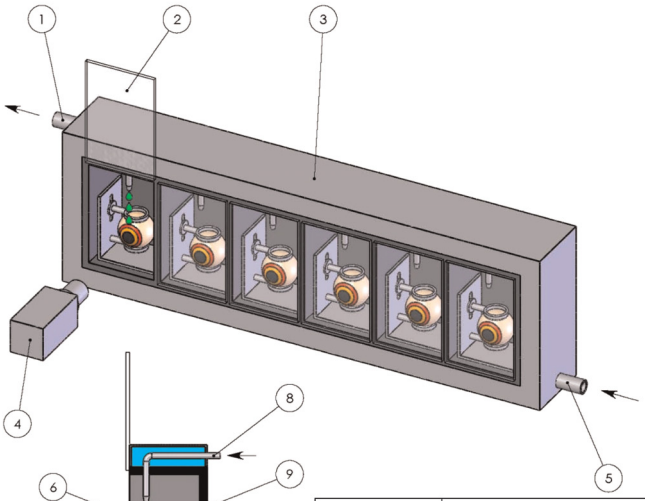
(3) Basata sui risultati dei saggi BCOP e ICE.

▼**M2**

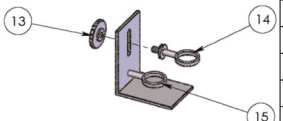
Appendice 3

Diagrammi relativi all'apparecchio di superfusione e ai morsetti oculari

(cfr Burton et al. (17) per ulteriori descrizioni generiche dell'apparecchio di superfusione e del morsetto oculare)



COMPARTO IN SEZIONE TRASVERSALE



SUPPORTO OCULARE

N. ELEMENTO	DESCRIZIONE
1	USCITA ACQUA CALDA
2	SPORTELLO SCORREVOLE
3	APPARECCHIO DI SUPERFUSIONE
4	DISPOSITIVO DI MISURAZIONE OTTICA
5	INGRESSO ACQUA CALDA
6	SOLUZIONE SALINA
7	ACQUA CALDA
8	INGRESSO SOLUZIONE SALINA
9	COMPARTO
10	SUPPORTO CORNEALE
11	OCCHIO DI POLLO
12	USCITA SOLUZIONE SALINA
13	VITE DI FISSAGGIO
14	BRACCIO SUPERIORE REGOLABILE
15	BRACCIO INFERIORE FISSO

▼M3

B.49. TEST DEL MICRONUCLEO IN VITRO CON CELLULE DI MAMMIFERO

INTRODUZIONE

1. Il test del micronucleo in vitro (MNvit) è un test di genotossicità effettuato per rilevare la presenza di micronuclei (MN) nel citoplasma delle cellule durante l'interfase. I micronuclei possono formarsi a partire da frammenti cromosomici acentrici (ossia privi di centromero) o da cromosomi interi che non sono in grado di migrare ai poli durante l'anafase (una fase della divisione cellulare). Il saggio rileva l'attività delle sostanze con proprietà clastogeniche e aneugeniche (sostanze e miscele) (1) (2) nelle cellule che hanno iniziato la divisione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale. Il presente metodo di prova (TM) permette il ricorso a protocolli sperimentali con e senza citocalasina B (citoB), un inibitore della polimerizzazione dell'actina. L'aggiunta di citoB prima della mitosi oggetto dello studio consente l'individuazione e l'analisi selettiva della frequenza dei micronuclei nelle cellule che hanno completato una mitosi, perché tali cellule sono binucleate (3) (4). Il presente metodo di prova permette altresì di ricorrere a protocolli senza blocco della citocinesi, purché si possa dimostrare che la popolazione cellulare analizzata si sia già avviata alla mitosi.

2. Oltre al saggio MNvit per individuare le sostanze (sostanze e miscele) che inducono la formazione di micronuclei, anche il ricorso a un blocco della citocinesi, alla marcatura immunochimica dei cinetocori o all'ibridazione con sonde centromero- o telomero-specifiche [ibridazione fluorescente in situ (FISH)] può fornire informazioni sui meccanismi di danno cromosomico e formazione di micronuclei (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Le procedure di marcatura e ibridazione possono essere impiegate quando si osserva un incremento della formazione di micronuclei e lo sperimentatore desidera stabilire se tale aumento è la conseguenza di eventi clastogenici e/o aneugenici.

3. I micronuclei rappresentano danni che sono trasmessi alle cellule figlie, mentre le aberrazioni cromosomiche verificatesi nelle cellule in metafase potrebbero non essere trasmesse. Poiché nelle cellule in interfase è possibile valutare i micronuclei in maniera relativamente obiettiva, il personale del laboratorio deve soltanto stabilire se le cellule hanno avviato o meno la divisione cellulare e quante di esse contengono un micronucleo. Di conseguenza, i preparati possono essere valutati con relativa rapidità e l'analisi può essere automatizzata, il che permetterebbe di valutare migliaia anziché centinaia di cellule per trattamento, e quindi di accrescere la potenza del saggio. Infine, poiché i micronuclei possono formarsi anche da cromosomi ritardatari, c'è la possibilità di individuare agenti che inducono aneuploidia, che solitamente è difficile esaminare tramite i tradizionali test sulle aberrazioni cromosomiche (cfr. la linea guida OCSE Test Guideline 473, capitolo B.10 del presente allegato) (17). Tuttavia, il saggio MNvit non permette di distinguere le sostanze che inducono polipoidia da quelle che causano clastogenicità senza il ricorso a tecniche speciali come la FISH, descritta al punto 2.

4. Il saggio MNvit è un metodo in vitro che in genere utilizza cellule umane o animali (di roditori). Il saggio offre una base completa per studiare il potenziale di danno cromosomico in vitro, poiché permette di rilevare agenti sia aneugeni sia clastogeni.

5. Il saggio MNvit è robusto ed efficace per vari tipi cellulari, con o senza ricorso a citoB. Sono numerosi i dati a sostegno della validità del saggio MNvit con diverse linee cellulari di roditori (CHO, V79, CHL/IU e L5178Y) e di linfociti umani (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Tra questi si annoverano, in particolare, gli studi internazionali di convalida coordinati dalla Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) e le relazioni dell'International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Le informazioni disponibili sono anche state riesaminate nell'ambito di uno studio di convalida

▼M3

retrospettivo basato sul peso dell'evidenza condotto dal Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM) della Commissione europea, mentre la validità scientifica del metodo di prova è stata riconosciuta dal comitato scientifico consultivo dell'ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). È stato descritto l'uso di cellule umane della linea linfoblastoide TK6 (35), di cellule HepG2 (36) (37) e di cellule embrionali primarie di criceto siriano (38), sebbene tali cellule non siano state utilizzate in studi di convalida.

DEFINIZIONI

6. Le definizioni usate figurano nell'allegato 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. I saggi in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che le cellule non siano metabolicamente competenti per quanto riguarda le sostanze in esame. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni in vivo. Si deve prestare inoltre attenzione al fine di evitare condizioni che porterebbero a risultati positivi artefatti, che non riflettono una mutagenicità intrinseca, e che possono avere origine da cambiamenti marcati di pH o di osmolalità, o da elevati livelli di citotossicità (39) (40) (41). Se, aggiungendo la sostanza sperimentale, si verifica un cambiamento di pH del mezzo, il pH deve essere aggiustato, preferibilmente tamponando la soluzione pronta per l'uso affinché tutti i volumi rimangano gli stessi per tutte le concentrazioni testate e per tutti i controlli.

8. Per esaminare l'induzione di micronuclei è fondamentale che sia avvenuta la mitosi sia nelle colture trattate che in quelle non trattate. Lo stadio più informativo per il conteggio dei micronuclei è quello che si riscontra nelle cellule che hanno completato una mitosi durante o dopo il trattamento con la sostanza sperimentale.

PRINCIPIO DEL METODO

9. Le colture di cellule umane o di mammifero sono esposte alla sostanza sperimentale con e senza una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che non si utilizzino cellule con un'adeguata capacità metabolizzante. Ogni test dovrà comprendere controlli con solventi/veicoli e controlli positivi trattati in parallelo.

10. Durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale, le cellule sono coltivate per un periodo sufficiente a consentire che il danno cromosomico o del fuso porti alla formazione di micronuclei nelle cellule in interfase. Per l'induzione di aneuploidia, la sostanza sperimentale dovrebbe solitamente essere presente durante la mitosi. Le cellule in interfase coltivate e colorate sono analizzate per rilevare la presenza di micronuclei. Idealmente, si dovrebbero contare micronuclei soltanto nelle cellule che hanno completato la mitosi durante l'esposizione alla sostanza sperimentale o nell'eventuale periodo successivo all'esposizione. Nelle colture trattate con un inibitore della citocinesi questo risultato si ottiene prendendo in considerazione soltanto le cellule binucleate. In assenza di un inibitore della citocinesi è importante dimostrare che le cellule analizzate hanno avviato la divisione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale. Per tutti i protocolli è essenziale dimostrare che la proliferazione cellulare è avvenuta sia nelle colture trattate che nei controlli; inoltre, nelle colture in cui si è riscontrata la presenza di micronuclei (o in colture parallele) dev'essere valutata l'entità della citotossicità o della citostasi indotta dalla sostanza sperimentale.

▼**M3**

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

11. Possono essere usati linfociti del sangue periferico umano primario coltivato (5) (19) (42) (43) e una serie di linee cellulari di roditori quali CHO, V79, CHL/IU e L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). L'uso di altre linee cellulari e di altri tipi di cellule deve essere giustificato in base alla loro dimostrata prestazione nel saggio, così come descritta nella sezione sui criteri di accettabilità. Poiché la frequenza generale dei micronuclei influenzerà la sensibilità del saggio, si raccomanda di utilizzare tipi cellulari con una frequenza bassa e stabile di formazione di micronuclei.

12. I linfociti del sangue periferico umano devono essere prelevati da individui giovani (circa 18-35 anni di età), sani, non fumatori, che non siano stati esposti di recente a sostanze chimiche genotossiche o a radiazioni. Se si raccolgono cellule da più donatori, il numero dei donatori dev'essere indicato. La frequenza dei micronuclei aumenta con l'età e questa tendenza è più marcata nelle donne rispetto agli uomini (44); occorre tener conto di tali elementi nella selezione delle cellule dei donatori.

Terreni e condizioni di coltura

13. Per mantenere le colture devono essere garantiti terreni e condizioni di incubazione adeguati (recipienti per coltura, concentrazione di CO_2, temperatura e umidità). Si controlli periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari stabilizzate e nei ceppi; non si usino ceppi contaminati o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. Dovrebbero essere note la durata normale del ciclo cellulare e le condizioni di coltura utilizzate nel laboratorio di prova. Se si ricorre al metodo dell'inibizione della citocinesi, la concentrazione dell'agente inibitore dev'essere ottimizzata per lo specifico tipo cellulare e deve essere dimostrata la sua capacità di produrre un buon numero di cellule binucleate per l'analisi.

Preparazione delle colture

14. Linee cellulari stabilizzate e ceppi: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da impedire che le colture raggiungano la confluenza in monostrati, e che le colture in sospensione non raggiungano una densità eccessiva prima della raccolta, e incubate a 37 °C.

15. Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (ad esempio, eparina) o linfociti isolati sono posti in un terreno di coltura contenente un mitogeno (ad esempio, fitoemoagglutinina, PHA) prima dell'esposizione alla sostanza sperimentale e a citoB.

Attivazione metabolica

16. Se si utilizzano cellule prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattori (S9) ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici, come Aroclor 1254 (45) (46) o una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (46) (47) (48) (49). Quest'ultima combinazione è conforme alla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (50) e al regolamento (CE) n. 850/2004 relativo agli inquinanti organici persistenti (66), e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (46) (47) (48) (49). La frazione S9 viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1 e 10 % (v/v) nel terreno di coltura. Le condizioni del sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare varie concentrazioni della frazione post-mitocondriale.

▼M3

17. Linee cellulari modificate mediante ingegneria genetica che esprimono enzimi attivatori specifici nell'uomo o nel roditore possono eliminare la necessità di ricorrere a un sistema di attivazione metabolica esogeno e possono essere usate nel saggio. In questi casi la scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (ad esempio, in base all'importanza delle ossidasi a funzione mista nel metabolismo della sostanza in esame (51) e della loro capacità di reagire ai clastogeni e agli aneugeni noti (cfr. la sezione sui criteri di accettabilità). Si deve riconoscere che la sostanza sperimentale non può essere metabolizzata dall'ossidasi o dalle ossidasi a funzione mista espresse; in tal caso, i risultati negativi non indicherebbero che la sostanza sperimentale non causa la formazione di micronuclei.

Sostanza in esame/Preparazione

18. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione in adeguati solventi o veicoli e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/o diluite prima del trattamento. Le sostanze gassose o volatili devono essere testate modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in contenitori sigillati) (52) (53). Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Condizioni di esperimento

Solventi/veicoli

19. Il solvente/veicolo non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9 alla concentrazione usata. L'uso di solventi/veicoli poco noti (ad esempio, acqua, terreno di coltura cellulare, dimetilsolfossido) è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con la sostanza sperimentale e l'assenza di tossicità genetica. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/veicolo acquoso.

Uso di citoB come inibitore della citocinesi

20. Una delle considerazioni più importanti riguardo alla prestazione del saggio MNvit è garantire che le cellule contate abbiano completato la micosi durante il trattamento o nell'eventuale periodo di incubazione successiva al trattamento. La citocalasina B è l'agente più diffusamente usato per bloccare la citocinesi, poiché inibisce l'aggregazione dell'actina e, di conseguenza, impedisce la separazione delle cellule figlie dopo la mitosi, portando alla formazione di cellule binucleate (5) (54) (55). Il conteggio dei micronuclei, pertanto, può essere limitato alle cellule che si sono avviate alla mitosi durante o dopo il trattamento. L'effetto della sostanza sperimentale sulla proliferazione cellulare può essere misurato simultaneamente. La citocalasina B deve essere usata come inibitore della citocinesi quando si impiegano linfociti umani, perché la durata del ciclo cellulare può variare tra le colture e tra donatori e perché non tutti i linfociti rispondono alla PHA. Nei test su linee cellulari sono stati utilizzati altri metodi per stabilire se le cellule sottoposte a conteggio si sono divise; tali metodi sono descritti di seguito (cfr. il punto 26).

21. Per ciascun tipo cellulare il laboratorio deve determinare la concentrazione adeguata di citocalasina B per ottenere la frequenza ottimale di cellule binucleate nelle colture di controllo con solvente/veicolo. La concentrazione adeguata di citocalasina B è solitamente compresa tra 3 e 6 μg/ml.

▼M3

Misurazione della proliferazione cellulare e della citotossicità e scelta delle concentrazioni di esposizione

22. Nel determinare la concentrazione massima di sostanza da testare si devono evitare concentrazioni che hanno la capacità di produrre risposte positive artefatte tra cui le concentrazioni che causano eccessiva citotossicità, precipitazione nel terreno di coltura e variazioni marcate di pH o osmolalità (39) (40) (41).

23. La proliferazione cellulare deve essere misurata per garantire che le cellule trattate si sono avviate alla mitosi durante il saggio e che i trattamenti sono condotti ad adeguati livelli di citotossicità (cfr. il punto 29). La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nelle cellule che richiedono attivazione metabolica sulla base dell'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) o del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) (cfr. l'appendice 2 per le formule), a meno che non si ricorra alla citocalasina B. In tal caso, la citotossicità può essere determinata sulla base dell'indice di replicazione (RI) (cfr. l'appendice 2 per la formula).

24. Il trattamento di colture con citoB e la misurazione delle frequenze relative di cellule mononucleate, binucleate e multinucleate nella coltura rappresentano un metodo accurato per la quantificazione dell'effetto sulla proliferazione cellulare e dell'attività citotossica o citostatica di un trattamento (5), e garantiscono che siano conteggiate soltanto le cellule che hanno iniziato la divisione durante o dopo il trattamento.

25. Negli studi con citoB, la citostasi/citotossicità può essere quantificata sulla scorta dell'indice che misura la cinetica della proliferazione cellulare (CBPI) (5) (26) (56) o può essere ottenuto dall'indice di replicazione di almeno 500 cellule per coltura (cfr. l'appendice 2 per le formule). Se per valutare la proliferazione è usata la citocalasina B, si deve determinare un CBPI o un indice di replicazione a partire da almeno 500 cellule per coltura. Queste misurazioni, tra le altre, possono essere utilizzate per stimare la citotossicità confrontando valori nelle colture trattate e nei controlli. La valutazione di altri marcatori di citotossicità (ad esempio, confluenza, numero di cellule, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase) può fornire informazioni utili.

26. Negli studi condotti senza citoB occorre dimostrare che le cellule contate nella coltura hanno avviato il processo di divisione durante o in seguito al trattamento con la sostanza sperimentale, per evitare che si producano falsi negativi. Tra i metodi usati per assicurare che siano contate le cellule in fase di divisione vi sono l'incorporazione e il successivo rilevamento di bromodeossiuridina (BrdU) per individuare le cellule che si sono replicate (57), la formazione di cloni quando cellule da linee cellulari permanenti sono trattate e contate in situ su un vetrino per microscopio (indice di proliferazione, PI) (25) (26) (27) (28) o la misurazione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo della conta cellulare (RICC) o altri metodi dimostrati (16) (56) (58) (59) (cfr. l'appendice 2 per le formule). La valutazione di altri marcatori di citotossicità o citostasi (ad esempio, confluenza, numero di cellule, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase) può fornire informazioni utili.

27. Si usino almeno tre concentrazioni analizzabili. A tal fine può essere necessario eseguire l'esperimento utilizzando un maggior numero di concentrazioni strettamente intervallate e analizzando la formazione di micronuclei nelle concentrazioni che forniscono un intervallo di citotossicità adeguato. Una strategia alternativa consiste nell'eseguire un test di citotossicità preliminare per ridurre l'intervallo di tossicità del test definitivo.

28. La concentrazione più elevata deve puntare a produrre una tossicità pari a 55 ± 5 %. Livelli più elevati possono indurre danni cromosomici come effetto secondario di citotossicità (60). In caso di sostanze citotossiche, le concentrazioni selezionate per il saggio devono andare dalla citotossicità 55 ± 5 % ad una tossicità assente o modica.

▼M3

29. Se non si osserva citotossicità o non si rileva la presenza di un precipitato, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 0,01 M, 5 mg/mL o 5 µl/mL (si scelga il valore più basso). Le concentrazioni scelte per l'analisi cioè devono essere di norma separate al massimo da un fattore compreso tra 0 e più di 10. Per sostanze che esibiscono una curva concentrazione-risposta a forte inclinazione potrebbe essere necessario intervallare più frequentemente le concentrazioni della sostanza, affinché si possano contare anche le colture che ricadono nell'intervallo di tossicità moderata o bassa.

30. Per sostanze difficilmente solubili, la dose massima, se non limitata dalla citotossicità, dovrebbe essere la concentrazione più bassa in cui sia visibile la precipitazione minima nelle colture, purché questa non interferisca con la valutazione. La valutazione della precipitazione dev'essere fatta sulla base di tecniche quali la microscopia ottica, rilevando il precipitato che persiste o appare durante la coltura (al termine del trattamento).

Controlli

31. Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e con solvente o veicolo trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica.

32. I controlli positivi sono necessari per dimostrare la capacità delle cellule usate, e del protocollo sperimentale, di individuare clastogeni e aneugeni, e di affermare la capacità metabolica del preparato S9. Come controlli positivi si utilizzino induttori noti della formazione di micronuclei, a livelli ai quali ci si attende un aumento modesto ma riproducibile rispetto ai valori normali, che dimostri la sensibilità del test. La concentrazione del controllo positivo deve essere tale che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati.

33. Per dimostrare sia la competenza metabolica sia la capacità del test di rilevare i clastogeni dev'essere usato un clastogeno che esige attivazione metabolica (ad esempio, ciclofosfamide; benzo[a]pirene). Si possono usare altre sostanze per i controlli positivi, se giustificate. Poiché in alcune condizioni sperimentali o in determinate linee cellulari taluni controlli positivi che richiedono l'attivazione metabolica possono essere attivi senza attivazione metabolica esogena, la necessità dell'attivazione metabolica, e dell'attività del preparato S9, dev'essere testata nella linea cellulare selezionata e alle concentrazioni selezionate.

34. Attualmente, non sono noti aneugeni che richiedono l'attivazione metabolica per la loro attività genotossica (16). I controlli positivi attualmente accettati per l'attività aneugenica sono, per esempio, colchicina e vinblastina. Possono essere usate altre sostanze chimiche, se inducono la formazione di micronuclei esclusivamente o prevalentemente mediante attività aneugenica. Per evitare la necessità di due controlli positivi (per clastogenicità e aneugenicità) senza attivazione metabolica, il controllo per l'aneugenicità può essere utilizzato come controllo positivo senza S9, e il controllo per la clastogenicità può essere impiegato per valutare l'adeguatezza del sistema di attivazione metabolica usato. Nelle cellule che non necessitano di S9 possono essere usati controlli positivi sia per la clastogenicità che per l'aneugenicità. I controlli positivi raccomandati figurano nell'appendice 3.

35. Si può prendere in considerazione l'uso di sostanze di una classe chimica correlata, se sono disponibili sostanze adeguate. Tutti i controlli positivi utilizzati devono essere adeguati per il tipo cellulare e per le condizioni di attivazione.

▼M3

36. Per ogni fase di raccolta si effettuino anche controlli con solvente o veicolo. Si proceda inoltre a controlli negativi non trattati (senza solvente/veicolo), salvo che dati precedenti pubblicati o di laboratorio provino che il solvente scelto non induce effetti genotossici o altri effetti nocivi alle concentrazioni utilizzate.

PROCEDURA

Calendario del trattamento

37. Per massimizzare la probabilità di individuare un aneugeno o un clastogeno in azione in un determinato stadio del ciclo cellulare è importante che quantitativi sufficienti di cellule siano trattati con la sostanza sperimentale in tutte le fasi dei cicli cellulari. Il calendario di trattamento per le linee cellulari e per le colture cellulari primarie, pertanto, può differire in parte da quello previsto per i linfociti, che per avviare il ciclo cellulare necessitano di una stimolazione mitogenica (cfr. i punti 41-43) (16).

38. Considerazioni teoriche, unitamente ai dati pubblicati, (18) indicano che la maggior parte degli aneugeni e dei clastogeni sarà rilevata entro un periodo di trattamento breve di 3 fino a 6 ore, con o senza S9, cui seguirà la rimozione della sostanza sperimentale e un periodo di crescita di 1,5–2,0 cicli cellulari (6). Le cellule sono campionate in un lasso di tempo pari a circa 1,5–2,0 volte la durata normale (ossia senza trattamento) del ciclo cellulare, dopo l'inizio o alla fine del trattamento stesso (cfr. la tabella 1). I tempi di campionamento o di recupero possono essere estesi se è noto o si sospetta che la sostanza sperimentale incide sulla durata del ciclo cellulare (ad esempio, se si sperimentano analoghi nucleosidici).

39. In considerazione della potenziale tossicità dei preparati S9 per le cellule di mammifero coltivate, l'esposizione al trattamento è estesa di 1,5–2,0 cicli cellulari normali soltanto in assenza di S9. In caso di estensione il trattamento con la sostanza sperimentale può essere effettuato con o senza citoB. Queste alternative permettono di gestire situazioni in cui vi siano timori per le potenziali interazioni tra la sostanza sperimentale e citoB.

40. I calendari di trattamento suggeriti figurano nella tabella 1. Si tratta di calendari generici che possono essere modificati in base alla stabilità o alla reattività della sostanza sperimentale ovvero alle particolari caratteristiche di crescita delle cellule utilizzate. Tutti i trattamenti devono iniziare e terminare nel momento di crescita esponenziale delle cellule. I calendari sono illustrati in maniera più dettagliata ai punti 41-47.

Tabella 1

Trattamento delle cellule e fasi di raccolta per il saggio MNvit

Linfociti, cellule primarie e linee cellulari trattate con citoB	+ S9	Trattare per 3-6 ore con S9; rimuovere S9 e terreno di coltura; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta a distanza di 1,5–2,0 cicli cellulari normali.
	– S9 Breve esposizione	Trattare per 3-6 ore; rimuovere il terreno di coltura; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta a distanza di 1,5–2,0 cicli cellulari normali.

▼M3

	– S9 Esposizione Prolungata	*Opzione A:* trattare per 1,5–2 cicli cellulari normali con citoB; procedere alla raccolta al termine del periodo di esposizione. *Opzione B:* trattare per 1,5–2,0 cicli cellulari normali; asportare la sostanza sperimentale; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta dopo 1,5–2,0 cicli cellulari normali.
Linee cellulari trattate senza citoB (medesimo calendario di trattamento descritto sopra, a eccezione dell'aggiunta di citoB)		

Linfociti, cellule primarie e linee cellulari con citoB

41. Per i linfociti, l'approccio più efficiente è iniziare l'esposizione alla sostanza sperimentale a distanza di 44-48 ore dopo la stimolazione con PHA, quando la sincronizzazione del ciclo sarà scomparsa (5). Nel saggio iniziale, le cellule sono trattate per 3 fino a 6 ore con la sostanza sperimentale, con o senza S9. Il terreno di coltura viene rimosso e sostituito con nuovo terreno contenente citoB; si procede alla raccolta quando è trascorso un periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.

42. Se entrambi i test iniziali del trattamento breve (3-6 ore) sono negativi o ambigui, si ricorre a un'ulteriore esposizione successiva con S9. In tal caso sono possibili due opzioni, entrambe accettabili. Tuttavia, potrebbe essere più appropriato seguire l'opzione A per i linfociti stimolati se la crescita esponenziale risulta in calo a distanza di 96 ore dalla stimolazione. Inoltre, nell'opzione B le colture cellulari non devono aver raggiunto la confluenza prima dell'ultimo campionamento.

— Opzione A: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali; si procede alla raccolta al termine del periodo di trattamento.

— Opzione B: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un ulteriore periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.

43. Le cellule primarie e le linee cellulari devono essere trattate in maniera analoga ai linfociti, salvo che non è necessario ricorrere alla stimolazione con PHA per 44-48 ore. Le cellule diverse dai linfociti devono essere esposte in maniera tale che, al momento della conclusione dello studio, le cellule si trovino ancora in una fase di crescita esponenziale.

Linee cellulari senza citoB

44. Le cellule sono trattate per 3-6 ore, in presenza o in assenza di S9. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.

▼M3

45. Se entrambi i test iniziali del trattamento breve (3-6 ore) sono negativi o ambigui, si ricorre a un'ulteriore esposizione successiva con (senza S9). In tal caso sono possibili due opzioni, entrambe accettabili:

— Opzione A: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali; si procede alla raccolta al termine del periodo di trattamento.

— Opzione B: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un ulteriore periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.

46. Nei monostrati possono essere presenti cellule mitotiche (identificabili perché di forma tonda e in fase di distacco dalla superficie) al termine del trattamento di 3-6 ore. Poiché tali cellule mitotiche si staccano facilmente, potrebbero andare perdute al momento della rimozione del terreno di coltura. Tali cellule vanno raccolte con una certa attenzione quando le colture vengono lavate e vanno riposte nuovamente nelle colture per evitare di perdere cellule in mitosi, e quindi a rischio di formazione di micronuclei, al momento della raccolta.

Numero di colture

47. Per ogni concentrazione di sostanza sperimentale e per le colture dei controlli negativi e con solvente/veicolo si utilizzino colture doppie. Se è possibile dimostrare, a partire da dati di laboratorio pregressi, una variazione minima tra colture doppie, si potrebbe ricorrere a colture singole. In tal caso, si raccomanda di analizzare un maggior numero di concentrazioni.

Raccolta delle colture e preparazione dei vetrini

48. Per ogni coltura si procede a una raccolta e a un'elaborazione separate. Per la preparazione delle cellule può essere necessario un trattamento ipotonico, che tuttavia si può evitare se, con altri mezzi, è possibile ottenere un'adeguata diffusione delle cellule. Possono essere usate tecniche diverse per la preparazione dei vetrini, purché siano garantiti preparati cellulari di elevata qualità per il conteggio. Il citoplasma cellulare può essere conservato per consentire il rilevamento dei micronuclei e (con il metodo di inibizione della citocinesi) l'individuazione affidabile di cellule binucleate.

49. I vetrini possono essere colorati con tecniche diverse, per esempio con il metodo Giemsa o tinture fluorescenti che si legano al DNA (59). L'uso di un colorante specifico per il DNA [ad esempio, arancio di acridina (61) o Hoechst 33258 più pironina-Y (62)] può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Per individuare i contenuti (cromosoma/frammento cromosomico) dei micronuclei possono essere usati anche anticorpi anticinetocore, FISH con sonde di DNA pancentromerico o marcatura in situ mediante primer specifici per DNA pancentromerico, unitamente a un'adeguata colorazione del DNA, se interessa acquisire informazioni sui meccanismi di formazione dei micronuclei (15)(16). Possono infine essere usati altri metodi per distinguere i clastogeni dagli aneugeni, purché sia stata dimostrata la loro efficacia.

Analisi

50. Tutti i vetrini, compresi quelli del solvente/veicolo e dei controlli, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. In alternativa, i campioni codificati possono essere esaminati mediante un sistema convalidato e automatizzato di analisi citometrica o di analisi per immagini.

▼M3

51. Nelle colture trattate con citoB, le frequenze dei micronuclei devono essere analizzate in almeno 2 000 cellule binucleate per concentrazione (almeno 1 000 cellule binucleate per coltura; due colture per concentrazione). Se si utilizza un'unica coltura, dalla stessa devono essere contate almeno 2 000 cellule binucleate per concentrazione. Se per il conteggio è disponibile un numero sostanzialmente inferiore a 1 000 cellule binucleate per coltura, o a 2 000 cellule se si usa un'unica coltura, per ogni concentrazione, e se non si rileva un aumento significativo dei micronuclei, il saggio dev'essere ripetuto con più cellule o con una concentrazione meno tossica, a seconda di quale opzione sia più appropriata. Si deve prestare attenzione a non conteggiare cellule binucleate con forme irregolari o che evidenzino due nuclei di dimensioni marcatamente diverse; le cellule binucleate non possono inoltre essere confuse con cellule multinucleate a scarsa diffusione. Le cellule contenenti più di due nuclei principali non devono essere considerate per la ricerca di micronuclei, poiché la frequenza di riferimento dei micronuclei può essere superiore in queste cellule (63) (64). Il calcolo delle cellule mononucleate è accettabile se è dimostrato che la sostanza sperimentale interferisce con l'attività della citoB.

52. Nelle linee cellulari testate senza trattamento con citoB, i micronuclei devono essere contati in almeno 2 000 cellule per concentrazione (almeno 1 000 cellule per coltura; due colture per concentrazione). Se si utilizza soltanto una coltura per concentrazione, da tale coltura devono essere contate almeno 2 000 cellule.

53. Nei trattamenti con citoB dev'essere determinato un CBPI o un RI per valutare la proliferazione cellulare (cfr. l'appendice 2) a partire da almeno 500 cellule per coltura. Al contrario, nei trattamenti effettuati senza citoB, è fondamentale dimostrare che le cellule inserite nel conteggio sono in fase di proliferazione, come si è detto ai punti 24-27.

Criteri di accettabilità

54. Un laboratorio che propone di utilizzare il saggio MNvit descritto nel presente metodo di prova deve dimostrare la propria capacità di individuare con affidabilità e accuratezza le sostanze chimiche con un'attività aneugenica e clastogenica nota, con e senza attivazione metabolica, oltre che le sostanze chimiche negative note, con l'impiego delle sostanze di riferimento riportate nell'appendice 3. Come prova della sua capacità di eseguire il presente metodo di prova correttamente, il laboratorio deve dimostrare che le cellule conteggiate per la formazione di micronuclei hanno portato a termine una divisione nucleare se il test è condotto senza l'impiego di citoB.

55. Si raccomanda di utilizzare le sostanze elencate nell'appendice 3 come sostanze di riferimento. Possono essere incluse sostanze alternative o aggiuntive, purché la loro attività sia nota e inducano la formazione di micronuclei mediante gli stessi meccanismi d'azione, e qualora si dimostri che tali sostanze sono rilevanti per le sostanze chimiche che saranno testate con la procedura MNvit. Tra le motivazioni addotte può figurare uno studio di convalida che utilizza un'ampia varietà di sostanze o incentrato su uno spettro più ridotto in base alla classe chimica della sostanza sperimentale o al meccanismo che produce il danno.

56. Dal controllo con solvente/veicolo e dalle colture non trattate devono emergere frequenze di formazione di micronuclei basse e coerenti in maniera riproducibile (normalmente 5-25 micronuclei/1 000 cellule per i tipi cellulari individuati al punto 11). Altri tipi cellulari possono avere gamme di risposta diverse, che devono essere determinate al momento della convalida ai fini di un loro impiego nel saggio MNvit. I dati provenienti dai controlli negativi, positivi e con solvente devono essere utilizzati per fissare range di controllo storici. Tali valori vanno considerati per decidere in merito all'adeguatezza dei controlli positivi e negativi paralleli per un esperimento.

▼M3

57. Se si propongono per il saggio modifiche di modesta entità al protocollo (ad esempio, uso di tecniche di conteggio automatizzate anziché manuali, uso di un nuovo tipo cellulare), l'efficacia di tali modifiche dev'essere dimostrata prima di considerare adatto all'uso il protocollo modificato. Per dimostrare l'efficacia è necessario dimostrare che i principali meccanismi di rottura cromosomica e di perdita o acquisizione di materiale cromosomico possono essere rilevati e che è possibile ottenere risultati positivi e negativi appropriati per la classe della sostanza in esame, o per la più ampia gamma di sostanze in esame.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

58. Se si ricorre alla tecnica dell'inibizione della citocinesi, per valutare l'induzione di micronuclei si usano soltanto le frequenze di cellule binucleate con micronuclei (indipendentemente dal numero di micronuclei per cellula). Il conteggio del numero di cellule con uno, duo o più micronuclei non è obbligatorio, anche se potrebbe fornire informazioni utili.

59. Per tutte le colture di controllo trattate e per quelle con solvente/veicolo si determini in parallelo la citotossicità e/o la citostasi (58). Nell'eventualità in cui si ricorra al metodo dell'inibizione della citocinesi, per tutte le colture trattate e per i controlli dev'essere calcolato il CBPI o l'RI quale misurazione del ritardo del ciclo cellulare. Nei trattamenti senza citoB si utilizza l'RPD o il RICC o il PI (cfr. l'appendice 2).

60. Devono essere forniti dati sulle singole colture. Tutti i dati devono essere riportati sinteticamente in una tabella.

61. Le sostanze chimiche che inducono formazione di micronuclei nel saggio MNvit possono avere questo effetto come conseguenza dell'induzione della rottura cromosomica, della perdita di cromosomi o di entrambi tali eventi. Si può ricorrere a un'ulteriore analisi con anticorpi anticinetocore, sonde centromero-specifiche in situ o altri metodi per stabilire se il meccanismo di induzione di micronuclei è dovuto a un'attività clastogenica e/o aneugenica.

Valutazione e interpretazione dei risultati

62. Non è richiesta la verifica di una risposta chiaramente positiva o negativa mediante test ulteriori. I risultati ambigui possono essere chiariti attraverso l'analisi di altre 1 000 cellule prelevate da tutte le colture per evitare la perdita di cecità. Se questo approccio non risolve l'ambiguità, occorre ricorrere a test ulteriori. Negli esperimenti di follow-up è bene considerare l'opportunità di variare i parametri dello studio in base a una serie ampliata o limitata di condizioni, a seconda dei casi. Tra i parametri che potrebbero essere modificati si annoverano l'intervallazione delle concentrazioni sperimentali, la durata del trattamento e la raccolta delle cellule, e/o le condizioni di attivazione metabolica.

63. Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, ad esempio un aumento correlato alla concentrazione o un aumento statisticamente significativo del numero di cellule che presentano micronuclei. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Il fatto di stabilire se i valori osservati rientrano o trascendono l'intervallo storico dei controlli può fornire informazioni importanti per la valutazione della significatività biologica della risposta. Si possono usare metodi statistici adeguati come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (65), ma i risultati delle prove statistiche dovrebbero essere analizzati alla luce del rapporto dose-risposta. Si deve infine tener conto della riproducibilità e dei dati storici.

▼M3

64. La maggior parte degli esperimenti fornirà risultati chiaramente positivi o negativi, ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui o dubbi nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

65. Risultati positivi del saggio MNvit indicano che una sostanza induce rottura cromosomica o perdita di materiale cromosomico nelle cellule germinali della specie sottoposta a test. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni del test, la sostanza in esame non induce rotture cromosomiche e/o acquisizione o perdita di materiale cromosomico nelle cellule germinali della specie sottoposta a test.

Relazione sul saggio

66. La relazione sul saggio deve contenere perlomeno le seguenti informazioni, se pertinenti per l'esecuzione dello studio:

Sostanza chimica di prova

— dati di identificazione e numeri CAS e CE;

— caratteristiche fisiche e purezza;

— proprietà fisico-chimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio;

— reattività della sostanza sperimentale al solvente/veicolo o al terreno di coltura cellulare;

Solvente/veicolo

— motivazione della scelta del solvente/veicolo;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/veicolo;

Cellule

— tipo e origine delle cellule usate;

— adeguatezza del tipo cellulare usato;

— assenza di micoplasmi, se del caso;

— informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione;

— se si utilizzano linfociti, sesso, età e numero dei donatori di sangue, se del caso;

— se si utilizzano linfociti, precisazione in merito all'esposizione di sangue intero o di singoli linfociti;

— numero di passaggi in coltura, se del caso;

— metodi usati per la conservazione delle colture cellulari, se del caso;

— numero modale di cromosomi;

— durata del normale ciclo cellulare (controlli negativi);

Condizioni di prova

— identità dell'inibitore della citocinesi (ad esempio, citoB), se impiegato, e la sua concentrazione oltre che la durata di esposizione delle cellule;

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, compresi i dati sulla citotossicità e sui limiti di solubilità, se disponibili;

— composizione del terreno di coltura, concentrazione di CO_2, se del caso;

— concentrazioni della sostanza in esame;

▼M3

— concentrazione (e/o volume) del veicolo e della sostanza di prova aggiunti;

— temperatura e tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— momento della raccolta dopo il trattamento;

— densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità;

— controlli positivi e negativi;

— metodi di preparazione dei vetrini e tecniche di colorazione utilizzati;

— criteri di identificazione dei micronuclei;

— numeri di cellule analizzate;

— metodi di misura della citotossicità;

— eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;

— metodo o metodi di analisi statistica usati;

— metodi, come l'uso di anticorpi anticinetocore, per stabilire se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso;

Risultati

— metodo di misurazione della citotossicità impiegato, ad esempio CBPI o RI, se si ricorre al metodo dell'inibizione della citocinesi; RICC, RPD o PI, se non si ricorre a metodi di inibizione della citocinesi; altre osservazioni, se del caso, ad esempio confluenza cellulare, apoptosi, necrosi, conta in metafase, frequenza di cellule binucleate;

— segni di precipitazione;

— dati sul pH e sull'osmolalità del terreno di trattamento, se determinati;

— definizione delle cellule accettabili per l'analisi;

— distribuzione delle cellule mononucleate, binucleate e multinucleate, se si utilizza un metodo di inibizione della citocinesi;

— numero di cellule con micronuclei, indicato separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo, e indicazione relativa alla loro origine (se da cellule binucleate o mononucleate), se del caso;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— dati sui controlli negativi (solvente/veicolo) e positivi (concentrazioni e solventi) paralleli;

— precedenti dati sui controlli negativi (solvente/veicolo) e positivi, con variazioni, medie e deviazioni standard e con l'indicazione dell'intervallo di confidenza (ad esempio, 95 %);

— analisi statistica; valori p, se noti;

Discussione dei risultati

Conclusioni

▼**M3**

BIBLIOGRAFIA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.,* 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.,* 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.,* 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.,* 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.,* 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis,* 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis,* 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.,* 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis,* 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes, *Mutation Res.,* 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.,* 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.,* 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Res.,* 540, 153-163.

▼M3

(17) OCSE (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test,* Test Guideline No. 473, OCSE Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on in vitro micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.,* 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.,* 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.,* 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.,* 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.,* 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, *Mutation Res.,* 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.,* 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.,* 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000),*In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.,* 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis,* 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test, *Mutation Res.,* 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006, Available at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Available at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of in vitro Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis,* 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test, *Mutation Res.,* 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis,* 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.,* 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.,* 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.,* 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.,* 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.,* 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.,* 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.,* 113, 173-215.

(46) ONG, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.,* 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pagg. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.,* 28, 51-59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis,* 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pagg. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.,* 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.,* 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to «Report from the in vitro micronucleus assay working group», *Mutation Res.,* 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.,* 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.,* 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.,* 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.,* 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.,* 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.,* 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pagg. 463-467.

(66) Regolamento (CE) n. 850/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo agli inquinanti organici persistenti e che modifica la direttiva 79/117/CEE, GU L 229 del 30.4.2004, pag. 5.

▼M3

Appendice 1

Definizioni

Aneugeno: qualsiasi sostanza o processo che, interagendo con le componenti del ciclo mitotico e meiotico di divisione cellulare, determina aneuploidia nelle cellule o negli organismi.

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

Apoptosi: morte cellulare programmata caratterizzata da una serie di fasi che portano alla disintegrazione delle cellule in particelle legate alla membrana, le quali vengono poi eliminate mediante fagocitosi o «shedding» (clivaggio dei ricettori di membrana).

Proliferazione cellulare: aumento del numero di cellule dovuto alla divisione mitotica delle cellule.

Centromero: regione del DNA di un cromosoma in cui la coppia dei cromatidi è mantenuta unita e sulla quale sono localizzati fianco a fianco i due cinetocori.

Clastogeno: qualsiasi sostanza o processo in grado di provocare aberrazioni nella struttura di un cromosoma in popolazioni di cellule o organismi.

Citocinesi o citodieresi: il processo di divisione cellulare immediatamente successivo alla mitosi e che porta alla formazione di due cellule figlie, ciascuna contenente un nucleo.

Indice di proliferazione cellulare (CBPI): la proporzione di cellule in fase di seconda divisione nella popolazione trattata rispetto al controllo (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Citostasi: inibizione della crescita cellulare (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Citotossicità: effetti dannosi a carico della struttura o della funzione cellulare che in ultima istanza provocano la morte della cellula.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, riarrangiamenti degli addotti, alterazioni, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Cellule in interfase: cellule non ancora approdate alla fase mitotica.

Cinetocore: una struttura proteica che si forma nel centromero di un cromosoma e alla quale si agganciano i microtubuli del fuso durante la divisione cellulare, consentendo un movimento ordinato dei cromosomi delle cellule figlie verso i poli di queste ultime.

Micronuclei: piccoli nuclei, distinti e soprannumerari rispetto al principale nucleo delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi o della meiosi da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase.

Indice mitotico: il rapporto tra cellule in metafase e il numero totale di cellule osservate in una popolazione cellulare; un'indicazione del grado di proliferazione cellulare di una popolazione.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomica).

▼**M3**

Non disgiunzione: incapacità della coppia di cromatidi di separarsi e di migrare in due cellule figlie distinte in fase di divisione, con la conseguenza che una cellula figlia presenterà un numero anomalo di cromosomi.

Poliploidia: aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessa l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi, ma non l'intero corredo cromosomico.

Indice di proliferazione (PI): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Aumento relativo della conta cellulare (Relative Increase in Cell Count, RICC): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Raddoppiamento relativo della popolazione (Relative Population Doubling, RPD): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Indice di replicazione (RI): la proporzione dei cicli di divisione cellulare completati in una coltura trattata rispetto al controllo, durante il periodo di esposizione e il recupero (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

▼M3

Appendice 2

Formule per la valutazione della citotossicità

1. *Nei trattamenti con citoB*, la valutazione della tossicità deve basarsi sull'indice di proliferazione cellulare (CBPI) o sull'indice di replicazione (RI) (16) (58). Il CBPI indica la media dei cicli cellulari per singola cellula durante il periodo di esposizione alla citoB e può essere usato per calcolare la proliferazione cellulare. L'RI indica il numero relativo di nuclei nelle colture trattate rispetto ai controlli e può essere usato per calcolare la % di citostasi:

$$\% \text{ citostasi} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

e:

T = coltura di trattamento con la sostanza chimica

C = coltura di controllo con veicolo

dove:

$$CBPI = \frac{((\text{n. cellule mononucleate}) + (2 \times \text{n. cellule binucleate}) + (3 \times \text{n. cellule multinucleate}))}{(\text{Numero totale di cellule})}$$

Quindi, un CBPI pari a 1 (tutte le cellule sono mononucleate) equivale a una percentuale di citostasi del 100 %.

$$\text{Citostasi} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{n. cellule binucleate}) + (2 \times \text{n. cellule multinucleate})) \div (\text{Numero totale di cellule})_T}{((\text{n. cellule binucleate}) + (2 \times \text{n. cellule multinucleate})) \div (\text{Numero totale di cellule})_C} \times 100$$

T = colture trattate

C = colture di controllo

2. Quindi, un RI del 53 % significa che, rispetto al numero di cellule che si sono divise per formare cellule binucleate e multinucleate nella coltura di controllo, nella coltura trattata soltanto il 53 % si è avviato alla divisione, ossia si ha una percentuali di citostasi pari al 47 %.

3. *Nei trattamenti senza citoB*, si raccomanda di valutare la citotossicità in base all'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) o al raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) (58), poiché entrambi i metodi tengono conto della proporzione di popolazione cellulare che è andata incontro a divisione.

$$RICC = \frac{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture trattate (definitivo – iniziale)})}{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture di controllo (definitivo – iniziale)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{n. di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})}{(\text{n. di raddoppiamenti della popolazione nelle colture di controllo})} \times 100$$

▼**M3**

dove:

Raddoppiamento della popolazione = [logaritmo (numero di cellule dopo il trattamento ÷ numero di cellule iniziale)] ÷ logaritmo 2

4. Quindi, un RICC o un RPD del 53 % indica una citotossicità/citostasi del 47 %.

5. Con un indice di proliferazione (PI) è possibile valutare la citotossicità contando il numero di cloni consistenti in 1 cellula (cl1), 2 cellule (cl2), da 3 a 4 cellule (cl4) e da 5 a 8 cellule (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Il PI è stato usato come parametro di citotossicità valido e affidabile anche per le linee cellulari coltivate in situ in assenza di citoB (25) (26) (27) (28).

▼**M3**

Appendice 3

Sostanze di riferimento raccomandate per la valutazione della prestazione ([1])

Categoria	Sostanza	CAS	CE
1. Clastogeni attivi senza attivazione metabolica			
	Citosina arabinoside	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogeni che richiedono attivazione metabolica			
	Benzo(a)pirene	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeni			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vinblastina	143-67-9	205-606-0
4. Sostanze negative			
	Di-2-etilesilftalato	117-81-7	204-211-0
	Acido nalidixico	389-08-2	206-864-7
	Pirene	129-00-0	204-927-3
	Cloruro di sodio	7647-14-5	231-598-3

([1]) Le sostanze di riferimento sono le sostanze di cui si raccomanda l'uso. Nell'elenco possono essere incluse sostanze alternative o aggiuntive, purché la loro attività sia nota e inducano la formazione di micronuclei mediante gli stessi meccanismi d'azione, e qualora si dimostri che tali sostanze sono rilevanti per le sostanze chimiche che saranno testate con la procedura MNvit. A seconda dello scopo, tra le motivazioni addotte può figurare anche uno studio di convalida che utilizza un'ampia varietà di sostanze o incentrato su uno spettro più ridotto in base alla classe chimica della sostanza sperimentale o al meccanismo che produce il danno.

▼M3

B.50. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: DA**

INTRODUZIONE

1. Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il primo metodo di prova (TM) (B.42) per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429), è stato rivisto (1). Sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a queste associate (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Nell'LLNA si utilizzano timidina o iodina marcate con traccianti radioisotopici per misurare la proliferazione dei linfociti; di conseguenza, quando l'acquisizione, l'impiego o lo smaltimento della radioattività risultano problematici, il ricorso al saggio è limitato. L'LLNA: DA (sviluppato da Daicel Chemical Industries, Ltd.) è una variante non radioattiva del metodo LLNA, che quantifica il contenuto di adenosina trifosfato (ATP) tramite bio-luminescenza utilizzandolo come indicatore della proliferazione linfocitaria. Il saggio LLNA: DA è stato convalidato, rivisto e raccomandato da un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti, che lo considerano utile per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano o non provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti (10) (11) (12) (13). Il presente metodo di prova è stato concepito per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. Il capitolo B.6 del presente allegato e la linea guida dell'OCSE «Test Guideline 406» utilizzano saggi sui porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (14). L'LLNA (capitolo B.42 del presente allegato; OCSE Test Guideline 429) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (capitolo B.50 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 A) e LLNA: BrdU-ELISA (capitolo B.51 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 B), offrono tutti un vantaggio rispetto ai saggi sui porcellini d'India in B.6 e OCSE Test Guideline 406 (14) in termini di riduzione e perfezionamento dell'utilizzo di animali.

2. Simile all'LLNA, l'LLNA: DA studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per una valutazione dose-risposta. Inoltre, la capacità del saggio di individuare sensibilizzanti cutanei senza la necessità di ricorrere a marcatori radioattivi per il DNA elimina il potenziale di esposizione professionale alla radioattività e le problematiche correlate allo smaltimento dei rifiuti. Ciò a sua volta può giustificare un accresciuto impiego dei topi per l'individuazione dei sensibilizzanti cutanei, che potrebbe ridurre ulteriormente l'uso dei porcellini d'India per testare il potenziale di sensibilizzazione cutanea (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14).

DEFINIZIONI

3. Le definizioni usate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Il saggio LLNA: DA è una variante del metodo LLNA da usarsi per identificare le potenziali sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti specifici. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA: DA vada usato in tutti i casi in sostituzione del metodo LLNA o dei test sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma (10) (11). Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte

▼M3

le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimiche-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza del saggio LLNA: DA per la sostanza in questione [data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche LLNA: DA (cfr. il punto 5)] e servono a scegliere la dose.

5. L'LLNA: DA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività allergizzante da contatto. Essa ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo rispetto ai saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Inoltre, l'LLNA: DA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sull'allergia da contatto perché, diversamente dal metodo B.6 e dalla linea guida OCSE Test Guideline 406, l'LLNA: DA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Nonostante i vantaggi dell'LLNA: DA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (14), occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 [ad esempio, i test con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei (tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi) (6) (1 e capitolo B.42 del presente allegato), la solubilità della sostanza di prova]. Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (16) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Si raccomanda di applicare anche all'LLNA: DA (10) i limiti che sono stati individuati per l'LLNA (1, e capitolo B.42 del presente allegato). Inoltre, l'uso del metodo LLNA: DA potrebbe non essere appropriato per la sperimentazione di sostanze che interferiscono con i livelli di ATP (ad esempio, sostanze che funzionano come inibitori degli ATP) o che non permettono un'accurata misurazione degli ATP intracellulari (ad esempio, presenza di enzimi che degradano gli ATP, presenza di ATP extracellulari nel linfonodo). A parte tali limiti già rilevati, l'LLNA: DA dovrebbe essere adatto per la sperimentazione di qualsiasi sostanza chimica, a meno che tale sostanza non possieda delle proprietà che possono interferire con l'accuratezza del saggio. Inoltre, non andrebbe esclusa la possibilità di produrre risultati positivi borderline nel caso in cui si ottengano valori per l'indice di stimolazione (SI) compresi tra 1,8 e 2,5 (cfr. i punti 31-32). Tale considerazione è basata sulla banca dati di validazione di 44 sostanze e l'uso di un SI $\geq$ 1,8 (cfr. il punto 6) nelle quali l'LLNA: DA ha correttamente individuato tutti i 32 sensibilizzanti dell'LLNA, ma ha erroneamente identificato tre delle 12 sostanze non sensibilizzanti dell'LLNA con valori SI compresi tra 1,8 e 2,5 (risultato borderline positivo) (10). Tuttavia, poiché lo stesso insieme di dati è stato usato per definire i valori SI e per calcolare le proprietà predittive del test, i risultati menzionati potrebbero essere una stima in eccesso delle reali proprietà predittive.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA: DA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione di linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa della sensibilizzazione. Tale proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media in ogni gruppo sperimentale con la proliferazione media nei controlli trattati con veicolo (VC). Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione media nel gruppo trattato e quella del gruppo parallelo

▼M3

trattato con veicolo, definito «Indice di Stimolazione» (SI), che deve essere ≥ 1,8 prima che una sostanza sperimentale possa ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. Le procedure qui descritte si basano sulla misurazione del contenuto di ATP tramite bioluminescenza (tecnica nota per il conteggio delle cellule vive) (17) per rilevare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio (18) (19). Il metodo della bioluminescenza utilizza l'enzima luciferasi per catalizzare la formazione di luce da ATP e luciferina in base alla seguente reazione:

$$ATP + Luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Ossiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + Luce$$

L'intensità della luce emessa è linearmente correlata alla concentrazione di ATP ed è misurata mediante un luminometro. Il saggio luciferina-luciferasi è un metodo sensibile per la quantificazione degli ATP usato in un'ampia varietà di applicazioni (20).

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Gli studi di validazione per l'LLNA: DA sono stati condotti esclusivamente con il ceppo CBA/J, che pertanto è considerato il ceppo da preferire (12) (13). Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile usare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta LLNA: DA non esistono differenze significative per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (21), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 ore d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima del'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertarsi che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a un'esagerata procedura di estrazione in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

▼M3

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile a una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta SIA ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la compatibilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA: DA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA: DA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione SI $\geq$ 1,8 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile m non eccessiva (ad esempio, un SI > 10 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0) e un 25 % di eugenolo (CAS 97-53-0,) in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondono ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli $\leq$ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA: DA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA: DA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).

13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA: DA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche devono essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati pregressa.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile possono essere messi in dubbio. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo di controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (22).

▼M3

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (23). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.

16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:

— somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame;

— caratteristiche fisiche/chimiche note;

— dati di supporto provenienti dall'LLNA: DA;

— dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (2) e (24). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (24) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).

19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone: olio d'oliva (4:1 v/v), N,N-dimetilformammide, metiletilcheton, glicole propilenico e dimetilsulfossido (6), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

▼M3

20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 33). Inoltre, è possibile valutare la possibilità di ridurre il numero di topi nel gruppo di controllo positivo soltanto quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale (22). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. La regolare raccolta di dati individuali per singolo animale offre il vantaggio, dal punto di vista del benessere degli animali, di evitare di replicare i test, il che sarebbe invece indispensabile se i risultati sulla sostanza sperimentale raccolti originariamente con una modalità (ad esempio, raccogliendo dati aggregati) fossero successivamente considerati dalle autorità di regolamentazione assieme ad altri requisiti (ad esempio, dati individuali).

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di doser appropriato per l'LLNA: DA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nel principale studio LLNA: DA, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24)/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 23) La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o la concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA: DA, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppi di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazioni per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 8). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione), il giorno 7 (24 ore prima della conclusione dello studio) e il giorno 8. Inoltre, il giorno 8 lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia eseguita dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un qualsiasi giorno di misurazione (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA: DA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazioni	Punteggio
Nessun eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2

▼M3

Osservazioni	Punteggio
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono stati associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (32) (33) (34).

24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA: DA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 8, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (36).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

— *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Applicare una soluzione acquosa all'1 % di laurilsolfato di sodio (SLS) sulla parte posteriore di entrambe le orecchie utilizzando un pennello intinto nella soluzione SLS per coprire la parte di orecchio interessata con quattro-cinque pennellate. Un'ora dopo il trattamento con SLS, applicare 25 μL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

— *Giorni 2, 3 e 7:* Ripetere il trattamento con soluzione acquosa all'1 % di SLS e la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

— *Giorni 4, 5 e 6:* Nessun trattamento.

— *Giorno 8:* Registrare il peso di ciascun animale ed eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Circa 24-30 ore dopo l'inizio dell'applicazione il giorno 7, sottoporre gli animali a eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato (PBS) per ciascun animale separatamente. I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano nella bibliografia (22). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante ear punch weight determinations all'autopsia.

▼M3

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Da ciascun topo si prepara una singola sospensione di cellule linfonodali asportate bilateralmente inserendo i linfonodi tra due vetrini ed esercitando una leggera pressione per schiacciare i linfonodi. Dopo essersi accertati di aver ottenuto un sottile strato di tessuto, aprire i vetrini. Porre il tessuto rimasto sui due vetrini in sospensione in una soluzione salina tampone fosfato (PBS): reggere un angolo di ciascun vetrino sopra la piastra di Petri e sciacquare con la soluzione, raschiando il tessuto dal vetrino con apposito raschietto. Poiché i linfonodi dei controlli negativi sono piccoli, è importante effettuare queste operazioni con attenzione per evitare di provocare effetti artificiali sui valori dell'indice di stimolazione. Per sciacquare i due vetrini è necessario un volume complessivo di soluzione PBS pari a 1 mL. La sospensione di linfonodi nella piastra di Petri dev'essere delicatamente omogeneizzata con il raschietto. Raccogliere 20 μL della sospensione con una micropipetta, facendo attenzione a non prelevare la membrana visibile a occhio nudo, e successivamente miscelare il tessuto prelevato con 1,98 mL di soluzione PBS fino a ottenere un campione di 2 mL. Preparare un secondo campione di 2 mL seguendo la medesima procedura, in modo da predisporre due campioni per ciascun animale.

Determinazione della proliferazione delle cellule (misurazione del contenuto di ATP nei linfociti)

27. Gli aumenti del contenuto di ATP nei linfonodi si misurano con il metodo luciferina/luciferasi avvalendosi di un kit ATP, che misura la bioluminescenza nelle unità di luminescenza relative (RLU). La durata del saggio, dal momento della soppressione dell'animale alla misurazione del contenuto di ATP per ciascun animale, dev'essere mantenuta uniforme, entro un arco temporale di circa 30 minuti, poiché si ritiene che il contenuto di ATP diminuisca gradualmente nel tempo dopo la morte dell'animale (12). Pertanto, la serie di procedure compresa tra l'escissione dei linfonodi auricolari e la misurazione degli ATP dev'essere ultimata entro 20 minuti, secondo il calendario prefissato che è lo stesso per ciascun animale. La luminescenza ATP si misura in ciascun campione di 2 mL in modo da raccogliere per ogni animale un totale di due misure ATP. In questo modo si determina la luminescenza ATP media, che verrà usata per i successivi calcoli (cfr. il punto 30).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

28. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (36).

Peso corporeo

29. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre individuare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

30. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. L'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi dell'RLU per topo calcolati per ogni gruppo di trattamento, compreso il controllo positivo, per la media dell'RLU per topo per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno.

▼M3

31. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione SI ≥ 1,8 (10). Tuttavia, per determinare se un risultato borderline (ossia un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5) è dichiarato positivo (2) (3) (37), possono anche essere utilizzati la potenza del rapporto dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi.

32. Nel caso di una risposta positiva borderline con un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5, per confermare che tali risultati sono positivi gli utilizzatori potrebbero voler prendere in considerazione informazioni aggiuntive come il rapporto dose-risposta, le prove di tossicità sistemica o irritazione eccessiva e, se del caso, la significatività statistica oltre che i valori SI (10). Inoltre, è necessario tener conto di diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea nel topo, nonché la natura del rapporto dose-risposta rilevato. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (4).

33. La raccolta di dati a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo trattato con veicolo/solvente parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati «aberranti»).

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori RLU medi individuali, il valore RLU medio per ciascun animale, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo parallelo con veicolo/solvente.

Relazione sull'esecuzione del saggio

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

— dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

— dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);

— giustificazione per la scelta del veicolo;

▼**M3**

Animali sperimentali

— origine dei topi del ceppo CBA;

— condizioni microbiologiche degli animali, se note;

— numero ed età degli animali;

— origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

— origine, numero di lotto, assicurazione della qualità/dati sul controllo della qualità del fabbricante per il kit ATP;

— dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;

— giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito;

— concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);

— dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri per considerare gli studi positivi o negativi;

— dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

— riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usato;

— dati sui controlli positivi e/o negativi (solvente/veicolo), paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;

— se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

— peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e della soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;

— momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'eventuale irritazione cutanea nel punto di applicazione della somministrazione, per ciascun animale;

— momento dell'eliminazione dell'animale e momento della misurazione ATP per ciascun animale;

— tabella dei valori RLU individuali e dei valori SI per ciascun gruppo di trattamento;

— termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per valore RLU per topo per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento;

▼M3

— indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo;

— rapporto dose-risposta;

— analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

— breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.,* 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 11-26.

(14) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.,* 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OCSE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.,* 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6Cice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health,* 53 563-79.

(38) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment,* Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza» per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (38).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe avere le seguenti proprietà: i) origine o origini coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando le stesse sostanze di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (38).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: La misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (38).

Aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e a procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti rispetto a coloro che eseguono le prove.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (38).

Irritazione cutanea: Un processo immunologico che si verifica quanto un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): Un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

▼M3

B.51. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: BrdU-ELISA

INTRODUZIONE

1. Le linee guida OCSE «Guidelines for the Testing of Chemicals» e i metodi di prova dell'UE sono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze a livello regolamentare e di considerazioni legate al benessere degli animali. Il primo metodo di prova (TM) (B.42) per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, il cosiddetto Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429) è stato rivisto (1, e capitolo B.42 del presente allegato). Sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla convalida dell'LLNA oltre che una revisione delle attività ad esso associate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Nell'LLNA si utilizzano timidina o iodina marcate con traccianti radioisotopici per misurare la proliferazione dei linfociti; di conseguenza, quando l'acquisizione, l'impiego o lo smaltimento della radioattività risultano problematici, il ricorso al saggio è limitato. L'LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, saggio immuno-assorbente legato a un enzima] è una variante non radioattiva del metodo LLNA, che utilizza 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) non marcata [Chemical Abstracts Service (CAS) n. 59-14-3] in un sistema di prova basato su ELISA per misurare la proliferazione dei linfociti. Il saggio LLNA: BrdU-ELISA è stato convalidato e rivisto da un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti, che ne raccomandano l'utilizzo perché considerato utile per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano o non provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti (10) (11) (12). Il presente metodo di prova è stato concepito per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. Il capitolo B.6 del presente allegato e la linea guida dell'OCSE «Test Guideline 406» utilizzano saggi sui porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (13). L'LLNA (capitolo B.42 del presente allegato; OCSE Test Guideline 429) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: BrdU-ELISA (capitolo B.51 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 B) e LLNA: DA (capitolo B.50 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 A), offrono tutti un vantaggio rispetto ai saggi sui porcellini d'India in B.6 e OCSE Test Guideline 406 (13) in termini di riduzione e perfezionamento dell'utilizzo di animali.

2. Simile all'LLNA, l'LLNA: BrdU-ELISA studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per una valutazione dose-risposta. Inoltre, la capacità del saggio di individuare sensibilizzanti cutanei senza la necessità di ricorrere a marcatori radioattivi per il DNA elimina il potenziale di esposizione professionale alla radioattività e le problematiche correlate allo smaltimento dei rifiuti. Ciò a sua volta può giustificare un accresciuto impiego dei topi per l'individuazione dei sensibilizzanti cutanei, che potrebbe ridurre ulteriormente l'uso dei porcellini d'India per testare il potenziale di sensibilizzazione cutanea (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13).

DEFINIZIONI

3. Le definizioni usate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Il saggio LLNA: BrdU-ELISA è una variante del metodo LLNA da usarsi per identificare le potenziali sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti specifici. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA: BrdU-ELISA vada usato in tutti i casi in sostituzione del metodo LLNA o dei test sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma (10) (11). Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra

▼M3

cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimiche-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza del saggio LLNA: BrdU-ELISA per la sostanza in questione [data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche con il LLNA: BrdU-ELISA (cfr. il punto 5)] e servono a scegliere la dose.

5. L'LLNA: BrdU-ELISA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo rispetto ai saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Inoltre, l'LLNA: BrdU-ELISA rappresenta un significativo miglioramento del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto perché, diversamente dal metodo B.6 e dalla linea guida OCSE Test Guideline 406, l'LLNA: BrdU-ELISA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA: BrdU-ELISA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India (capitolo B.6 del presente allegato, 13). Per questo motivo, l'LLNA: BrdU-ELISA riduce la sofferenza degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA: BrdU-ELISA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (13), occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 [ad esempio, i test con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei (tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi) (6) (1, e capitolo B.42 del presente allegato), la solubilità della sostanza di prova]. Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (15) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Si raccomanda di applicare anche all'LLNA: BrdU-ELISA (10) i limiti che sono stati individuati per l'LLNA (1, e capitolo B.42 del presente allegato). A parte tali limiti già rilevati, l'LLNA: BrdU-ELISA dovrebbe essere adatto per la sperimentazione di qualsiasi sostanza chimica, a meno che tale sostanza non possieda delle proprietà che possono interferire con l'accuratezza del saggio. Inoltre, non andrebbe esclusa la possibilità di produrre risultati positivi borderline nel caso in cui si ottengano valori per l'indice di stimolazione (SI) compresi tra 1,6 e 1,9 (cfr. i punti 31-32). Tale considerazione è basata su prove effettuate con la banca dati di validazione di 43 sostanze e l'uso di un SI $\geq$ 1,6 (cfr. il punto 6), nelle quali l'LLNA: BrdU-ELISA ha correttamente individuato tutti i 32 sensibilizzanti dell'LLNA, ma ha erroneamente identificato due delle 11 sostanze non sensibilizzanti dell'LLNA con valori SI compresi tra 1,6 e 1,9 (risultato borderline positivo) (10). Tuttavia, poiché lo stesso insieme di dati è stato usato per definire i valori SI e per calcolare le proprietà predittive del test, i risultati menzionati potrebbero essere una stima in eccesso delle reali proprietà predittive.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA: BrdU-ELISA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione di linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa della sensibilizzazione. Tale proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media in ogni gruppo sperimentale con la proliferazione media nei controlli trattati con veicolo (VC). Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione media nel gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito «Indice di Stimolazione» (SI), che deve essere $\geq$ 1,6 prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. Le procedure qui descritte

▼M3

si basano sulla misurazione del contenuto di BrdU per rilevare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio. BrdU è un analogo della timidina, anch'esso similmente incorporato nel DNA delle cellule in fase di proliferazione. Il metodo ELISA misura l'incorporazione di BrdU, utilizzando un anticorpo specifico per BrdU che è marcato anche con perossidasi. Quando il substrato viene aggiunto, la perossidasi reagisce con il substrato per generare un prodotto colorato che è quantificato in una specifica assorbanza con un lettore di micropiastra.

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Gli studi di validazione per l'LLNA: BrdU-ELISA sono stati condotti esclusivamente con il ceppo CBA/JN, che pertanto è considerato il ceppo da preferire (10) (12). Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile usare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta LLNA: BrdU-ELISA non esistono differenze significative per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (16), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ± 3 °C. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertarsi che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a un'esagerata procedura di estrazione in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile, come una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta sia ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la comparabilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima

▼M3

di eseguire l'LLNA: BrdU-ELISA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA: BrdU-ELISA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione SI ≥ 1,6 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o una tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un SI > 14 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0) e un 25 % di eugenolo (CAS 97-53-0) in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA: BrdU-ELISA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA: BrdU-ELISA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).

13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA: BrdU-ELISA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche devono essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati pregressa.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile possono essere messi in dubbio. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo dei controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (17).

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (18). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.

▼M3

16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze sperimentali. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:

— somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame;

— caratteristiche fisiche/chimiche note;

— dati di supporto provenienti dall'LLNA: BrdU-ELISA;

— dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11- 15). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche 2 e 19. Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea a livello locale (19)(20 e capitolo B.4 del presente allegato). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).

19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone: olio di oliva (4:1 v/v), *N,N*-dimetilformammide, metiletilcheton, glicole propilenico e dimetilsulfossido (6), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

▼M3

20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 33). Inoltre, è possibile valutare la possibilità di ridurre il numero di topi nel gruppo del controllo positivo soltanto quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale (17). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. La regolare raccolta di dati individuali per singolo animale offre il vantaggio, dal punto di vista del benessere degli animali, di evitare di replicare i test, il che sarebbe invece indispensabile se i risultati sulla sostanza sperimentale raccolti originariamente con una modalità (ad esempio, raccogliendo dati aggregati) fossero successivamente considerati dalle autorità di regolamentazione assieme ad altri requisiti (ad esempio, dati individuali).

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18) è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di dose appropriato per l'LLNA: BrdU-ELISA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nel principale studio LLNA: BrdU-ELISA, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24) e/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 23). La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o la concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA: BrdU-ELISA principale, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppi di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazioni per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 6). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (20, e capitolo B.4 del presente allegato). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione) e il giorno 6. Inoltre, il giorno 6 lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia eseguita dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un qualsiasi giorno di misurazione (21) (22). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA: BrdU-ELISA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazione	Punteggio
Nessun segno di eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2

▼M3

Osservazione	Punteggio
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (21) (22), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (25) (26) (27) (28) (29).

24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (30) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA: BrdU-ELISA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 6, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (31).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

— *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Applicare 25 μL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

— *Giorni 2 e 3:* Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

— *Giorno 4:* Nessun trattamento.

— *Giorno 5:* Somministrare 0,5 mL (5 mg/topo) di soluzione BrdU (10 mg/mL) mediante iniezione intraperitoneale.

— *Giorno 6:* Registrare il peso di ciascun animale. Circa 24 ore (24 h) dopo la somministrazione di BrdU, gli animali vanno sottoposti ad eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato per ciascun animale separatamente. I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano alla voce bibliografica (17). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante biopsie effettuate all'autopsia).

▼M3

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Mediante delicata disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 μm o un'altra tecnica accettabile (ad esempio, uso di un pestello in plastica usa e getta per schiacciare i linfonodi, seguito dal passaggio su un filtro di nylon #70) si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali asportate bilateralmente. La procedura per la preparazione della sospensione cellulare è fondamentale in questo saggio e, pertanto, ogni operatore deve aver già acquisito la necessaria perizia. Oltretutto, negli animali per i controlli negativi i linfonodi sono piccoli, cosicché è necessario intervenire con attenzione per evitare effetti artificiali sui valori SI. In ogni caso, il volume bersaglio della sospensione cellulare deve essere aggiustato fino a ottenere un determinato volume ottimizzato (circa 15 mL). Il volume ottimizzato si basa sul raggiungimento di un'assorbanza media del gruppo del controllo negativo compresa tra 0,1 e 0,2.

Determinazione della proliferazione delle cellule (misurazione del contenuto di BrdU nel DNA dei linfociti)

27. Il metodo ELISA misura il BrdU utilizzando un kit commerciale (ad esempio, Roche Applied Science, Mannheim, Germania, numero di catalogo 11 647 229 001). In breve, si aggiungono 100 μL della sospensione cellulare ai pozzi di una micropiastra a fondo piatto in triplice copia. Dopo la fissazione e la denaturazione della sospensione, a ogni pozzo si aggiunge un anticorpo anti-BrdU che viene lasciato reagire. Successivamente l'anticorpo anti-BrdU viene asportato tramite lavaggio e viene aggiunta la soluzione di substrato, lasciando il tempo sufficiente a produrre il cromogeno. Si misura quindi l'assorbanza a 370 nm con una lunghezza d'onda di riferimento di 492 nm. In tutti i casi, le condizioni di prova devono essere ottimizzate (cfr. il punto 26).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

28. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (31).

Peso corporeo

29. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre individuare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

30. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. L'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi dell'indice di marcatura con BrdU per topo calcolati per ogni gruppo di trattamento, compreso il gruppo di controllo positivo, per la media dell'indice di marcatura con BrdU per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno.

L'indice di marcatura con BrdU è così definito:

$$\text{Indice di marcatura con BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS vuoto}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS vuoto}_{ref})$$

dove em = lunghezza d'onda delle emissioni e ref = lunghezza d'onda di riferimento.

▼M3

31. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione SI ≥ 1,6 (10). Tuttavia, per determinare se un risultato borderline (ossia un valore SI compreso tra 1,6 e 1,9) è dichiarato positivo (3) (6) (32), possono anche essere utilizzati la potenza del rapporto dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi.

32. Nel caso di una risposta positiva borderline con un valore SI compreso tra 1,6 e 1,9, per confermare che tali risultati sono positivi gli utenti potrebbero voler prendere in considerazione informazioni aggiuntive come il rapporto dose-risposta, le prove di tossicità sistemica o irritazione eccessiva e, se del caso, la significatività statistica oltre che i valori SI (10). Inoltre, è necessario tener conto di diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea nel topo, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (4).

33. La raccolta di dati a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo trattato con veicolo/solvente parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati «aberranti»).

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori medi individuali dell'indice di marcatura con BrdU, il valore medio dell'indice di marcatura con BrdU per ciascun animale per gruppo, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo parallelo con veicolo/solvente.

Relazione sull'esecuzione del saggio

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

— dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

— dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);

— giustificazione per la scelta del veicolo;

▼**M3**

Animali sperimentali

— origine dei topi del ceppo CBA;

— condizioni microbiologiche degli animali, se note;

— numero ed età degli animali;

— origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

— origine, numero di lotto, assicurazione della qualità/dati sul controllo della qualità del fabbricante (sensibilità e specificità anticorpale e limite di rilevazione) per il kit ELISA;

— dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;

— giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito;

— concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);

— dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri per considerare gli studi positivi o negativi;

— dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

— riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usato;

— dati sui controlli positivi e negativi (solvente/veicolo), paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;

— se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

— peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e della soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;

— momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'eventuale irritazione cutanea nel punto di applicazione della somministrazione, per ciascun animale;

— tabella degli indici di marcatura con BrdU individuali e dei valori SI per ciascun gruppo di trattamento;

— termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per indice di marcatura con BrdU per topo per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento;

▼M3

— indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo;

— rapporto dose-risposta;

— analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

— breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OCSE (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OCSE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OCSE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OCSE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza» per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (33).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento deve avere le seguenti proprietà: i) origine o origini coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva (33).

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva (33).

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando la stessa sostanza di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (33).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: la misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (33).

Aberrante: Un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e a procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti rispetto a coloro che eseguono le prove.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (33).

Irritazione cutanea: un processo immunologico che si verifica quando un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

▼M4

B.52. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 436 (2009). La prima linea guida sulla tossicità acuta per inalazione (TG n. 403) è stata adottata nel 1981 e successivamente riveduta (cfr. capitolo B.2 del presente allegato) (1). Dopo l'adozione della revisione del metodo della classe di tossicità acuta per via orale (capitolo B.1 *ter* del presente allegato) (5), si è ritenuto opportuno mettere a punto un metodo della classe di tossicità acuta per inalazione (2) (3) (4). Una valutazione retrospettiva di questo metodo ne ha dimostrato l'idoneità ai fini della classificazione e dell'etichettatura (6). Il metodo di prova della classe di tossicità acuta per inalazione consente di classificare la tossicità della sostanza chimica in esame mediante una serie di fasi in cui si saggiano concentrazioni fisse predeterminate. Sebbene la letalità sia l'endpoint fondamentale, gli animali che presentano segni di dolore e sofferenza gravi o morte imminente devono essere sottoposti a eutanasia per ridurne al minimo la sofferenza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 (7) contiene indicazioni utili per riconoscere tali segni.

2. Nel documento d'orientamento sulle prove di tossicità acuta per inalazione (documento d'orientamento n. 39) (8) figurano indicazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del presente metodo di prova.

3. Le definizioni usate nell'ambito del presente metodo di prova figurano nell'appendice 1 e nel documento di orientamento n. 39 (8).

4. Questo metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9). Qualora sia necessario effettuare stime puntuali di valori di CL_{50} o analisi della curva concentrazione-risposta, il metodo più adatto è quello descritto nel capitolo B.2 del presente allegato (1). Per ulteriori indicazioni sulla scelta del metodo di prova, consultare il documento di orientamento n. 39 (8). Questo metodo di prova non è specificamente destinato a testare materiali speciali come le materie isometriche o fibrose poco solubili o i nanomateriali di sintesi.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Prima di eseguire una prova in base a questo metodo, il laboratorio deve considerare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, ivi compresi gli studi esistenti i cui risultati concorrano ad escludere la necessità di ulteriori prove, al fine di ricorrere il meno possibile all'impiego di animali. Tra le informazioni utili per la scelta della specie, del ceppo, del sesso, della modalità di esposizione e delle concentrazioni più adeguati, rientrano l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, l'impiego o gli impieghi previsti e potenziali per l'esposizione umana, dati (Q)SAR e dati tossicologici disponibili in merito alle sostanze chimiche di struttura affine. Non si deve utilizzare il presente metodo per saggiare concentrazioni che si prevede provochino dolore e sofferenza gravi a causa di proprietà corrosive [1] o fortemente irritanti (cfr. documento di orientamento n. 39) (8).

[1] La valutazione della corrosività può fondarsi sul parere di esperti che tenga conto di dati sperimentali sull'uomo e su animali, dati (in vitro) esistenti (ad esempio capitolo B.40 (10) e B.40 *bis* (11) del presente allegato, oppure linea guida OCSE n. 435 (12), valori del pH, informazioni concernenti sostanze simili od ogni altro dato pertinente.

▼M4

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Mediante un procedimento articolato in fasi successive che prevede un periodo di esposizione di 4 ore alla sostanza in esame, si ricavano informazioni sulla sua tossicità acuta per inalazione sufficienti a consentirne la classificazione. La durata dell'esposizione può essere diversa se necessario a fini di legge. In ciascuna fase di prova di una concentrazione prestabilita sono utilizzati 3 animali dello stesso sesso. In unzione del numero di animali morti e/o moribondi, possono bastare 2 fasi per valutare la tossicità acuta della sostanza in esame. Se uno dei due sessi è più sensibile dell'altro, si può proseguire la prova solo con gli animali del sesso più sensibile. L'esito di una fase determina come proseguire nella fase successiva, nei seguenti termini:

a) non occorrono altre prove;

b) si sottopongono alla prova 3 animali di ciascun sesso; oppure

c) si sottopongono alla prova 6 animali solo del sesso più sensibile, ossia il limite inferiore della classe di tossicità deve essere determinato in base a prove con 6 animali per gruppo di concentrazione in esame, indipendentemente dal sesso.

7. Gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e, ai fini dell'interpretazione dei risultati della prova, sono considerati alla stregua di animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito all'eutanasia degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto del documento di orientamento n. 19 (7), che contiene anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

8. Si devono utilizzare animali adulti, giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La specie preferita è il ratto. Occorre motivare l'eventuale scelta di un'altra specie.

Preparazione degli animali

9. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Il giorno dell'esposizione, gli animali selezionati devono essere giovani adulti di età compresa tra 8 e 12 settimane, il cui peso corporeo non eccede ± 20 % del peso medio, per ciascun sesso, degli animali della stessa età precedentemente esposti. Gli animali sono scelti a caso e marcati individualmente per poterli identificare. Affinché si acclimatino alle condizioni di laboratorio, devono essere lasciati nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova e, poco prima della prova, vanno anche acclimatati alle apparecchiature utilizzate per le prove, per attenuare la tensione causata dal nuovo ambiente.

Allevamento degli animali

10. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ± 3 °C. L'umidità relativa va idealmente mantenuta tra 30 % e 70 %, anche se ciò potrebbe non essere possibile quando si utilizza l'acqua come veicolo. Prima e dopo l'esposizione, gli animali sono generalmente tenuti in gabbia, suddivisi per sesso e concentrazione, ma il numero di animali per gabbia non deve interferire con un'agevole osservazione di ogni singolo animale e deve ridurre al minimo le perdite dovute a cannibalismo e combattimenti. Se l'esposizione avviene unicamente per via nasale, potrebbe essere necessario abituarli ai dispositivi di contenzione, che non dovrebbero provocare agli animali eccessivi stress fisici, termici o dinamici. La contenzione può incidere sui parametri fisiologici, come la temperatura corporea (ipertermia) e/o il volume respiratorio

▼M4

al minuto. Se si dispone di dati generici che dimostrano che nessuna di queste alterazioni avviene a un livello apprezzabile, il periodo di acclimatamento ai dispositivi di contenzione non è necessario. Gli animali esposti «a corpo intero» ad un aerosol devono essere stabulati separatamente per la durata dell'esposizione per evitare che l'aerosol filtri attraverso il pelo degli altri animali presenti nella gabbia. Salvo nei periodi di esposizione, gli animali possono essere nutriti in base a diete convenzionali e certificate da laboratorio, accompagnate da acqua potabile a volontà. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità.

Camere di inalazione

11. La scelta della camera di inalazione dipende dalla natura della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Il metodo preferito di esposizione è quello per via nasale (con cui s'intende l'esposizione unicamente della testa, del naso o del muso). Di norma si predilige l'esposizione per via nasale per gli studi di aerosol liquidi o solidi e di vapori che si possono condensare sotto forma di aerosol. L'esposizione del corpo intero può essere più indicata per conseguire obiettivi di studio particolari, ma tale scelta deve essere giustificata nella relazione sullo studio. Per garantire la stabilità atmosferica di una camera di esposizione del corpo intero, il volume complessivo degli animali sottoposti alla prova non deve superare il 5 % del volume della camera. Il documento orientativo 39 (8) descrive i principi delle tecniche di esposizione del corpo intero e per sola via nasale, nonché i relativi vantaggi e svantaggi.

CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Somministrazione delle concentrazioni

12. Si raccomanda un'esposizione della durata fissa di quattro ore, escludendo il tempo di equilibrazione. Per esigenze specifiche può essere necessario ricorrere ad altri tempi di esposizione, nel qual caso occorre fornire una giustificazione nella relazione sullo studio (cfr. documento di orientamento n. 39) (8). Gli animali esposti in camere «a corpo intero» devono essere stabulati individualmente per evitare che gli animali coabitanti ingeriscano la sostanza in esame pulendosi reciprocamente il mantello. Durante il periodo di esposizione l'alimentazione va sospesa. Nel corso dell'esposizione «a corpo intero» si può continuare a somministrare acqua.

13. Gli animali sono esposti alla sostanza in esame sotto forma di gas, vapore, aerosol o una loro miscela. Lo stato fisico da saggiare dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, dalla concentrazione prescelta e/o dalla forma fisica nella quale è più probabile che essa si presenti nel corso della sua manipolazione e del suo utilizzo. Le sostanze igroscopiche e reattive dal punto di vista chimico devono essere saggiate in atmosfera secca. Prestare attenzione ad evitare concentrazioni esplosive.

Distribuzione granulometrica

14. La granulometria deve essere effettuata per tutti gli aerosol e i vapori che potrebbero condensarsi e formare aerosol. Per consentire l'esposizione di tutte le zone pertinenti delle vie respiratorie, si raccomanda di utilizzare aerosol con diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) da 1 a 4 μm con una deviazione standard geometrica (σ_g) compresa tra 1,5 e 3,0 (8) (13) (14). Occorre fare quanto possibile per rispettare queste condizioni, ma qualora non ci si riuscisse è necessario presentare il parere di un esperto. Ad esempio, le particelle dei fumi metallici possono essere più piccole del limite inferiore sopraindicato, e le particelle caricate, le fibre e il materiale igroscopico (le cui dimensioni aumentano nell'ambiente umido delle vie respiratorie) possono oltrepassare il limite superiore.

▼M4

Preparazione della sostanza in esame in un veicolo

15. Per ottenere la concentrazione e la granulometria adeguate della sostanza in esame nell'atmosfera si può utilizzare un veicolo. Di norma è preferibile utilizzare l'acqua. Per ottenere la distribuzione granulometrica desiderata il materiale particellato può essere sottoposto a processi meccanici, avendo però cura di non decomporre o alterare la sostanza in esame. Se si ritiene che i processi meccanici abbiano provocato alterazioni (ad esempio, a causa delle alte temperature generate dalla frizione durante una macinazione eccessiva), si deve analizzare la composizione chimica della sostanza in esame. Prestare particolare attenzione a non contaminare la sostanza in esame. Non è necessario saggiare le sostanze granulari non friabili, appositamente concepite per non poter essere inalate. Per dimostrare che la manipolazione del materiale granulare non produce particelle respirabili, effettuare una prova di logorio per attrito. Se questa produce particelle respirabili, effettuare una prova di tossicità per inalazione.

Animali di controllo

16. Non è necessario un gruppo di controllo negativo (aria) in parallelo. Se per produrre l'atmosfera di prova si utilizza un veicolo diverso dall'acqua, è necessario allestire un gruppo di controllo del veicolo solo se non si dispone di dati storici sulla tossicità. Se lo studio di tossicità di una sostanza in esame incorporata in un veicolo non rivela alcuna tossicità, significa che il veicolo non è tossico alla concentrazione saggiata e pertanto non è necessario allestire un gruppo di controllo del veicolo.

MONITORAGGIO DELLE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Flusso d'aria nella camera di esposizione

17. Durante ogni esposizione è necessario regolare attentamente, monitorare in continuo e registrare almeno una volta l'ora il flusso d'aria nella camera. Il monitoraggio della concentrazione (o stabilità) dell'atmosfera di prova costituisce una misura permanente di tutti i parametri dinamici e un modo indiretto di controllare tutti quelli che regolano la produzione dell'atmosfera di prova. Si farà il possibile, nelle camere d'esposizione unicamente per via nasale, per evitare la reinalazione qualora il flusso d'aria attraverso il sistema di esposizione non sia in grado di produrre una circolazione dinamica dell'atmosfera che contiene la sostanza in esame. Esistono metodologie specifiche a cui si può ricorrere per dimostrare l'assenza di reinalazione nelle condizioni sperimentali prescelte (8) (15). La concentrazione di ossigeno deve essere pari ad almeno il 19 % e la concentrazione di biossido di carbonio non deve superare l'1 %. Qualora si ritenga di non rispettare queste concentrazioni, è necessario misurarle.

Temperatura e umidità relativa della camera

18. La temperatura della camera deve essere mantenuta a 22 ± 3 °C. Sia nel caso delle esposizioni unicamente per via nasale che per le esposizioni del corpo intero, l'umidità relativa nella zona in cui respira l'animale è monitorata e registrata almeno tre volte per le prove che durano fino a 4 ore, oppure una volta l'ora per le prove più brevi. L'umidità relativa dovrebbe idealmente essere mantenuta tra 30 % e 70 % ma può accadere che questi valori non siano raggiungibili (ad esempio, quando si studiano miscele acquose) o che non possa essere misurata per via delle interferenze della sostanza con il metodo di prova.

▼M4

Concentrazione nominale della sostanza chimica in esame

19. Laddove possibile, si deve calcolare e registrare la concentrazione nominale nella camera di esposizione. La concentrazione nominale è data dalla divisione della massa della sostanza in esame generata per il volume totale di aria circolata nella camera. La concentrazione nominale non serve a caratterizzare l'esposizione degli animali, ma un confronto tra la concentrazione nominale e la concentrazione reale dà un'indicazione dell'efficacia del sistema di prova quanto alla sua capacità di generazione e può essere utile per individuare eventuali problemi a questo livello.

Concentrazione reale della sostanza chimica in esame

20. La concentrazione reale è la concentrazione della sostanza in esame nella zona della camera di inalazione in cui gli animali respirano. Le concentrazioni reali possono essere determinate con metodi specifici (ad esempio campionamento diretto, metodi di adsorbimento o di reazione chimica, e successiva caratterizzazione analitica) o con metodi non specifici, come l'analisi gravimetrica mediante filtrazione. Il ricorso all'analisi gravimetrica è ammissibile solo per gli aerosol di polveri che contengono un unico componente o per gli aerosol di liquidi poco volatili e deve fondarsi su opportune caratterizzazioni specifiche della sostanza in esame effettuate prima dello studio in corso. È possibile ricorrere all'analisi gravimetrica anche per determinare la concentrazione di un aerosol di polveri con vari componenti, ma in tal caso sono necessari dati analitici che dimostrino che la composizione del prodotto in sospensione nell'aria è analoga a quella del prodotto di partenza. In assenza di questi dati, può essere necessario rianalizzare periodicamente la sostanza in esame (idealmente in sospensione nell'aria) durante lo studio. Per gli agenti aerosolizzati che possono evaporare o sublimarsi, occorre dimostrare che tutte le fasi sono state raccolte con il metodo prescelto. Le concentrazioni bersaglio, nominali e reali devono essere riportate nella relazione, ma nell'analisi statistica per calcolare i valori delle concentrazioni letali sono utilizzate solo le concentrazioni reali.

21. Si utilizza, se possibile, un unico lotto della sostanza in esame e il campione allo studio va conservato in condizioni che ne mantengano la purezza, l'omogeneità e la stabilità. Prima di iniziare lo studio, occorre caratterizzare la sostanza in esame, valutandone anche la purezza e, se tecnicamente fattibile, l'identità e le quantità dei contaminanti e delle impurità individuati. A tal fine occorre conoscere quanto meno i dati seguenti: tempo di ritenzione e relativa area del picco, peso molecolare risultante dalla spettroscopia di massa o dalla gascromatografia, oppure altre stime. Il laboratorio che effettua la prova non è responsabile dell'identità del campione in esame, tuttavia, per precauzione, è consigliabile che confermi almeno una parte delle caratteristiche fornite dallo sponsor (colore, natura fisica ecc.).

22. L'atmosfera di esposizione è mantenuta il più costante possibile e monitorata in continuo e/o in modo intermittente secondo il metodo di analisi. Quando si procede ad un campionamento intermittente, in uno studio di quattro ore si devono raccogliere campioni dell'atmosfera della camera almeno due volte. Se ciò non è possibile, per via di limitazioni inerenti al flusso d'aria o delle basse concentrazioni, è possibile prelevare un solo campione nell'intero periodo di esposizione. Se si osservano evidenti fluttuazioni da un campione all'altro, per le concentrazioni successive si devono prelevare quattro campioni per esposizione. La concentrazione dei singoli campioni prelevati nella camera non deve deviare dalla concentrazione media della camera più del ± 10 %, nel caso di gas e vapori, o ± 20 % nel caso degli aerosol liquidi o solidi. Occorre calcolare e prender nota del tempo necessario affinché la camera di esposizione raggiunga l'equilibrio (t_{95}). La durata di un'esposizione corrisponde al tempo in cui la sostanza in esame viene generata, ivi compreso il tempo necessario per raggiungere t_{95}. Il documento di orientamento n. 39 (8) contiene indicazioni per la stima di t_{95}.

▼M4

23. Per miscele molto complesse costituite da gas o vapori e da aerosol (ad esempio, atmosfere di combustione e sostanze chimiche generate per propulsione da appositi prodotti/dispositivi finali), ogni fase può comportarsi diversamente nella camera di inalazione. Per ciascuna fase (gas/vapore e aerosol) occorre pertanto scegliere almeno una sostanza indicatrice (analita), normalmente il principio attivo principale della miscela. Quando la sostanza chimica in esame è una miscela, nella relazione dovrà essere indicata la concentrazione analitica corrispondente alla miscela e non solo quella del principio attivo o del componente in esame (analita). Informazioni aggiuntive sulle concentrazioni effettive sono reperibili nel documento di orientamento n. 39 (8).

Granulometria della sostanza chimica in esame

24. La distribuzione granulometrica degli aerosol deve essere determinata almeno due volte nel corso di ciascuna esposizione di 4 ore, utilizzando un impattore a cascata o un altro strumento, come uno spettrometro per la misura delle dimensioni aerodinamiche delle particelle. Se i risultati ottenuti con l'impattore a cascata e con l'altro strumento risultano equivalenti, quest'ultimo può essere utilizzato nel corso dell'intero studio. Per confermare l'efficienza di estrazione dello strumento principale, occorre utilizzare parallelamente un secondo strumento, come un filtro gravimetrico o un impinger/gorgogliatore. La concentrazione massica ottenuta dall'analisi granulometrica deve avvicinarsi, con scarti ragionevoli, a quella ottenuta con l'analisi su filtri [cfr. documento di orientamento n. 39 (8)]. Se questa equivalenza viene stabilita nella fase iniziale dello studio, non è necessario effettuare ulteriori misure di conferma. Per il benessere degli animali occorre ridurre il più possibile i dati non conclusivi che potrebbero comportare la necessità di ripetere un'esposizione. È necessario effettuare un'analisi granulometrica nel caso di vapori che rischiano di condensarsi e formare aerosol o se si rilevano particelle in un'atmosfera di vapori che si presume possano formare fasi miste (cfr. paragrafo 14).

PROCEDURA

Prova principale

25. In ogni fase si utilizzano tre animali di ciascun sesso, oppure sei animali del sesso più sensibile. Se per l'esposizione solo per via nasale s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è possibile adeguare la durata massima d'esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. Come dose iniziale si sceglie quella tra le quattro concentrazioni fisse che ha la maggior probabilità di produrre effetti tossici in alcuni degli animali esposti. Gli schemi di prova per i gas, i vapori e gli aerosol (che figurano nelle appendici da 2 a 4) rappresentano il procedimento da seguire in funzione dei valori limite delle categorie CLP da 1a 4 (9) stabilite per i gas (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), per i vapori (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (appendice 3) e per gli aerosol (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (appendice 4). La categoria 5, che non è prevista dal regolamento (CE) n. 1272/2008 (regolamento CLP) (9) si riferisce alle concentrazioni al di sopra del relativo limite. Ad ogni concentrazione iniziale si applica lo schema di prova corrispondente. Il modus operandi consiste nel seguire le frecce indicate negli schemi in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente, fino a poter stabilire una categoria.

26. L'intervallo di tempo tra l'esposizione dei vari gruppi è determinato dalla comparsa, dalla durata e dalla gravità dei segni di tossicità rilevati. Si espongono animali al livello di concentrazione superiore solo quando si ha la ragionevole certezza che i precedenti animali esposti sono sopravvissuti. Si consiglia di far trascorrere tre o quattro giorni tra le esposizioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non conclusive.

▼M4

Prova limite

27. Un prova limite viene effettuata quando si sa per certo o si prevede che la sostanza in esame è praticamente non tossica, ossia che determinerà una reazione di tossicità solo al di sopra della concentrazione limite autorizzata. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da prove già realizzate con sostanze o miscele simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame sono scarse o nulle, o se ci si attende che sia tossica, è necessario eseguire la prova principale (per ulteriori indicazioni, cfr. documento di orientamento n. 39) (8).

28. Seguendo il procedimento normale, la prova limite del presente metodo di prova consiste nell'esporre tre animali di ciascun sesso, o sei animali del sesso più sensibile, alle concentrazioni di 20 000 ppm per i gas, 20 mg/l per i vapori e 5 mg/l per le polveri/nebbie, se raggiungibili. Per le prove con aerosol, l'obiettivo principale è ottenere particelle di dimensioni respirabili (ossia DAMM da 1 a 4 μm), il che è possibile con la maggior parte delle sostanze testate a una concentrazione di 2 mg/l. Le prove con aerosol a concentrazioni superiori a 2 mg/l sono eseguite solo se si è riusciti a generare particelle di dimensioni respirabili (cfr. documento di orientamento n. 39) (8). Per ragioni legate al benessere degli animali, il sistema GHS (16) sconsiglia di testare concentrazioni superiori alla concentrazione limite. Per quanto concerne la sperimentazione in relazione alla categoria 5 del sistema GHS (16), non prevista dal regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), va considerata solo se è altamente probabile che i risultati abbiano una pertinenza diretta con la protezione della salute umana e occorre darne giustificazione nella relazione. Nel caso di sostanze potenzialmente esplosive si devono adottare precauzioni per evitare condizioni che favoriscano un'esplosione. Per evitare il ricorso inutile ad animali, occorre effettuare una prova senza animali prima della prova limite, per accertarsi che sia possibile ottenere le condizioni per quest'ultima nella camera.

OSSERVAZIONI

29. Durante il periodo di esposizione è necessario eseguire frequenti esami clinici degli animali. Dopo l'esposizione, l'esame clinico va effettuato almeno due volte il giorno stesso dell'esposizione, o più spesso a seconda della risposta degli animali al trattamento, e almeno una volta al giorno nei successivi 14 giorni. Il periodo di osservazione non ha durata fissa, in quanto dipende dalla natura dei segni clinici, dal momento della loro comparsa e dalla durata del periodo di recupero. Un elemento importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun animale. Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia, per ragioni legate al loro benessere. Occorre fare attenzione, quando si effettua l'esame clinico alla ricerca di segni di tossicità, a non confondere un cattivo aspetto iniziale e alterazioni respiratorie passeggere, imputabili al procedimento di esposizione, con gli effetti dell'esposizione vera e propria. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento di orientamento OCSE citato in bibliografia al punto (7). Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

▼M4

30. Si osserveranno eventuali alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Si annoterà, laddove possibile, l'eventuale differenziazione tra gli effetti locali e sistemici. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. La misura della temperatura rettale può corroborare una bradipnea riflessa o un'ipo/ipertermia causate dall'esposizione o dalla reclusione.

Peso corporeo

31. Il peso di ciascun animale è rilevato e annotato una volta durante il periodo di acclimatazione, il giorno dell'esposizione, prima che questa abbia inizio (giorno 0), e almeno nei giorni 1, 3 e 7 (e successivamente una volta la settimana), così come al momento del decesso o dell'eutanasia, se posteriore al giorno 1. Il peso corporeo è manifestamente uno dei primi indici di tossicità e gli animali che mostrano un calo ponderale $\geq$ 20 % rispetto al peso anteriore allo studio devono essere osservati attentamente. Alla fine del periodo post esposizione si pesano e si sottopongono a eutanasia gli animali sopravvissuti.

Patologia

32. Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso della prova o che sono sottoposti a eutanasia e ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Se non è possibile eseguire la necroscopia subito dopo il rilevamento del decesso, l'animale deve essere refrigerato (non congelato) ad una temperatura sufficientemente bassa da rallentare l'autolisi. La necroscopia va effettuata il più rapidamente possibile, di norma entro uno o due giorni dal decesso, annotando per ogni animale tutte le alterazioni patologiche macroscopiche, con particolare attenzione a quelle delle vie respiratorie.

33. È possibile effettuare altri esami previamente inclusi nel disegno sperimentale, per ampliare il valore interpretativo dello studio, quali, ad esempio, la determinazione del peso polmonare nei ratti sopravvissuti e/o la ricerca, per esame microscopico, di irritazioni delle vie respiratorie. Si possono anche esaminare gli organi che mostrano macropatologie negli animali che sopravvivono più di 24 ore, così come gli organi di cui si ha la certezza o il sospetto che siano stati colpiti. L'esame microscopico dell'intero apparato respiratorio può fornire informazioni utili sulle sostanze in esame che reagiscono con l'acqua, come gli acidi e le sostanze chimiche igroscopiche.

DATI E RELAZIONE

Dati

34. Si devono indicare il peso corporeo e i risultati della necroscopia per ciascun animale. I dati degli esami clinici devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo sottoposto alla prova, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni specifici di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e l'esito della necroscopia.

▼M4

Relazione sulla prova

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Animali sperimentali e condizioni di allevamento:

— descrizione delle condizioni di stabulazione, tra cui: numero (o modifica del numero) di animali per gabbia, materiale utilizzato per la lettiera, temperatura ambiente e umidità relativa, fotoperiodo e dieta,

— specie/ceppo utilizzati e giustificazione dell'impiego di specie diverse dal ratto,

— numero, età e sesso degli animali,

— metodo di randomizzazione,

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta e origine dell'acqua),

— descrizione dell'eventuale condizionamento prima della prova, in particolare per quanto concerne dieta, quarantena e terapie.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche pertinenti (compresa l'isomerizzazione),

— dati di identificazione e numero CAS, se noto.

Veicolo:

— motivazione dell'utilizzo di un veicolo e giustificazione della scelta del veicolo utilizzato (se diverso dall'acqua),

— dati storici o paralleli che dimostrano che il veicolo non interferisce con i risultati dello studio.

Camera di inalazione:

— descrizione della camera di inalazione, che includa le dimensioni e il volume,

— provenienza e descrizione delle apparecchiature utilizzate per l'esposizione degli animali e per la generazione dell'atmosfera,

— apparecchi di misurazione della temperatura, dell'umidità, della granulometria e della concentrazione reale,

— fonte dell'aria, trattamento dell'aria immessa/estratta e sistema di climatizzazione utilizzato,

— metodi utilizzati per tarare l'apparecchiatura al fine di garantire l'omogeneità dell'atmosfera di prova,

— differenza di pressione (positiva o negativa),

— bocchette di esposizione per camera (unicamente via nasale); ubicazione degli animali nel sistema (camera di esposizione «a corpo intero»),

— omogeneità/stabilità nel tempo dell'atmosfera di prova,

— ubicazione dei sensori termometrici e igrometrici e dei punti di campionamento dell'atmosfera di prova nella camera,

— velocità del flusso d'aria, velocità del flusso d'aria in ogni bocchetta di esposizione («a naso solo») o rapporto tra il volume occupato dagli animali e il volume della camera («a corpo intero»),

— informazioni sull'apparecchiatura utilizzata per misurare l'ossigeno e il diossido di carbonio, se applicabile,

▼M4

— tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera (t_{95}),

— numero di cambi di volume per ora,

— dosatori (se applicabile).

Dati sull'esposizione:

— giustificazione della scelta della concentrazione bersaglio dello studio principale,

— concentrazioni nominali (ottenute dividendo la massa della sostanza in esame immessa nella camera d'inalazione per il volume dell'aria fatta circolare nella camera),

— concentrazioni reali ottenute nella zona in cui respirano gli animali; per le miscele in esame che producono forme fisiche eterogenee (gas, vapori, aerosol), si può analizzare separatamente ciascuna di esse,

— esprimere le concentrazioni atmosferiche in unità di massa (ad esempio, mg/l, mg/m^3 ecc.), indicando facoltativamente tra parentesi le unità di volume (ad esempio, ppm, ppb),

— distribuzione granulometrica, diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (σ_g), con relativi metodi di calcolo. Devono essere indicate anche le singole analisi granulometriche.

Condizioni sperimentali:

— ragguagli sulla preparazione della sostanza chimica in esame, precisando le eventuali procedure impiegate per ridurre la granulometria delle sostanze solide o per preparare soluzioni della sostanza in esame. Qualora i processi meccanici abbiano alterato la composizione della sostanza, includere i risultati delle analisi eseguite per verificare la composizione,

— descrizione (di preferenza corredata di uno schema) dell'apparecchiatura utilizzata per generare l'atmosfera sperimentale e per esporvi gli animali,

— ragguagli sul metodo d'analisi chimica impiegato e sulla validazione di tale metodo (specificando l'efficienza di recupero della sostanza in esame dal mezzo campionato),

— giustificazione della scelta delle concentrazioni sperimentali.

Risultati:

— tabella con la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera,

— tabella con le concentrazioni nominali e reali nella camera,

— tabella con i dati granulometrici, ivi compresi i dati analitici sul campionamento, sulla distribuzione granulometrica e i calcoli del DAMM e della σ_g,

— tabella con risposta e livello di concentrazione per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa, natura, gravità e durata degli effetti),

— peso corporeo di ciascun animale registrato nei giorni in cui si è svolto lo studio, precisando la data e l'ora del decesso, se anteriore all'eutanasia programmata; momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale,

▼M4

— reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale,

— categoria nel sistema CLP e valore limite della CL_{50}.

Discussione e interpretazione dei risultati:

— dare particolare importanza alla descrizione dei metodi impiegati per soddisfare i criteri del presente metodo di prova, ad esempio per quanto concerne la concentrazione limite o la granulometria,

— esaminare la respirabilità delle particelle alla luce dei risultati complessivi, in special modo se i criteri granulometrici non sono stati soddisfatti,

— tenere conto, nella valutazione globale dello studio, della coerenza dei metodi utilizzati per determinare le concentrazioni nominali e reali e considerare il rapporto tra di esse,

— considerare la causa probabile di decesso e il meccanismo d'azione prevalente (sistemico o locale),

— spiegare perché è stato necessario sottoporre ad eutanasia animali che manifestavano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente, in base ai criteri illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE citato in bibliografia al punto (7).

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo B.2 del presente allegato, Tossicità acuta per inalazione.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Capitolo B.1 *ter* del presente allegato, Tossicità acuta orale — Metodo della classe di tossicità acuta.

(6) OCSE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OCSE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(9) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼**M4**

(10) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test di resistenza elettrica transcutanea (TER).

(11) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana.

(12) OCSE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Appl. Toxicol. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) ONU (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibile all'indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ ghs/ghs_welcome_e.html

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼M4

Appendice 2

Procedimento da seguire per i gas in funzione della concentrazione iniziale (ppm/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 2a: concentrazione iniziale di 100 ppm

Appendice 2b: concentrazione iniziale di 500 ppm

Appendice 2c: concentrazione iniziale di 2 500 ppm

Appendice 2d: concentrazione iniziale di 20 000 ppm

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

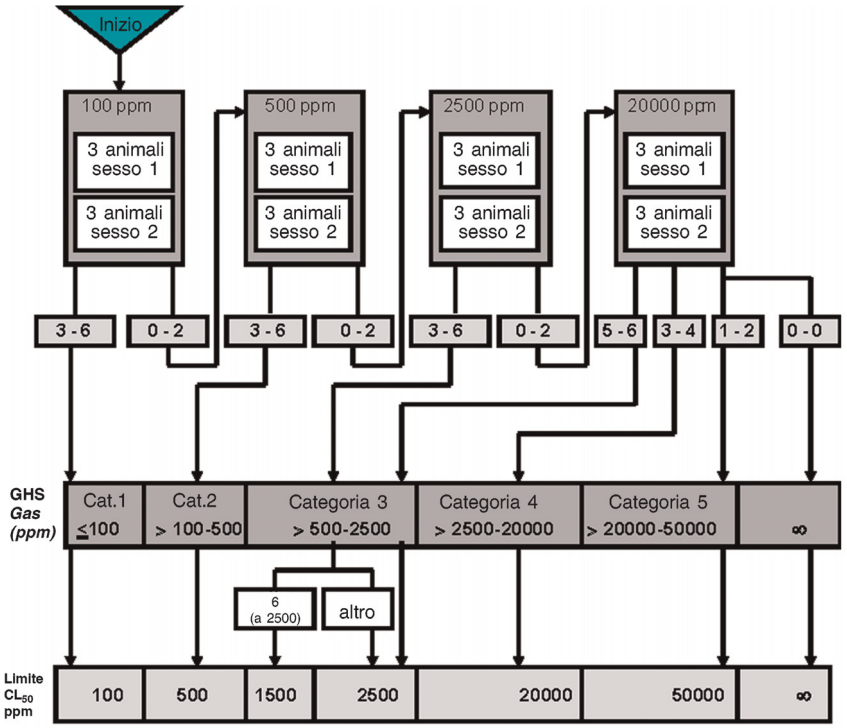
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 2a

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 100 ppm/4 h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

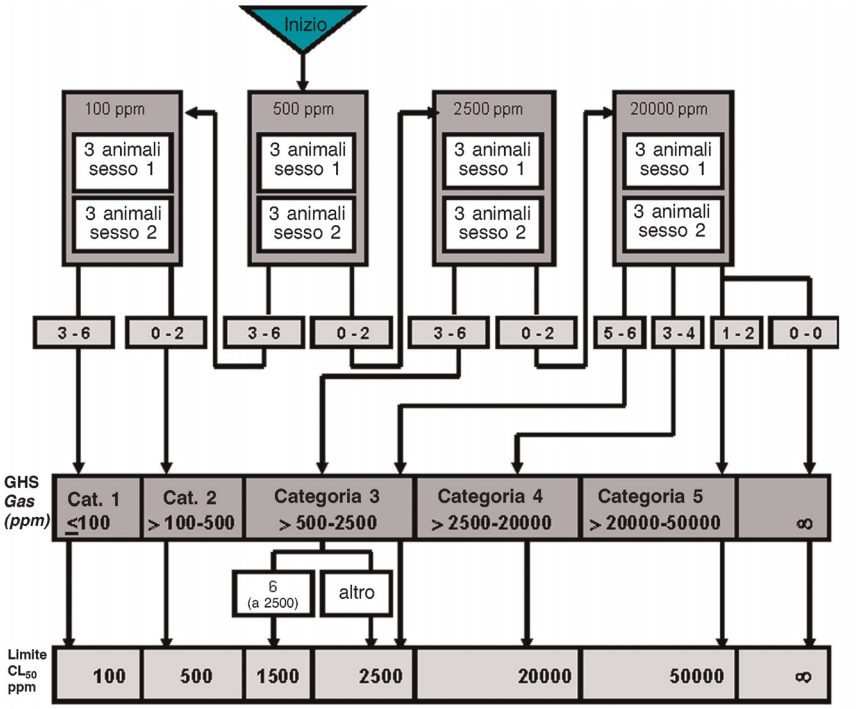
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2b

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 500 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

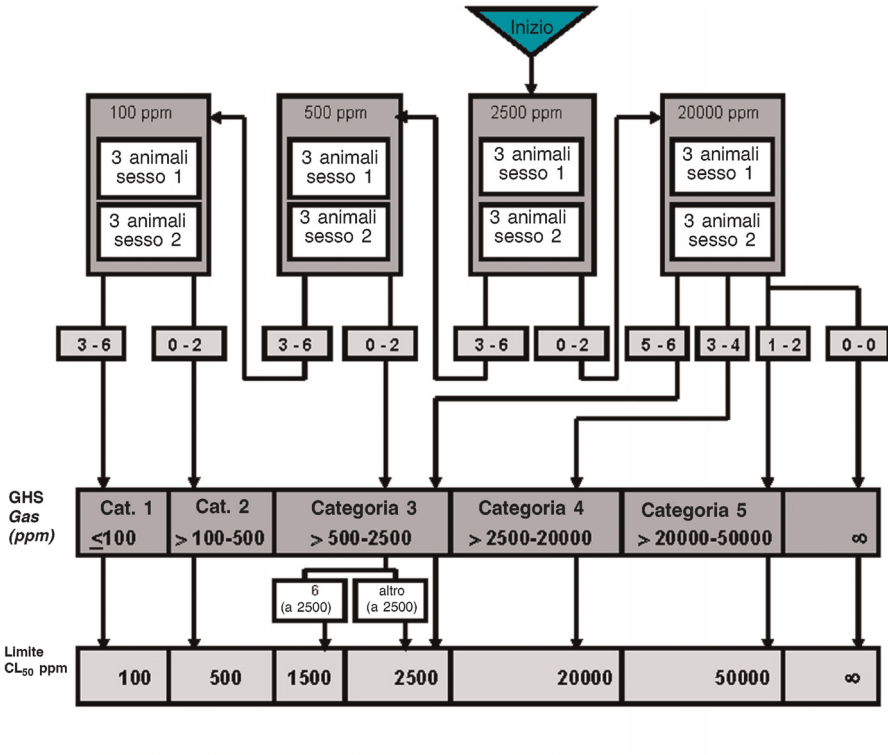
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2c

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 2 500 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

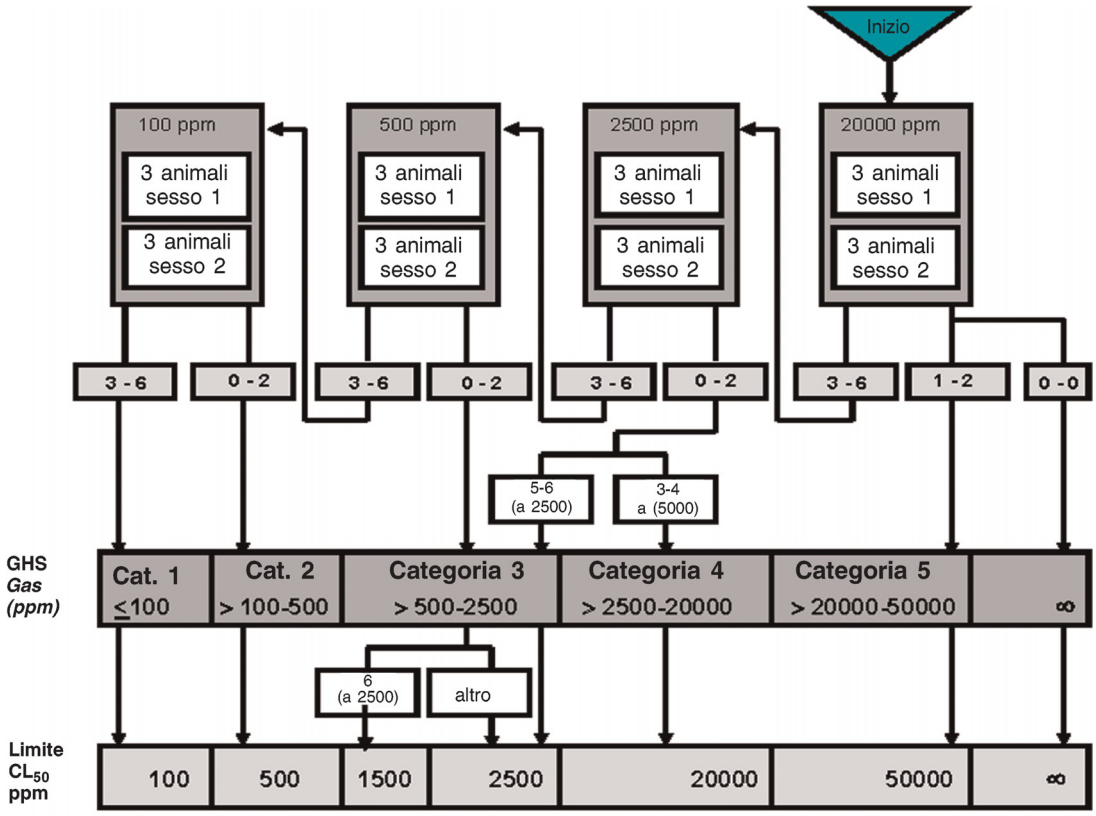
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2d

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 20 000 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3

Procedimento da seguire per i vapori in funzione della concentrazione iniziale (mg/l/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 3a: concentrazione iniziale 0,5 mg/l

Appendice 3b: concentrazione iniziale 2,0 mg/l

Appendice 3c: concentrazione iniziale 10 mg/l

Appendice 3d: concentrazione iniziale 20 mg/l

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

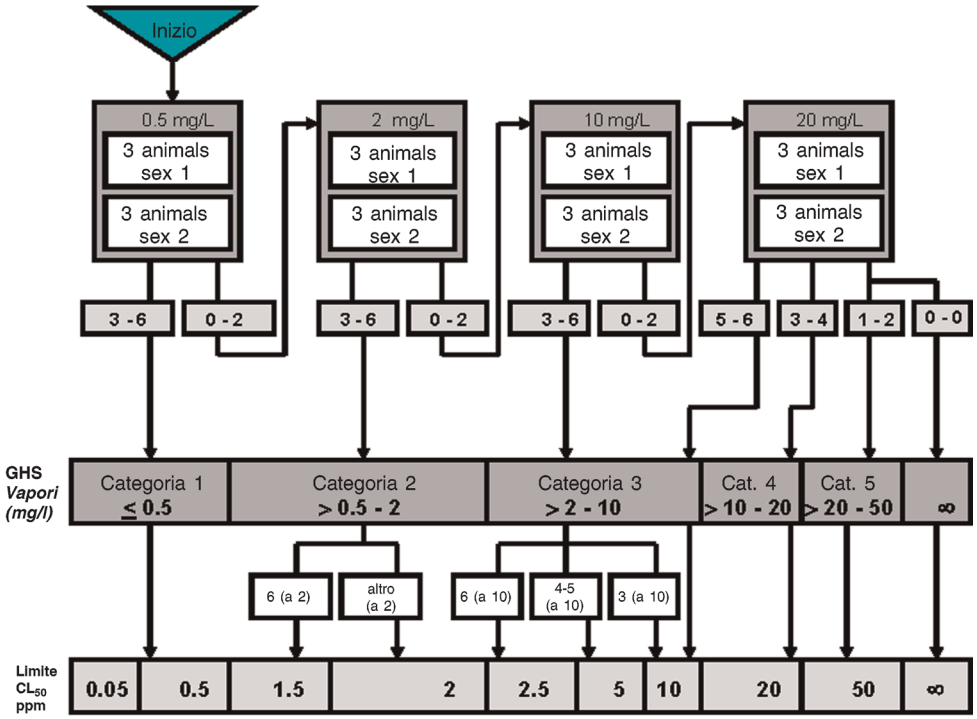
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 3a

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0,5 mg/L/4h per i vapori



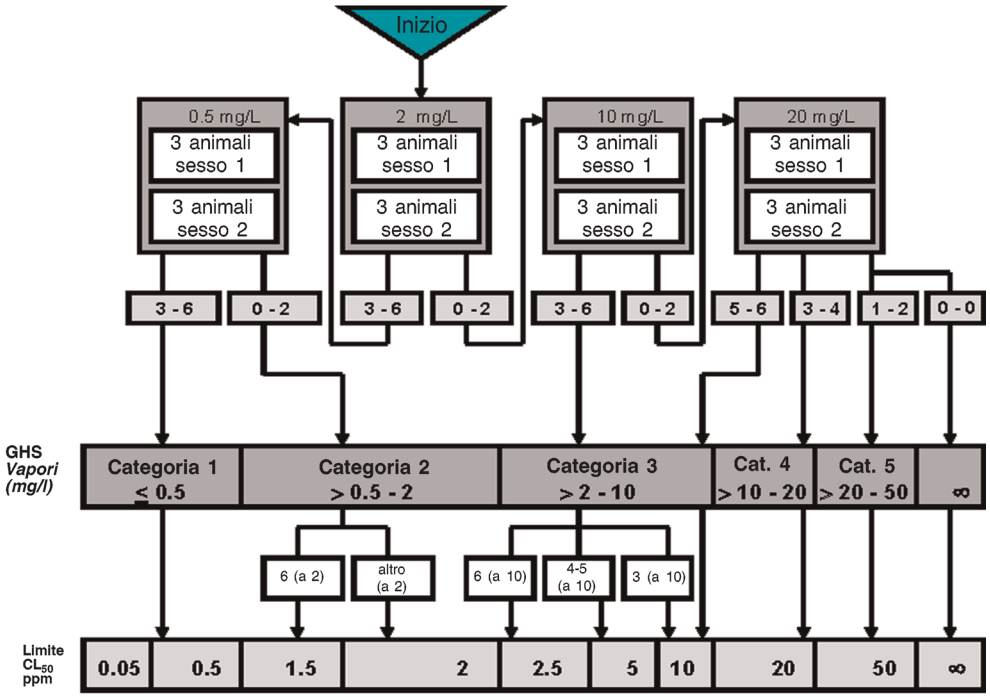
- 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
- 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
- GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
- ∞: senza classificazione
- Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3b

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 2 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

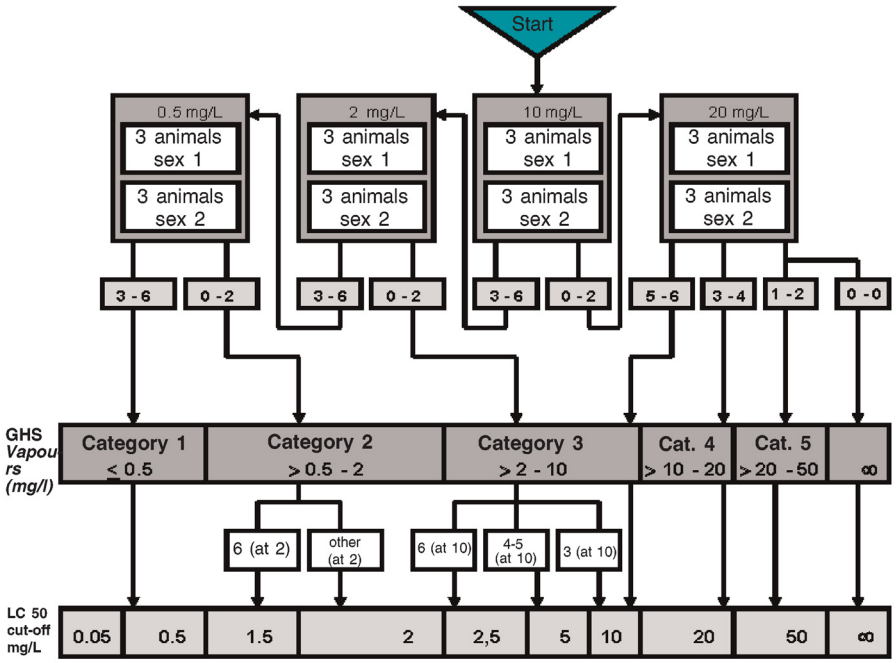
— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3c

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 10 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

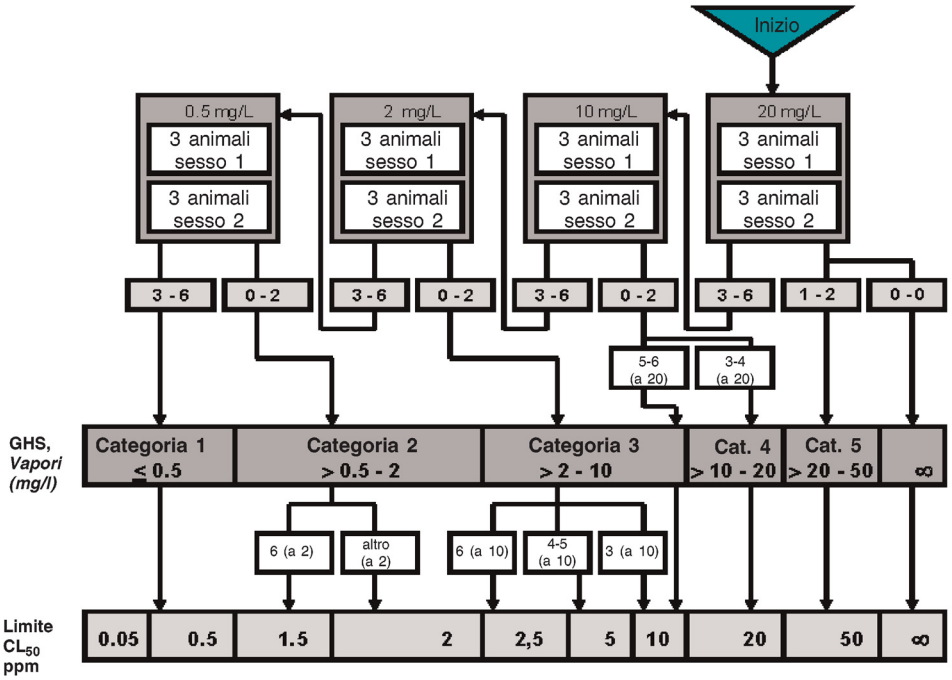
— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3d

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 20 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4

Procedimento da seguire per gli aerosol in funzione della concentrazione iniziale (mg/l/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 4a: concentrazione iniziale 0,05 mg/l

Appendice 4b: concentrazione iniziale 0,5 mg/l

Appendice 4c: concentrazione iniziale 1 mg/l

Appendice 4d: concentrazione iniziale 5 mg/l

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

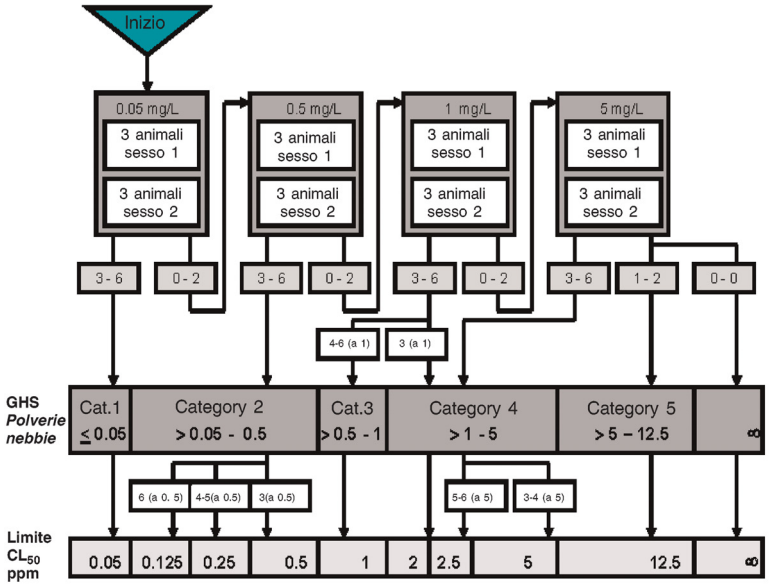
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 4a

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0.05 mg/L/4h per i vapori



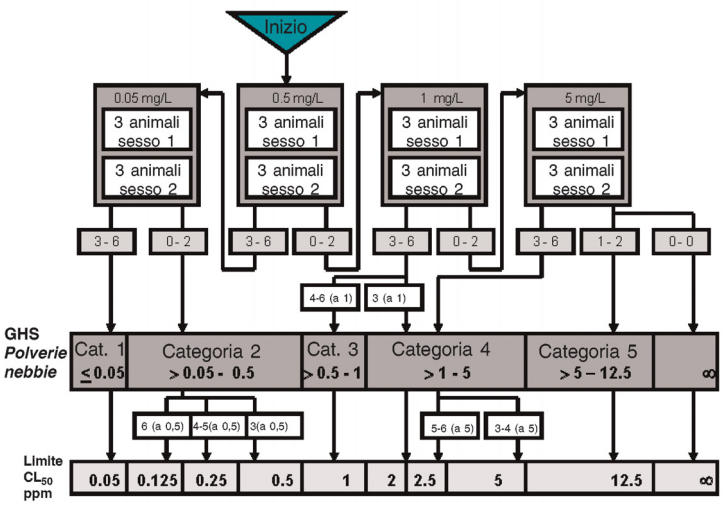
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4b

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0,5 mg/L/4h per gli aerosol



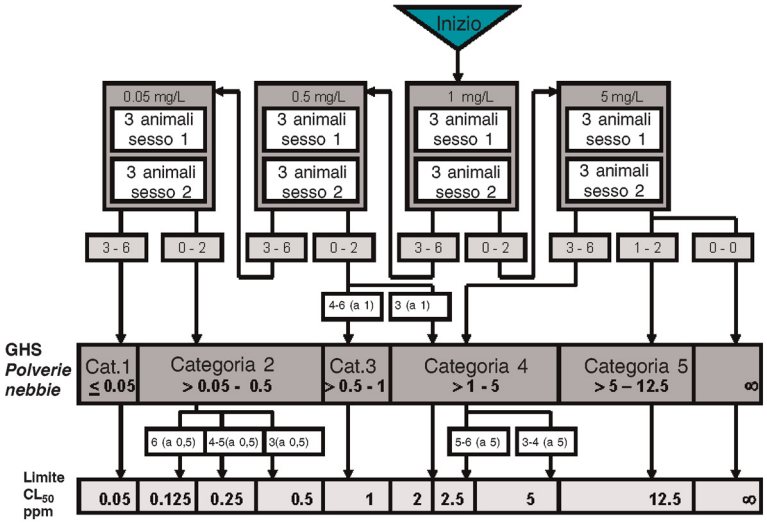
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4c

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 1 mg/L/4h per gli aerosol



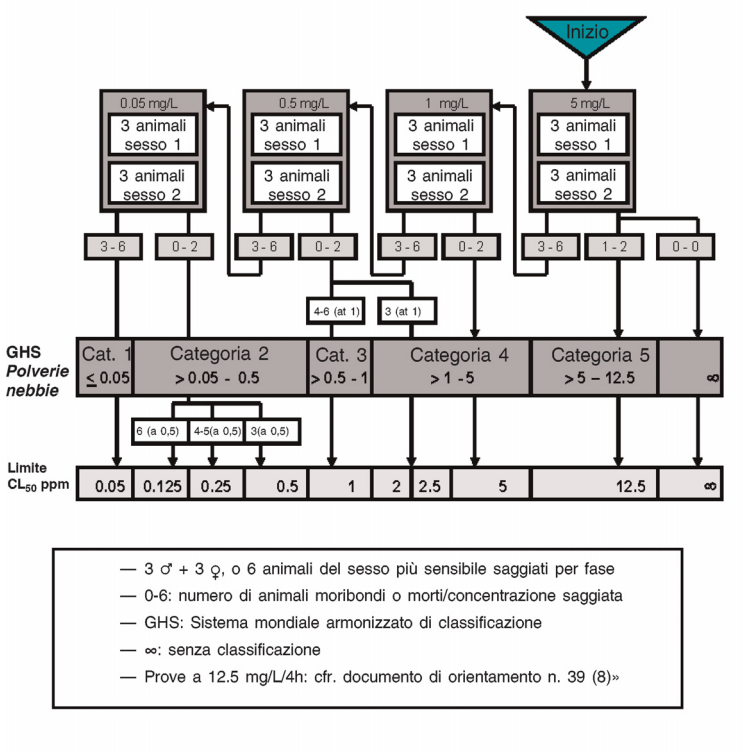
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4d

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 5 mg/L/4h per gli aerosol



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)»

▼B

PARTE C: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ECOTOSSICITÀ

INDICE

C.1. TOSSICITÀ ACUTA PER I PESCI

C.2. SAGGIO DI IMMOBILIZZAZIONE ACUTA IN *DAPHNIA SP*

C.3. ALGHE DI ACQUA DOLCE E CIANOBATTERI, SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA

C.4. BIODEGRADAZIONE Determinazione della «pronta» (ready) biodegradabilità

PARTE I. CONSIDERAZIONI GENERALI

PARTE II. SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC (Metodo C.4-A)

PARTE III. SAGGIO DI SCREENING OCSE MODIFICATO (Metodo C.4-B)

PARTE IV. SAGGIO DI SVILUPPO DEL CO_2 (Metodo C.4-C)

PARTE V. SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO (Metodo C.4-D)

Parte VI. SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA (Metodo C.4-E)

PARTE VII. SAGGIO M.I.T.I. (Metodo C.4-F)

C.5. DEGRADAZIONE — DOMANDA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

C.6. DEGRADAZIONE — DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

C.7. DEGRADAZIONE — DEGRADAZIONE ABIOTICA: IDROLISI IN FUNZIONE DEL PH

C.8. TOSSICITÀ PER I LOMBRICHI

C.9. BIODEGRADAZIONE — ZAHN — WELLENS TEST

C.10. PROVA DI SIMULAZIONE SUI SISTEMI DI TRATTAMENTO AEROBICO DEI LIQUAMI: C.10-A: UNITÀ CON FANGHI ATTIVI — C.10-B: BIOFILM

C.11. BIODEGRADAZIONE — FANGHI ATTIVI: SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA RESPIRAZIONE

C.12. BIODEGRADAZIONE — SAGGIO SCAS MODIFICATO

C.13. BIOCONCENTRAZIONE: SAGGIO SUI PESCI, METODO A FLUSSO CONTINUO

C.14. TEST SULLA CRESCITA DEI PESCI GIOVANI

C.15. PESCI, PROVA DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONI E DI LARVA CON SACCO VITELLINO

C.16. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ORALE ACUTA

C.17. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ACUTA PER CONTATTO

C.18. ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO: METODO DISCONTINUO ALL'EQUILIBRIO

▼B

C.19.	STIMA DEL COEFFICIENTE DI ADSORBIMENTO *(K_{OC})* SUL TERRENO E SUI FANGHI DI ACQUE DA SCARICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)
C.20.	PROVA DI RIPRODUZIONE CON *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DELL'AZOTO
C.22.	MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DEL CARBONIO
C.23.	TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEL SUOLO
C.24.	TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEI SISTEMI SEDIMENTOSI ACQUATICI
C.25.	MINERALIZZAZIONE AEROBICA DELLE ACQUE DI SUPERFICIE — SAGGIO DI SIMULAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE
C.26.	SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *LEMNA* SP.

▼M4

C.27.	PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDE IN ACQUA-SEDIMENTO CON SEDIMENTO ADDIZIONATO
C.28.	PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDI IN SEDIMENTO-ACQUA CON ACQUA ADDIZIONATA
C.29.	PRONTA BIODEGRADABILITÀ — CO_2 IN RECIPIENTI ERMETICI (prova del CO_2 nello spazio di testa)
C.30.	BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI TERRESTRI

▼B

C.1. TOSSICITÀ ACUTA PER I PESCI

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Lo scopo di questo saggio è di determinare la tossicità letale acuta di una sostanza nei confronti di pesci in acqua dolce. Per poter scegliere il metodo di saggio (statico, semistatico o a flusso continuo) più idoneo a garantire che le concentrazioni della sostanza in esame si mantengano soddisfacentemente costanti per tutta la durata del saggio, è desiderabile disporre, per quanto possibile, di dati concernenti la solubilità in acqua, la tensione di vapore, la stabilità chimica, le costanti di dissociazione e la biodegradabilità della sostanza in esame.

Sia per la programmazione della prova che per l'interpretazione dei risultati si dovrebbero tenere in considerazione anche altre informazioni (per esempio formula di struttura, grado di purezza, natura e percentuale delle impurezze significative, presenza e quantità di additivi e coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua).

1.2. DEFINIZIONE E UNITÀ

La tossicità acuta è l'effetto avverso osservabile indotto in un organismo entro un breve tempo (giorni) di esposizione ad una data sostanza. Nel presente saggio, la tossicità acuta viene espressa come concentrazione letale media (CL_{50}), che è la concentrazione di una sostanza nell'acqua capace di uccidere il 50 % di un gruppo di pesci entro un periodo continuo di esposizione, la cui durata deve essere precisata.

Tutte le concentrazioni delle sostanze in esame sono espressi in peso/volume (mg/l). Esse possono anche venire espresse in peso/peso ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per dimostrare che, nelle condizioni sperimentali di laboratorio, la risposta della specie usata per il saggio non è variata in modo significativo, può essere saggiata una sostanza di riferimento.

Per il presente saggio non vengono specificate sostanze di riferimento.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Si può eseguire un saggio limite a 100 mg per litro allo scopo di dimostrare che la CL_{50} è maggiore di questa concentrazione.

I pesci sono esposti alla sostanza (alle sostanze) in esame, aggiunta all'acqua in varie concentrazioni, per un periodo di 96 ore. Le mortalità vengono registrate almeno ad intervalli di 24 ore, quando possibile, per ciascun tempo di osservazione si calcola la concentrazione (CL_{50}) alla quale muore il 50 % dei pesci.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

I criteri di qualità dovranno essere applicati sia per il saggio limite che per il metodo di saggio completo.

La mortalità negli animali di controllo usati non deve essere superiore al 10 % (o un pesce se se ne usano meno di 10) ai termine della prova.

La concentrazione dell'ossigeno deve rimanere per tutta la prova al di sopra del 60 % del valore di saturazione dell'aria.

▼B

La concentrazione della sostanza in esame deve essere mantenuta entro l'80 % della concentrazione iniziale per tutta la durata della prova.

Per sostanze che si sciolgono facilmente nel mezzo di saggio producendo soluzioni stabili, cioè quelle che non presentano un grado significativo di volatilizzazione, degradazione, idrolisi o assorbimento, la concentrazione iniziale può essere presa equivalente alla concentrazione nominale. Deve essere fornita la documentazione che la concentrazione si è mantenuta costante per tutta la durata del saggio e che sono stati soddisfatti i criteri di qualità.

Per sostanze che sono:

i) scarsamente solubili nel mezzo di saggio; o

ii) in grado di formare emulsioni o dispersioni stabili; o

iii) non stabili in soluzione acquosa;

come concentrazione iniziale si dovrà prendere la concentrazione misurata in soluzione (o, se non è possibile tecnicamente, misurata nella colonna d'acqua) all'inizio della prova. La concentrazione sarà determinata dopo un periodo di equilibrazione, ma prima dell'introduzione dei pesci di prova.

In ciascuno di questi casi, ulteriori misure devono essere effettuate durante il saggio per confermare che la concentrazione di esposizione effettiva o i criteri di qualità sono stati rispettati.

Il pH non dovrebbe variare più di una unità.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Tre diversi procedimenti possono essere usati.

Prova statica:

Prova di tossicità su pesci nel corso della quale non ha luogo alcun flusso della soluzione di saggio (le soluzioni non vengono cambiate per tutta la durata della prova).

Prova semistatica:

Prova senza alcun flusso della soluzione ma nella quale le soluzioni di saggio vengono rinnovate ad intervalli regolari e prolungati (ad esempio 24 ore).

Prova a flusso continuo:

Prova di tossicità nella quale l'acqua è rinnovata costantemente nelle vasche di saggio e la sostanza in esame viene trasportata insieme all'acqua usata per rinnovare l'ambiente del saggio.

1.6.1. **Reattivi**

1.6.1.1. *Soluzioni delle sostanze da esaminare*

Si preparano soluzioni di riserva alla concentrazione richiesta, sciogliendo la sostanza in acqua deionizzata o comunque rispondente alle caratteristiche descritte al punto 1.6.1.2.

Le concentrazioni di prova scelte vengono preparate per diluizione della soluzione di riserva. Se si saggiano concentrazioni elevate, la sostanza può essere disciolta direttamente nell'acqua di diluizione.

▼B

Le sostanze devono normalmente essere saggiate solo fino al limite di solubilità. Per alcune sostanze (per esempio sostanze che hanno una scarsa solubilità in acqua o un elevato P_{ow}, o quelle che formano dispersioni stabili piuttosto che soluzioni vere in acqua), è accettabile preparare un livello di concentrazione al di sopra del limite di solubilità della sostanza per garantire di raggiungere la massima concentrazione solubile/stabile. È importante tuttavia che questa concentrazione non disturbi altrimenti il sistema di saggio (per esempio una pellicola della sostanza sulla superficie dell'acqua che impedisca l'ossigenazione dell'acqua, ecc.).

Si può ricorrere a dispersione ultrasonica, solventi organici, emulsionanti o disperdenti come aiuto per preparare le soluzioni concentrate di riserva delle sostanze di scarsa solubilità in acqua o per disperdere queste sostanze nell'ambiente di prova. Quando si utilizzano tali sostanze ausiliarie, tutte le concentrazioni da saggiare dovrebbero contenere la stessa quantità di sostanza ausiliaria, e pesci di controllo addizionali dovrebbero essere esposti alla stessa concentrazione della sostanza ausiliaria usata nella serie di concentrazioni da saggiare. La concentrazione di tali sostanze ausiliarie deve essere minimizzata, e in nessun caso deve superare i 100 mg per litro nell'ambiente di prova.

La prova dovrebbe essere effettuata senza aggiustamento del pH. Se esiste evidenza di variazioni pronunciate del pH, si consiglia di ripetere la prova procedendo all'opportuna regolazione del pH e riportando i risultati. In questo caso, il valore del pH della soluzione di riserva dovrebbe essere aggiustato a quello dell'acqua di diluizione, a meno che non esistano specifiche ragioni per agire diversamente. A tal fine sono da preferirsi HCl ed NaOH. Questa regolazione del pH dovrebbe essere effettuata in modo che la concentrazione della sostanza in esame nella soluzione di riserva non cambi in modo significativo. Qualora la regolazione dovesse provocare reazioni chimiche o la precipitazione fisica del composto in esame, ciò dovrebbe essere riportato.

1.6.1.2. *Acqua di stabulazione e di diluizione*

Si possono impiegare acqua potabile (non contaminata da concentrazioni potenzialmente pericolose di cloro, metalli pesanti od altre sostanze), acqua naturale di buona qualità od acqua ricostituita (cfr. Appendice 1). Sono da preferirsi acque con una durezza totale compresa tra 10 e 250 mg/l (come $CaCO_3$) e con pH fra 6,0 e 8,5.

1.6.2. **Attrezzatura**

Tutte le attrezzature devono essere costruite in materiale chimicamente inerte.

— sistema di diluizione automatico (per le prove a flusso continuo),

— misuratore di ossigeno,

— apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua,

— apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura,

— pH-metro.

1.6.3. **Pesci per il saggio**

I pesci devono essere in buona salute e non presentare evidenti malformazioni.

▼B

Le specie usate devono essere scelte sulla base di criteri pratici, come la loro facile disponibilità per tutto l'anno, la facilità di mantenimento, la idoneità per il saggio, sensibilità relativa e qualsiasi fattore economico, biologico o ecologico avente qualche rilevanza. Nella scelta della specie di pesce si deve tenere presente anche la necessità di poter confrontare i dati ottenuti e l'armonizzazione internazionale esistente (riferimento 1).

Un elenco di specie ittiche che sono raccomandate per l'esecuzione di questo saggio è presentato in Appendice 2. Le specie preferite sono il danio zebrato e la trota.

1.6.3.1. *Stabulazione*

I pesci dovrebbero provenire di preferenza da un singolo gruppo con lunghezza ed età simili. Essi devono essere mantenuti per almeno 12 giorni nelle seguenti condizioni:

densità degli animali:

appropriata al sistema (riciclo o flusso continuo) e alla specie di pesce;

acqua:

vedi punto 1.6.1.2;

illuminazione:

fotoperiodo da 12 a 16 ore al giorno;

concentrazione dell'ossigeno disciolto:

almeno 1'80 % del valore di saturazione dell'aria;

alimentazione:

tre volte alla settimana o quotidianamente con sospensione 24 ore prima dell'inizio della prova.

1.6.3.2. *Mortalità*

Dopo un periodo di adattamento di 48 ore, si procede a registrare la mortalità e si applicano i seguenti criteri:

— mortalità superiore al 10 % della popolazione in sette giorni:

l'intera partita viene respinta,

— mortalità tra il 5 e il 10 % della popolazione:

il periodo di adattamento prosegue per altri sette giorni.

Se non si verificano ulteriori mortalità, la partita è accettabile, in caso contrario essa deve essere respinta,

— mortalità inferiore al 5 % della popolazione:

la partita è accettabile.

1.6.4. **Adattamento**

Prima dell'impiego, tutti i pesci debbono essere posti per almeno sette giorni in acqua della qualità e temperatura da impiegare per il saggio.

▼B

1.6.5. **Procedimento del saggio**

Al saggio definitivo si può far precedere una prova orientativa allo scopo di ottenere informazioni per definire l'intervallo di concentrazioni da impiegare.

In aggiunta alla serie di concentrazioni da saggiare, si esegue anche una esposizione di controllo senza la sostanza in esame e, se pertinente, una esposizione di controllo contenente la sostanza ausiliaria.

A seconda delle proprietà fisiche e chimiche del composto in esame, si deve scegliere una prova statica, semistatica o a flusso continuo, secondo quanto più appropriato per soddisfare i criteri di qualità.

I pesci vengono esposti alla sostanza nel modo indicato di seguito:

— durata: 96 ore,

— numero di animali: almeno 7 per concentrazione,

— vasche: di capacità opportuna secondo il carico raccomandato,

— densità dei pesci: per i saggi statici e semistatici si raccomanda un carico di biomassa massimo di 1,0 g/l; per i sistemi a flusso continuo può essere accettabile un carico più elevato,

— concentrazioni di saggio: almeno cinque concentrazioni, differenti per un fattore costante non superiore a 2,2, e che, nel limite del possibile, coprano l'intervallo di mortalità dallo 0 al 100 %,

— acqua: vedi punto 1.6.1.2,

— illuminazione: fotoperiodo quotidiano: da 12 a 16 ore al giorno,

— temperatura: appropriata alla specie (vedi appendice 2) ma con variazioni entro ± 1 ºC per ciascuna prova,

— concentrazione dell'ossigeno disciolto: non meno del 60 % del valore di saturazione dell'aria alla temperatura prescelta,

— alimentazione: nessuna.

I pesci sono esaminati dopo le prime 2-4 ore ed almeno a intervalli di 24 ore. Essi sono considerati morti se toccando il peduncolo caudale non si ha alcuna reazione e non sono visibili movimenti respiratori. I pesci morti sono allontanati al momento in cui vengono osservati e le mortalità devono essere registrate. Va presa nota delle anormalità visibili (come la perdita di equilibrio, cambiamento di comportamento alla natazione, funzione respiratoria, pigmentazione, ecc.).

Il pH, l'ossigeno disciolto e la temperatura devono essere misurati quotidianamente.

Saggio limite

Usando le procedure descritte in questo metodo di saggio, si può eseguire un saggio limite a 100 mg per litro allo scopo di dimostrare che la CL_{50} è più elevata di questa concentrazione.

Se la natura della sostanza è tale che non si possa raggiungere una concentrazione di 100 mg per litro nel mezzo di saggio, il saggio limite deve essere eseguito ad una concentrazione uguale alla solubilità della sostanza (o alla concentrazione massima formante una dispersione stabile) nell'ambiente usato (vedi anche 1.6.1.1.).

▼B

Il saggio limite deve essere eseguito usando da 7 a 10 pesci, con lo stesso numero nel saggio (nei saggi) di controllo. (La teoria binomiale stabilisce che quando si utilizzano 10 pesci con mortalità 0, c'è il 99,9 % di confidenza che la CL_{50} sia maggiore della concentrazione usata nel saggio limite. Con 7, 8 0 9 pesci l'assenza di mortalità assicura una confidenza di almeno il 99 % che la CL_{50} sia maggiore della concentrazione usata).

Se si verifica mortalità, occorre eseguire uno studio completo. Se si osservano effetti sub-letali, questi devono essere registrati.

2. **DATI E VALUTAZIONE**

Per ciascun periodo in cui sono registrate osservazioni (24, 48, 72 e 96 ore) riportare su carta logaritmico-pro-babilistica la mortalità percentuale per ciascun periodo di esposizione raccomandato in funzione della concentrazione.

Dove è possibile, e per ciascun tempo di osservazione, si dovrebbero stimare la CL_{50} e i limiti di confidenza statistica ($p = 0,05$) con l'uso di procedure standard; questi valori devono essere arrotondati ad una (o al massimo due) cifre significative (esempi di arrotondamento a due cifre: 170 per 173,5; 0,13 per 0,127; 1,2 per 1,21).

Nei casi in cui il coefficiente angolare della curva di concentrazione/-risposta percentuale è troppo alto per permettere il calcolo della CL_{50}, è sufficiente una stima grafica di questo valore.

Quando due concentrazioni consecutive in un rapporto di 2,2 danno solo 0 e 100 % di mortalità, questi due valori sono sufficienti per indicare l'intervallo in cui cade la CL_{50}.

Qualora si osservasse che la stabilità o l'omogeneità della sostanza in esame non può essere mantenuta, tale fatto dovrebbe essere indicato nella relazione e l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta con prudenza.

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— informazioni sul pesce impiegato per la prova (nome scientifico, ceppo, fornitore, eventuali pretrattamenti, grandezza e numero impiegato a ciascuna concentrazione di saggio),

— fonte dell'acqua di diluizione e principali caratteristiche chimiche (pH, durezza, temperatura),

— nel caso di una sostanza di scarsa solubilità in acqua, il metodo di preparazione della soluzione concentrata di riserva e della soluzione di saggio,

— concentrazione di eventuali sostanze ausiliarie,

— elenco delle concentrazioni usate e qualsiasi informazione disponibile relativa alla stabilità, alle concentrazioni della sostanza chimica provata nella soluzione di saggio,

— se si eseguono analisi chimiche, metodi usati e risultati ottenuti,

— risultati dell'eventuale saggio limite,

— ragioni della scelta e dettagli del procedimento usato nel saggio (per esempio statico, semistatico, tasso di dosaggio, portata nel caso di flusso continuo, eventuale aereazione, densità dei pesci, ecc.),

▼B

— descrizione dell'apparecchiatura sperimentale,

— regime di illuminazione,

— concentrazione dell'ossigeno disciolto, pH e temperatura delle soluzioni di saggio ogni 24 ore,

— evidenze del fatto che sono stati soddisfatti i criteri di qualità,

— una tabella che presenti la mortalità cumulativa a ciascuna concentrazione e nel controllo (e controllo con la sostanza ausiliaria, se richiesto) a ciascuno dei tempi di osservazione raccomandati,

— grafico della curva di concentrazione/risposta percentuale al termine del saggio,

— se possibile, i valori di CL_{50} a ciascuno dei tempi di osservazione raccomandati (con limiti di confidenza statistica al 95 %),

— procedure statistiche usate per determinare i valori della CL_{50},

— se si usa una sostanza di riferimento, risultati ottenuti,

— concentrazione di saggio massima che non ha causato mortalità nel periodo di saggio,

— concentrazione di saggio minima che ha provocato il 100 % di mortalità nel periodo del saggio.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Tesrverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia recticulata* — 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Rese arch and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of che European Coramunities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes rum akuten Fisch-test. Rudolph, P. und Boje, R. Okoto- xikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemi- kaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelinck). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Appendice 1

Acqua ricostituita

Esempio di acqua di diluizione appropriata

Tutti i prodotti chimici devono avere purezza analitica.

Dovrebbe essere impiegata acqua distillata di buona qualità oppure acqua deionizzata, di conduttività, inferiore a 5 μScm^{-1}

L'apparecchio per la distillazione dell'acqua non deve contenere parti in rame.

Soluzioni di riserva

$CaCl_2$. $2H_2O$ (calcio cloruro diidrato):	11,76 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	4,93 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
$NaHCO_3$ (sodio bicarbonato):	2,59 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
KCl (potassio cloruro):	0,23 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	

Acqua di diluizione ricostituita

Mescolare 25 ml di ciascuna delle quattro soluzioni di riserva e portare ad un litro con acqua.

Aerare finchè la concentrazione dell'ossigeno disciolto uguagli il valore di saturazione per l'aria.

Il pH dovrebbe essere di 7,8 ± 0,2.

Se necessario regolare il pH mediante aggiunte di NaOH (sodio idrossido) o HCl (acido cloridrico).

L'acqua di diluizione così preparata viene lasciata da parte per circa 12 ore e non richiede alcuna ulteriore aerazione.

La somma degli ioni Ca e Mg in questa soluzione è di 2,5 mmol/l. II rapporto degli ioni Ca e Mg è di 4:1 e quello degli ioni Na e K è di 10:1. L'alcalinità totale di questa soluzione è 0,8 mmol/1.

Eventuali deviazioni nel modo di preparare l'acqua di diluizione non devono modificarne la composizione e le proprietà.

▼B

Appendice 2

Specie di pesci raccomandate per il saggio

Specie raccomandate	Intervallo di temperatura raccomandato per il saggio (°C)	Lunghezza totale racommandata per gli animali da saggio (cm)
Brachydanio reno (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio Zebrato	20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpe commune	20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae Cyprinodonti-dae) (Tomminck et Schlegel 1850) Red Killifish	20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Bluegill	20 a 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trota iridea	12 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Golden orfe	20 a 24	6,0 ± 2,0

Raccolta

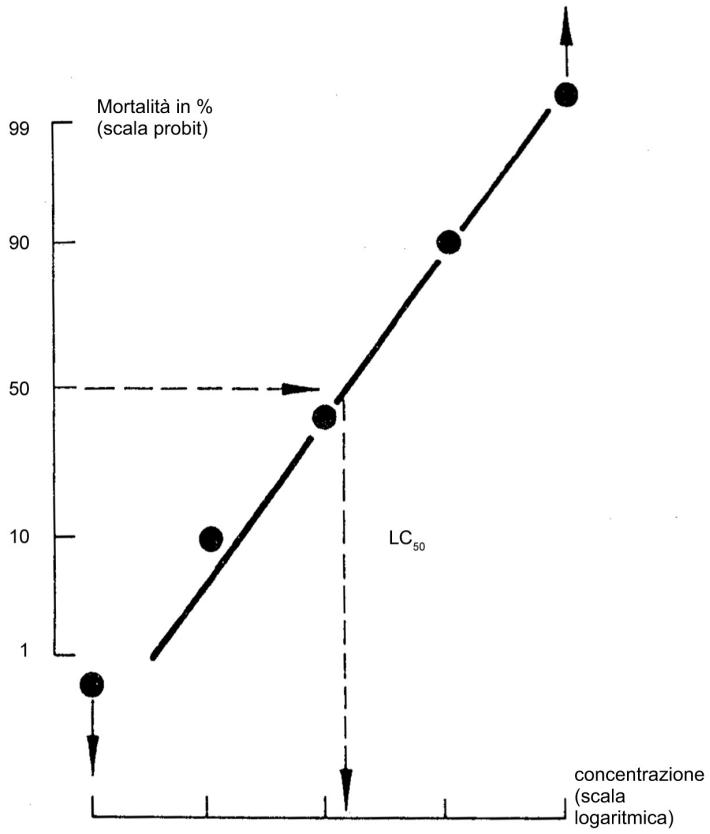
I pesci suelencati sono allevabili facilmente e/o sono largamente disponibili per tutto l'anno. Possono riprodursi e essere mantenuti sia in stabilimenti di acquicoltura sia in laboratorio, sotto condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di saggio saranno sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

▼B

Appendice 3

Esempio di curva concentrazione/percento di mortalità

Esempio di determinazione della CL_{50} usando carta log-probit.



▼B

C.2. SAGGIO DI IMMOBILIZZAZIONE ACUTA IN *DAPHNIA SP.*

1. METODO

Il presente metodo di prova di immobilizzazione acuta corrisponde a quello descritto nelle linee guida dell'OCSE TG 202 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive un saggio di tossicità acuta finalizzato a determinare gli effetti di una sostanza chimica sulle dafnie. Per quanto possibile sono stati utilizzati i metodi di prova esistenti (1)(2)(3).

1.2. DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

EC_{50}: concentrazione stimata che immobilizza il 50 % delle dafnie entro un periodo di esposizione prestabilito. Se si applica una definizione diversa, è necessario indicarlo con i relativi riferimenti bibliografici.

Immobilizzazione: sono considerati immobili gli animali che, dopo lieve agitazione del contenitore usato per il saggio, non sono in grado di nuotare entro 15 secondi (anche se possono ancora muovere le antenne).

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

Le giovani dafnie, di età inferiore a 24 ore all'inizio del saggio, sono esposte alla sostanza di prova ad un certo range di concentrazione per 48 ore. L'immobilizzazione viene registrata dopo 24 ore e dopo 48 ore e comparata ai valori di controllo. I risultati sono successivamente analizzati per calcolare la EC_{50} a 48 ore (cfr. definizioni al punto 1.2.). La determinazione della EC_{50} a 24 ore è facoltativa.

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

È necessario conoscere la solubilità in acqua e la pressione di vapore della sostanza di prova e deve essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza nelle soluzioni di prova con una efficienza di recupero e un limite di rilevamento noti. Tra le informazioni utili di cui disporre figurano la formula di struttura, la purezza della sostanza, la stabilità in acqua o alla luce, P_{ow} e i risultati di un saggio di biodegradabilità con metodo *ready* (cfr. metodo C.4).

Nota: orientamenti per testare sostanze con caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione del saggio sono contenuti in (4).

1.5. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Una sostanza di riferimento può essere sottoposta a prova per determinarne l'EC50 al fine di garantire che le condizioni di prova sono affidabili. A tal fine si raccomanda l'utilizzo di tossicanti utilizzati in prove interlaboratorio *(ring test)* (1)(5) ([1]). La o le prove con una sostanza di riferimento devono essere condotte preferibilmente una volta al mese e almeno due volte l'anno.

([1]) I risultati di queste prove interlaboratorio e una rettifica tecnica alla norma tecnica ISO 6341 danno una EC50 — 24 h del dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) nell'intervallo 0,6 mg/l-1,7mg/l.

▼B

1.6. CRITERI DI QUALITÀ

Ai fini della validità del saggio devono applicarsi i seguenti criteri:

— nei controlli, compreso il controllo contenente l'agente di solubilizzazione, l'immobilizzazione nelle dafnie non deve superare il 10 %,

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto nei contenitori usati nel saggio e nei controlli deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio.

Nota: per il primo criterio, non più del 10 % delle dafnie di controllo deve presentare immobilizzazione o altri segni di disturbo o stress quali scolorazione o comportamento anomalo come il fatto di rimanere bloccate alla superficie dell'acqua.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO

1.7.1. **Apparecchiature**

I contenitori e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con le soluzioni di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. I contenitori saranno in genere provette o bicchieri di vetro; prima di ogni uso devono essere puliti secondo le normali procedure di laboratorio. I contenitori utilizzati nelle prove devono essere coperti in maniera non ermetica per ridurre la perdita d'acqua per evaporazione ed evitare che penetri polvere nelle soluzioni. Le sostanze volatili devono essere testate in contenitori chiusi e completamente riempiti, abbastanza grandi da evitare che l'ossigeno raggiunga un livello troppo scarso o tale da avere un effetto limitante (cfr. punto 1.6 e punto 1.8.3, primo paragrafo).

Oltre ai contenitori saranno utilizzate alcune o tutte le apparecchiature indicate di seguito: misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di piccolo volume); pH-metro; apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura; apparecchiatura per determinare la concentrazione di carbonio organico totale (TOC); apparecchiatura per determinare la domanda chimica di ossigeno (COD); apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua, ecc.

1.7.2. **Organismo sottoposto al saggio**

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale preferita, anche se è possibile ricorrere ad altre specie (ad esempio *Daphnia pulex).* All'inizio del saggio gli animali devono avere meno di 24 ore di vita; per ridurre la variabilità è fortemente consigliabile non utilizzare progenie provenienti dalla prima nidiata. Devono provenire da una popolazione sana (senza segni di stress quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di efippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, scolorazione ecc.). Tutti gli organismi utilizzati per una prova particolare devono provenire da colture derivanti dalla stessa popolazione di dafnie. Gli animali della popolazione vanno mantenuti in condizioni colturali (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle che verranno utilizzate nel saggio. Se il mezzo di coltura delle dafnie da usare nel saggio è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura delle dafnie, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del saggio. A tal fine le dafnie parentali devono essere mantenute in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del saggio.

▼B

1.7.3. **Acqua di allevamento e di diluizione**

È possibile utilizzare come acqua di allevamento e acqua di diluizione acqua naturale (di superficie o freatica), acqua ricostituita o acqua di rubinetto non clorata se le dafnie sopravvivono per la durata della coltura, dell'acclimatazione e della prova senza manifestare segni di stress. Le acque che presentano le caratteristiche chimiche indicate all'allegato I riferite ad un'acqua di diluizione accettabile sono considerate adatte come acque da utilizzare per il saggio. Per tutta la durata del saggio l'acqua deve mantenere una qualità costante. L'acqua ricostituita può essere ottenuta aggiungendo ad acqua deionizzata o distillata specifiche quantità di reagenti di grado analitico riconosciuto. Esempi di acqua ricostituita sono indicati in (1)(6) e all'allegato II. Per saggiare sostanze contenenti metalli non utilizzare mezzi contenenti agenti chelanti noti, come l'M4 e l'M7 indicati all'allegato II. Il pH deve essere compreso tra 6 e 9. Per la *Daphnia magna* si raccomanda una durezza compresa tra 140 e 250 mg/l (come $CaCO_3$), mentre per altre specie di *Daphnia* può essere più opportuna una durezza inferiore. L'acqua di diluizione deve essere aerata prima di utilizzarla nel saggio per consentire alla concentrazione di ossigeno disciolto di raggiungere la saturazione.

Se si utilizza acqua naturale, i parametri relativi alla qualità devono essere misurati almeno due volte all'anno oppure ogni volta si sospetti che tali caratteristiche possano essersi modificate sensibilmente (cfr. paragrafo precedente e allegato I). È inoltre necessario misurare i metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Se si utilizza acqua di rubinetto non clorata, è preferibile procedere ad un'analisi giornaliera del cloro. Se l'acqua di diluizione proviene da una sorgente di acqua di superficie o da una sorgente freatica, è necessario misurare la conduttività e il carbonio organico totale (TOC) oppure la domanda chimica di ossigeno (COD).

1.7.4. **Soluzioni di prova**

Le soluzioni di prova delle concentrazioni scelte sono in genere preparate diluendo una soluzione madre. Le soluzioni madre devono essere preferibilmente preparate mediante dissoluzione della sostanza di prova nell'acqua di diluizione. Per quanto possibile evitare l'impiego di solventi, emulsionanti o agenti di dispersione; in alcuni casi, tuttavia, può essere necessario usare questi composti per ottenere una soluzione madre della concentrazione corretta. Per ottenere indicazioni sull'impiego dei solventi, emulsionanti e agenti di dispersione adeguati, consultare il testo (4). In ogni caso, la sostanza di prova contenuta nelle soluzioni di prova non deve superare il limite di solubilità nell'acqua di diluizione.

Il saggio deve essere effettuato senza regolazione del pH. Se quest'ultimo non rimane nell'intervallo 6-9 si consiglia di ripetere il saggio regolando il pH della soluzione madre in base a quello dell'acqua di diluizione prima di aggiungere la sostanza di prova. La regolazione del pH deve essere effettuata in modo tale che la concentrazione della soluzione madre non vari in modo significativo e che non si producano reazioni chimiche o precipitazione della sostanza di prova. A tal fine sono da preferirsi l'HCl e l'NaOH.

▼B

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Condizioni di esposizione**

1.8.1.1. *Gruppi di prova e controlli*

Riempire i contenitori usati nel saggio con la quantità corretta di acqua di diluizione e soluzioni della sostanza di prova. Il rapporto tra volume di aria/volume di acqua all'interno del contenitore deve essere uguale per il gruppo di prova e il gruppo di controllo. Le dafnie sono successivamente collocate nei contenitori di prova. Per ciascuna concentrazione di prova e per i controlli devono essere utilizzati almeno 20 animali, preferibilmente suddivisi in quattro gruppi di cinque. Per ciascun animale sono necessari almeno 2 ml di soluzione di prova (cioè un volume di 10 ml per cinque dafnie per contenitore di prova). Il saggio può essere effettuato con un sistema di rinnovo semi-statico o con un sistema dinamico quando la concentrazione della sostanza di prova non è stabile.

Oltre alla serie di trattamento è necessario procedere a una serie di controlli con acqua di diluizione e, se opportuno, a una serie di controlli con agente solubilizzante.

1.8.1.2. *Concentrazioni di prova*

Si può procedere a una prova per determinare il range di concentrazione per il saggio definitivo, a meno di non disporre già di informazioni sulla tossicità della sostanza di prova. A tal fine le dafnie sono esposte a una serie di concentrazioni della sostanza di prova molto intervallate tra loro. Cinque dafnie devono essere sottoposte a ciascuna concentrazione di prova per 48 ore al massimo e non sono necessarie ripetizioni. Il periodo di esposizione può essere ridotto (ad esempio a 24 ore o meno) se è possibile ottenere i dati necessari per determinare il range di concentrazione in meno tempo.

Devono essere utilizzate almeno cinque concentrazioni di prova in una serie geometrica con un rapporto geometrico preferibilmente non superiore a 2,2. Se vengono utilizzate meno di cinque concentrazioni è necessario motivare la scelta. La concentrazione più elevata testata deve preferibilmente produrre l'immobilizzazione totale (100 %), mentre la concentrazione più bassa non deve, di preferenza, causare alcun effetto osservabile.

1.8.1.3. *Condizioni di incubazione*

La temperatura deve essere compresa tra 18 °C e 22 °C e per ogni singolo saggio deve mantenersi costante con uno scarto di ± 1 °C. È consigliabile effettuare un ciclo di 16 ore di luce e un ciclo di 8 ore di buio. Si può anche procedere all'incubazione nell'oscurità totale, in particolare se le sostanze di prova sono instabili alla luce.

Durante il saggio i contenitori non devono essere aerati. Il saggio non richiede la regolazione del pH. Durante il saggio le dafnie non devono essere alimentate.

1.8.1.4. *Durata*

Il saggio dura 48 ore.

1.8.2. **Osservazioni**

Ciascun contenitore utilizzato per il saggio deve essere controllato per verificare l'immobilizzazione delle dafnie dopo 24 e dopo 48 ore dall'inizio del saggio (cfr. definizioni al punto 1.2). Oltre all'immobilità è necessario riferire su qualsiasi comportamento o aspetto anomali.

▼B

1.8.3. **Misurazioni analitiche**

L'ossigeno disciolto e il pH sono misurati all'inizio e alla fine del saggio nel/nei controllo/i e alla concentrazione più elevata della sostanza di prova. La concentrazione dell'ossigeno disciolto nei controlli deve rispettare il criterio di validità (cfr. punto 1.6). Il pH non deve in genere variare di oltre 1,5 unità in ciascun saggio effettuato. La temperatura viene in genere rilevata nei contenitori di controllo o nell'aria ambiente e dev'essere preferibilmente registrata in maniera continua durante il saggio o comunque almeno all'inizio e alla fine del saggio.

La concentrazione della sostanza di prova deve essere misurata almeno alla concentrazione di prova massima e minima, all'inizio e alla fine del saggio (4). I risultati devono basarsi sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se vi sono dati in grado di dimostrare che per tutta la durata del saggio la concentrazione della sostanza di prova si è mantenuta in maniera soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale rilevata, i risultati possono anche basarsi sui valori nominali o sui valori iniziali misurati.

1.9. SAGGIO LIMITE

Usando le procedure descritte in questo metodo di prova, si può eseguire un saggio limite a 100 mg/l della sostanza di prova oppure fino al limite di solubilità di quest'ultima nel terreno utilizzato per il saggio (se è inferiore) allo scopo di dimostrare che la EC_{50} si colloca al di sopra di questa concentrazione. Il saggio limite deve essere eseguito usando 20 dafnie (preferibilmente suddivise in 4 gruppi di cinque), con un ugual numero nel gruppo (nei gruppi) di controllo. Se si verifica immobilizzazione, si deve eseguire uno studio completo. Ogni comportamento anomalo rilevato deve essere registrato.

2. **DATI**

I dati devono essere riassunti sotto forma di tabelle; per ogni gruppo di trattamento e gruppo di controllo devono essere indicati il numero di dafnie utilizzate e il grado di immobilizzazione rilevato ad ogni osservazione. Le percentuali di dafnie immobilizzate dopo 24 ore e dopo 48 ore devono essere rappresentate graficamente rispetto alle concentrazioni di prova. I dati devono essere analizzati con gli opportuni metodi statistici (come analisi *probit* ecc.) per calcolare l'andamento delle curve e la EC_{50} con limiti di affidabilità del 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Se non è possibile applicare ai dati ottenuti i metodi standard di calcolo della EC_{50}, come valore approssimativo per la EC_{50} devono essere utilizzate la concentrazione massima che non causa immobilizzazione e la concentrazione minima che causa l'immobilità totale (100 %) (il valore è dato dalla media geometrica di queste due concentrazioni).

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— natura fisica e caratteristiche fisico-chimiche,

▼B

— dati che ne consentano l'identificazione chimica, compresa la purezza.

Specie sottoposte al saggio:

— origine e specie di *Daphnia,* fornitore (se noto) e condizioni di coltura utilizzate (inclusa la fonte, il tipo e la quantità di alimento e la frequenza di alimentazione).

Condizioni di prova:

— descrizione dei contenitori utilizzati per il saggio: tipo di contenitori, volume della soluzione, numero di dafnie per contenitore, numero di contenitori di prova (ripetizioni) per concentrazione,

— metodi di preparazione della soluzione madre e della soluzione di prova, compreso l'eventuale impiego di solventi o agenti di dispersione, concentrazioni utilizzate,

— informazioni sull'acqua di diluizione: provenienza e caratteristiche di qualità dell'acqua (pH, durezza, rapporto Ca/Mg, rapporto Na/K, alcalinità, conduttività ecc.); composizione dell'acqua ricostituita, se utilizzata,

— condizioni di incubazione: temperatura, intensità luminosa e periodicità dell'esposizione alla luce, ossigeno disciolto, pH, ecc.

Risultati:

— numero e percentuale di dafnie immobilizzate o che hanno mostrato effetti negativi (compreso un comportamento anomalo) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo di trattamento, per ogni tempo di osservazione e descrizione del tipo di effetti osservati,

— risultati e data del saggio eseguito con la sostanza di riferimento, se disponibili,

— concentrazioni nominali di prova e risultato di tutte le analisi effettuate per determinare la concentrazione della sostanza di prova nei contenitori utilizzati nel saggio; devono essere indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione,

— tutte le misurazioni fisico-chimiche di temperatura, pH e ossigeno disciolto svolte durante il saggio,

— EC_{50} a 48 ore per l'immobilizzazione con intervalli di affidabilità e grafici del modello adattato utilizzato per il calcolo, andamento delle curve dose-risposta ed errore standard; procedimenti statistici utilizzati per determinare la EC_{50} (questi stessi dati devono essere riportati anche per l'immobilizzazione a 24 ore, se misurati),

— spiegazione delle eventuali deviazioni rispetto al metodo di prova, con indicazione dell'eventuale incidenza della deviazione sui risultati ottenuti nel saggio.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. ISO 6341. (1996), Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test, terza edizione, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010 (1996), Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada (1996), Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment, No. 23, Parigi 2000.

5. Commissione delle Comunità europee, Studio D8369 (1979), Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adottato nel settembre 1998.

7. Stephan C.E. (1977), *Methods for calculating an* LC_{50}, in Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (a cura di F.I. Mayer e J.L. Hamelink), ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, pagg. 65-84.

8. Finney D.J. (1978), Statistical Methods in Biological Assay, terza edizione, Londra, Griffin, Weycombe, UK.

▼B

ALLEGATO 1

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE RIFERITE AD UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazione
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforici totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

▼B

ALLEGATO 2

ESEMPI DI ACQUA RICOSTITUITA RITENUTA ADEGUATA PER IL SAGGIO

Acqua per il saggio ISO (1)

Soluzione madre (singola sostanza)		Per preparare l'acqua ricostituita, aggiungere i seguenti volumi di soluzione madre in 1 litro d'acqua (*)
Sostanza	Quantità aggiunta in 1 litro d'acqua (*)	
Cloruro di calcio $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Solfato di magnesio $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonato di sodio $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 ml

(*) Acqua di purezza adeguata, ad esempio acqua non ionizzata, acqua distillata o sottoposta a trattamento di osmosi inversa con una conduttività preferibilmente inferiore o uguale a 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Mezzo Elendt M7 ed M4

Acclimatazione al mezzo Elendt M4 ed M7

Alcuni laboratori hanno riscontrato difficoltà a trasferire direttamente la *Daphnia* ai mezzi di coltura M4 ed M7. Qualche risultato è stato invece ottenuto con un'acclimatazione graduale, cioè trasferendo la *Daphnia* dal proprio mezzo ad un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine ad un mezzo Elendt al 100 %. I periodi di acclimatazione possono avere anche una durata di un mese.

Preparazione

Elementi in tracce

Preparare innanzitutto distinte soluzioni madre (I) dei singoli elementi in tracce in acqua di purezza adeguata, ad esempio acqua non ionizzata, acqua distillata o sottoposta a trattamento di osmosi inversa. Da queste soluzioni (I) preparare una seconda soluzione madre unica (II) contenente tutti gli elementi in tracce (soluzione combinata), cioè:

Soluzione(i) madre I (unica sostanza)	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere i seguenti quantitativi di soluzione I all'acqua (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 volte	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 volte	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 volte	1,0	0,25

▼B

Soluzione(i) madre I (unica sostanza)	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere i seguenti quantitativi di soluzione I all'acqua (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 volte	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 volte	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 volte	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 volte	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 volte	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 volte	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 volte	1,0	1,0
KI	65	20 000 volte	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 volte	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 volte	1,0	1,0
$Na_2EDTA.2H_2O$	5 000	2 000 volte	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 volte	—	—

Le soluzioni Na 2 EDTA ed $FeSO_4$ sono preparate individualmente, mescolate e messe immediatamente in autoclave.

Il risultato è:

2 l Fe-EDTA solutione		1 000 volte	20,0	5,0

Mezzi di coltura M4 edM7

I mezzi di coltura M4 ed M7 sono preparati con la soluzione madre II, macronutrienti e vitamine come indicato nella tabella:

	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Quantitativo di soluzione II aggiunto per preparare il mezzo di coltura (ml/l)	
			M4	M7
Soluzione madre II (elementi in tracce combinati)		20 volte	50	50
Soluzioni madre con macronutrienti (unica sostanza)				
$CaCl_2$ — $2H_2O$	293 800	1 000 volte	1,0	1,0
$MgSO_4$ — $7H_2O$	246 600	2 000 volte	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 volte	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 volte	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3$ — $9H_2O$	50 000	5 000 volte	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 volte	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 volte	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 volte	0,1	0,1

▼B

	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Quantitativo di soluzione II aggiunto per preparare il mezzo di coltura (ml/l)	
			M4	M7
Soluzione madre di vitamine combinate	—	10 000 volte	0,1	0,1

La soluzione madre di vitamine combinate viene preparata aggiungendo le 3 vitamine indicate di seguitoin un litro d'acqua:

Tiamina cloridrato	750	10 000 volte		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 volte		
Biotina	7,5	10 000 volte		

La soluzione di vitamine combinate è conservata in congelatore in piccole aliquote. Le vitamine vengono aggiunte al mezzo di coltura poco prima dell'utilizzo.

N.B.: Per evitare la precipitazione di sali durante la preparazione del mezzo di coltura completo, aggiungere le aliquote di soluzioni madre a circa 500-800 ml di acqua non ionizzata e poi riempire fino a raggiungere il litro.

N.B.: La prima pubblicazione riguardante il mezzo M4 si trova in Elendt, B. P. (1990), Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna Straus.* Protoplasma, 154, pagg. 25-33.

▼M1

C.3. ALGHE DI ACQUA DOLCE E CIANOBATTERI, SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA

1. METODO

Il metodo corrisponde alla linea guida 201 dell'OCSE (2006)(1).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi di prova sono periodicamente riveduti e aggiornati alla luce del progresso scientifico. Il metodo di prova C.3 doveva essere riveduto per includere nuove specie e soddisfare i requisiti per la valutazione del rischio e la classificazione delle sostanze chimiche. La revisione è stata effettuata sulla base di un'ampia esperienza pratica, del progresso scientifico nel settore degli studi di tossicità sulle alghe e di una lunga pratica normativa messa in atto fin dall'adozione iniziale.

1.2. DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo di prova sono usate le definizioni e abbreviazioni seguenti:

Biomassa: il peso secco della sostanza vivente presente in una popolazione espresso in termini di un determinato volume, per esempio mg alghe/litro di soluzione di prova. Di solito la «biomassa» è definita come una massa, ma ai fini della presente prova il termine è utilizzato per riferirsi alla massa per volume. Anche nella presente prova i surrogati della biomassa, come i conteggi delle cellule, la fluorescenza, ecc. sono normalmente misurati e l'uso del termine «biomassa» si riferisce quindi anche a queste misure surrogate.

Coefficiente di variazione: una misura adimensionale della variabilità di un parametro, definita come il rapporto della deviazione standard rispetto alla media. Può essere espresso anche con una percentuale. Il coefficiente medio di variazione del tasso medio di crescita specifico nelle colture di controllo deve essere calcolato come segue:

1. Calcolare il CV in percentuale del tasso medio di crescita specifico a partire dai tassi di crescita quotidiani/sezione per sezione per la rispettiva replica.

2. Calcolare il valore medio di tutti i valori calcolati al punto 1 per ottenere il coefficiente medio di variazione del tasso di crescita specifico quotidiano/sezione per sezione nelle rispettive colture replicate.

ECx: la concentrazione della sostanza dissolta nel mezzo di prova che genera una riduzione dell'x % (per esempio del 50 %) della crescita dell'organismo di prova entro un periodo di esposizione specificato (da citare esplicitamente se diverso dalla durata completa o normale della prova). Per indicare chiaramente se un valore EC risultante si riferisce al tasso di crescita o al rendimento, sono utilizzati rispettivamente i simboli «E_rC» e «E_yC».

Mezzo di crescita: il mezzo completo di coltura sintetica in cui le alghe crescono quando sono esposte alla sostanza di prova. Di norma la sostanza di prova è dissolta nel mezzo di prova.

Tasso di crescita (tasso di crescita specifico medio): l'aumento logaritmico della biomassa durante il periodo di esposizione.

▼M1

Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (Lowest Observed Effect Concentration — LOEC): la concentrazione più bassa che produce un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) sulla crescita rispetto al controllo in un periodo di esposizione definito. Tutte le concentrazioni superiori a quella della LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o più elevato di quello osservato per la LOEC (e di conseguenza per la NOEC). Quando queste due condizioni non sono soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata sulle modalità di selezione della LOEC (e pertanto della NOEC).

NOEC (No Observed Effect Concentration — concentrazione senza effetti osservabili): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

Variabile di risposta: la variabile per la stima della tossicità derivata da qualsiasi parametro misurato che descrive la biomassa mediante metodi diversi di calcolo. Per questo metodo i tassi di crescita e rendimento sono variabili di risposta derivanti dalla misurazione diretta della biomassa o di qualsiasi dei surrogati citati.

Tasso specifico di crescita: una variabile di risposta definita come il quoziente della differenza dei logaritmi naturali di un parametro di osservazione (in questo metodo di prova, la biomassa) e il tempo rispettivo.

Rendimento: il valore di una variabile di misurazione usato al termine del periodo di esposizione meno la variabile di misurazione all'inizio del periodo di esposizione per esprimere l'aumento della biomassa durante la prova.

1.3. APPLICABILITÀ DELLA PROVA

Il presente metodo di prova si applica più facilmente alle sostanze idrosolubili che, nelle condizioni della prova, sono suscettibili di restare nell'acqua. Per effettuare prove su sostanze volatili, fortemente adsorbenti, colorate, a bassa solubilità nell'acqua o sostanze che possono influire sulla disponibilità di sostanze nutrienti o minerali nel mezzo di prova, possono essere necessarie determinate modifiche della procedura descritta (per esempio sistema chiuso, condizionamento dei recipienti di prova). Ai punti 2, 3 e 4 sono fornite indicazioni su alcune modifiche appropriate.

1.4. PRINCIPIO DELLA PROVA

La presente prova intende determinare gli effetti di una sostanza sulla crescita di microalghe di acqua dolce e/o cianobatteri. Organismi di prova in fase di crescita esponenziale sono esposti alla sostanza di prova in colture in lotti per un periodo che dura normalmente 72 ore. Nonostante la durata relativamente breve della prova è possibile valutare gli effetti su diverse generazioni.

La risposta del sistema è la riduzione della crescita in una serie di colture di alghe (unità di prova) esposte a varie concentrazioni di una sostanza di prova. La risposta è valutata come una funzione della concentrazione di esposizione in relazione alla crescita media di colture di controllo identiche non esposte. Per ottenere l'espressione completa della risposta del sistema agli effetti tossici (sensibilità ottimale), è autorizzata la crescita esponenziale delle colture senza limitazioni, con una quantità sufficiente di nutrienti e in condizioni di illuminazione continua per un periodo sufficiente a misurare la riduzione del tasso di crescita specifico.

▼M1

La crescita e l'inibizione della crescita sono quantificate attraverso misure della biomassa delle alghe in funzione del tempo. La biomassa delle alghe è definita come il peso secco per volume, per esempio mg di alghe/litro di soluzione di prova. Tuttavia, è difficile misurare il peso secco, quindi sono utilizzati parametri alternativi. Quello usato con maggiore frequenza è il conteggio delle cellule. Altri parametri alternativi comprendono il volume delle cellule, la fluorescenza, la densità ottica, ecc. Deve essere noto un fattore di conversione fra il parametro alternativo misurato e la biomassa.

Il punto finale della prova è l'inibizione della crescita, espressa come l'aumento del logaritmo della biomassa (tasso di crescita specifico medio) durante il periodo di esposizione. Dai tassi di crescita medi specifici registrati in una serie di soluzioni di prova, la concentrazione che genera un'inibizione specificata del tasso di crescita pari a x % (per esempio 50 %) è determinata ed espressa come E_rC_x (per esempio E_rC_{50}).

Per l'applicazione del presente metodo nel quadro normativo comunitario, il calcolo dei risultati deve essere basato su un tasso di crescita medio specifico per le ragioni di cui al punto 2.2. Una variabile di risposta supplementare utilizzata in questo metodo di prova è il rendimento, che può essere necessario per rispondere a specifici requisiti normativi in alcuni paesi. Il rendimento è definito come la biomassa al termine del periodo di esposizione meno la biomassa all'inizio del periodo di esposizione. A partire dal rendimento registrato in una serie di soluzioni di prova, la concentrazione che genera un'inibizione specificata del rendimento pari a x % (per esempio 50 %) è calcolata ed espressa come E_yC_x (per esempio EyC_{50}).

Inoltre, la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate statisticamente.

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Le informazioni sulla sostanza di prova che possono essere utili per stabilire le condizioni di prova comprendono la formula strutturale, la purezza, la stabilità alla luce, la stabilità nelle condizioni della prova, le proprietà di assorbimento della luce, pKa e i risultati di studi di trasformazione, inclusa la biodegradabilità nell'acqua.

L'idrosolubilità, il coefficiente di partizione ottanolo/acqua (P_{ow}) e la pressione di vapore della sostanza di prova devono essere noti e un metodo convalidato per la quantificazione della sostanza nelle soluzioni di prova con efficienza di recupero e limite di rilevamento noti deve essere disponibile.

1.6. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Le sostanze di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (ring-test) internazionale (4), possono essere testate per verificare la procedura di prova. Anche il dicromato di potassio può essere utilizzato come sostanza di riferimento per le alghe verdi. È preferibile effettuare una prova con una sostanza di riferimento almeno due volte all'anno.

1.7. VALIDITÀ DELLA PROVA

Per garantire la validità della prova i criteri di esecuzione seguenti devono essere soddisfatti:

▼M1

— la biomassa nelle colture di controllo deve essere aumentata esponenzialmente con un fattore di almeno 16 entro il periodo di prova di 72 ore. Questo valore corrisponde a un tasso di crescita specifico di 0,92 giorni^{-1}. Per le specie utilizzate più spesso il tasso di crescita è di solito sensibilmente superiore (cfr. l'appendice 1). Questo criterio può non essere rispettato quando sono utilizzate specie che crescono più lentamente di quelle elencate all'appendice 1. In questo caso, il periodo di prova deve essere prolungato per ottenere almeno una crescita di 16 volte nelle colture di controllo, mentre la crescita deve essere esponenziale per tutto il periodo di prova. Il periodo di prova può essere abbreviato ad almeno 48 ore per mantenere una crescita esponenziale illimitata durante la prova, a condizione che il fattore minimo di moltiplicazione 16 sia raggiunto,

— il coefficiente medio di variazione per i tassi di crescita specifici «sezione per sezione» (giorni 0-1, 1-2 e 2-3, per le prove da 72 ore) nelle colture di controllo (cfr. la voce «coefficiente di variazione» al punto 1.2) non deve superare il 35 %. Per il calcolo del tasso di crescita specifico «sezione per sezione» consultare il secondo paragrafo del punto 2.2.1. Questo criterio si applica al valore medio dei coefficienti di variazione calcolato per le repliche delle colture di controllo,

— il coefficiente di variazione dei tassi medi specifici di crescita durante l'intero periodo di prova nelle repliche delle colture di controllo non deve superare il 7 % nelle prove con *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Desmodesmus subspicatus*. Per altre specie utilizzate con minore frequenza per le prove, il valore non deve superare il 10 %.

1.8. DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1. **Apparecchiature**

I contenitori di prova e le altre apparecchiature che entrano in contatto con le soluzioni di prova devono essere completamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Gli strumenti devono essere lavati accuratamente per assicurare che contaminanti organici o inorganici non possano interferire con la crescita delle alghe o la composizione delle soluzioni di prova.

I contenitori di prova sono normalmente palloni di vetro di dimensioni tali da consentire un volume sufficiente di colture per le misure durante la prova e un trasferimento sufficiente di massa di CO_2 dall'atmosfera (cfr. il secondo paragrafo del punto 1.8.9). Il volume liquido deve essere sufficiente per le determinazioni analitiche (cfr. il quinto paragrafo del punto 1.8.11).

Inoltre sono necessarie alcune o tutte le seguenti apparecchiature:

— apparecchiature per le colture: si consiglia un armadio o una camera in cui la temperatura di incubazione prescelta possa essere mantenuta a ± 2 °C.

— strumenti per la misurazione della luce: è importante notare che il metodo di misurazione dell'intensità della luce, e in particolare il tipo di recettore (collettore), influenzerà il valore misurato. È preferibile effettuare le misure utilizzando un recettore sferico (4 π) (che risponde alla luce diretta e riflessa da tutti gli angoli e sotto il piano di misurazione) o un recettore 2 π (che risponde alla luce da tutti gli angoli sopra il piano di misurazione).

▼M1

— apparecchiatura per determinare la biomassa delle alghe. Il conteggio delle cellule, il parametro alternativo più comunemente utilizzato per la biomassa delle alghe, può essere effettuato usando un contatore elettronico di particelle, un microscopio con camera di conteggio o un citometro a flusso. Altri parametri alternativi per la biomassa possono essere misurati usando un citometro a flusso, un fluorimetro, uno spettrofotometro o un colorimetro. Per effettuare il calcolo è utile un fattore di conversione che mette in relazione il conteggio delle cellule e il peso secco. Per fornire misure utili con basse concentrazioni di biomassa quando è utilizzato uno spettrofotometro può essere necessario usare cuvette con un percorso ottico minimo di almeno 4 cm.

1.8.2. **Organismi di prova**

Possono essere utilizzate diverse specie di microalghe e di cianobatteri che non formano aggregati. I ceppi di cui all'appendice 1 sono risultati idonei per l'uso del procedimento di prova specificato nel presente metodo di saggio.

Se sono usate altre specie, devono essere indicati il ceppo e/o l'origine. È necessario confermare che la crescita esponenziale dell'alga selezionata per la prova può essere mantenuta per tutto il periodo della prova nelle condizioni applicate.

1.8.3. **Mezzo di crescita**

Si consigliano due mezzi di crescita alternativi: quello dell'OCSE e quello dell'AAP. Le composizioni di questi mezzi sono illustrati all'appendice 2. Occorre notare che il valore iniziale del pH e la capacità tampone (regolazione dell'aumento del pH) di questi due mezzi sono diversi. I risultati delle prove possono pertanto variare in funzione del mezzo utilizzato, soprattutto nelle prove con sostanze ionizzanti.

Può risultare necessario modificare i mezzi di crescita per determinate finalità, per esempio per le prove su metalli o agenti chelanti o per le prove con valori di pH diversi. L'uso di un mezzo modificato deve essere descritto con precisione e giustificato (3)(4).

1.8.4. **Concentrazione iniziale della biomassa**

La biomassa iniziale deve essere la stessa in tutte le colture e sufficientemente bassa da permettere una crescita esponenziale per tutto il periodo di incubazione senza il rischio di esaurimento degli elementi nutritivi. La biomassa iniziale non deve superare 0,5 mg/l come peso secco. Si raccomandano le concentrazioni iniziali di cellule riportate di seguito:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3-10^4	cellule/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$	cellule/ml
Navicula pelliculosa	10^4	cellule/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	cellule/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	cellule/ml

1.8.5. **Concentrazioni della sostanza di prova**

L'intervallo di concentrazione nel quale possono verificarsi degli effetti può essere determinato sulla base dei risultati di prove eseguite per determinare l'intervallo di concentrazioni. Per la prova finale e definitiva devono essere selezionate almeno cinque concentrazioni disposte in una serie geometrica con un fattore non superiore a 3,2. Un fattore più elevato può essere giustificato per le sostanze di prova che mostrano una curva concentrazione-risposta piatta. È preferibile che la serie di concentrazione copra i valori che generano un'inibizione del 5-75 % del tasso di crescita delle alghe.

▼M1

1.8.6. **Repliche e controlli**

La prova deve comprendere tre repliche con ogni concentrazione prevista. Se non è necessario determinare il NOEC, la prova può essere modificata per aumentare il numero di concentrazioni e ridurre il numero di repliche per concentrazione. Le repliche di controllo devono essere almeno tre e idealmente dovrebbero essere il doppio delle repliche utilizzate per ogni concentrazione prevista dalla prova.

Può essere preparata una serie separata di soluzioni di prova per determinare analiticamente le concentrazioni delle sostanze di prova (cfr. i paragrafi 4 e 6 del punto 1.8.11).

Quando si utilizza un solvente per solubilizzare la sostanza di prova la prova deve comprendere controlli integrativi con la stessa concentrazione di solvente utilizzata nelle colture di prova.

1.8.7. **Preparazione della coltura dell'inoculo**

Per adattare le alghe alle condizioni di prova e assicurare che siano nella fase di crescita esponenziale quando sono utilizzate per inoculare le soluzioni di prova, 2-4 giorni prima dell'inizio della prova è preparata una coltura di inoculo nel mezzo di prova. La biomassa delle alghe deve essere adattata affinché la coltura dell'inoculo presenti una crescita esponenziale fino all'inizio della prova. La coltura dell'inoculo deve essere incubata nelle stesse condizioni delle colture di prova. È necessario misurare l'aumento della biomassa nella coltura dell'inoculo per garantire che la crescita rientri nella gamma normale del ceppo di prova nelle condizioni di coltura. L'appendice 3 presenta una descrizione della procedura per la coltura delle alghe. Per evitare le divisioni sincrone delle cellule durante la prova può essere necessaria una seconda fase di propagazione della coltura dell'inoculo.

1.8.8. **Preparazione delle soluzioni di prova**

Tutte le soluzioni di prova devono contenere le stesse concentrazioni del mezzo di crescita e la stessa biomassa iniziale delle alghe di prova. Le soluzioni di prova delle concentrazioni prescelte sono di solito preparate mescolando una soluzione madre della sostanza di prova con il mezzo di crescita e la coltura dell'inoculo. Di solito le soluzioni madri sono preparate dissolvendo la sostanza nel mezzo di prova.

Solventi quali l'acetone, l'alcol t-butilico e la dimetilformamide possono essere utilizzati come vettori per aggiungere sostanze a bassa idrosolubilità al mezzo di prova (2)(3). La concentrazione di solvente non deve superare il valore di 100 µl/l e la stessa concentrazione di solvente deve essere aggiunta a tutte le colture (comprese quelle di controllo) nella serie di prova.

1.8.9. **Incubazione**

I contenitori di prova sono provvisti di coperchi permeabili all'aria. I contenitori sono agitati e posti nell'apparecchiatura per le colture. Durante la prova è necessario mantenere le alghe in sospensione e agevolare il trasferimento di CO_2. A tal fine i contenitori sono agitati o il loro contenuto è rimescolato costantemente. Le colture devono essere mantenute a una temperatura compresa fra 21 e 24 °C, con uno scarto controllato di ± 2 °C. Per le specie diverse da quelle di cui all'appendice 1, come per esempio le specie tropicali, può essere opportuno utilizzare temperature più elevate, a condizione che i criteri di validità siano rispettati. Si raccomanda di posizionare i contenitori casualmente e di cambiarne ogni giorno la posizione all'interno dell'incubatore.

▼M1

Il pH del mezzo di controllo non deve aumentare di oltre 1,5 unità durante la prova. Per i metalli e i composti che ionizzano in parte a un pH attorno a quello della prova può essere necessario limitare l'evoluzione del pH per ottenere risultati riproducibili e chiaramente definiti. Un'evoluzione del pH inferiore a 0,5 unità è tecnicamente fattibile e può essere ottenuta assicurando un tasso di trasferimento adeguato di massa di CO_2 dall'aria circostante alla soluzione di prova, per esempio aumentando la frequenza dell'agitazione. Un'altra possibilità consiste nel ridurre la richiesta di CO_2 diminuendo la biomassa iniziale o la durata della prova.

La superficie su cui le colture sono incubate deve ricevere illuminazione fluorescente continua ed uniforme, per esempio del tipo «luce bianca fredda» o «luce naturale». I requisiti di illuminazione variano in funzione dei ceppi di alghe e dei cianobatteri utilizzati. L'intensità della luce deve essere adeguata all'organismo di prova utilizzato. Per le specie di alghe verdi raccomandate l'intensità della luce al livello delle soluzioni di prova deve essere selezionata nell'intervallo 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ quando è misurata in un intervallo di lunghezza d'onda che autorizza la fotosintesi di 400-700 nm utilizzando un recettore adeguato. Alcune specie, in particolare l'*Anabaena flos-aquae*, crescono bene con intensità di luce inferiore e possono essere danneggiate da intensità elevate. Per queste specie è opportuno scegliere un'intensità media della luce compresa nell'intervallo 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (per gli strumenti di misurazione della luce calibrati in un intervallo equivalente di 4 440-8 880 lux per la luce bianca fredda corrisponde approssimativamente all'intensità raccomandata della luce di 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). L'intensità della luce non deve variare di oltre il ± 15 % rispetto all'intensità media sull'area di incubazione.

1.8.10. **Durata della prova**

La prova dura normalmente 72 ore. Tuttavia, le prove possono avere durata inferiore o superiore, a condizione che tutti i criteri di validità di cui al punto 1.7 siano rispettati.

1.8.11. **Misure e determinazioni analitiche**

La biomassa delle alghe in ogni contenitore è determinata almeno quotidianamente durante il periodo di prova. Se le misure sono effettuate su piccoli volumi prelevati dalla soluzione di prova tramite una pipetta, i volumi in questione non devono essere rimessi nella soluzione.

La misura della biomassa è effettuata mediante conteggio manuale delle cellule al microscopio o con un contatore elettronico di particelle (conteggio delle cellule e/o biovolume). È possibile utilizzare tecniche alternative, come per esempio la citometria a flusso, la fluorescenza clorofilliana in vitro o in vivo (6)(7) o la densità ottica a condizione di poter dimostrare che esiste una correlazione soddisfacente con la biomassa per l'intervallo di biomassa utilizzato nella prova.

Il pH delle soluzioni è misurato all'inizio e al termine della prova.

Se è disponibile una procedura di analisi per determinare la sostanza di prova nella gamma di concentrazione utilizzata, le soluzioni di prova devono essere analizzate per verificare le concentrazioni iniziali e il mantenimento delle concentrazioni di esposizione durante la prova.

▼M1

L'analisi della concentrazione della sostanza di prova all'inizio e al termine della prova di una concentrazione bassa, di una concentrazione elevata e di una concentrazione attorno al valore EC_{50} previsto, può essere sufficiente se è probabile che le concentrazioni di esposizione varino meno del 20 % rispetto ai valori nominali durante la prova. Si raccomanda l'analisi di tutte le concentrazioni di prova all'inizio e al termine della prova quando è improbabile che le concentrazioni restino entro l'80-120 % del valore nominale. Per le sostanze di prova volatili, instabili o fortemente adsorbenti si raccomanda una campionatura integrativa per analisi a intervalli di 24 ore durante il periodo di esposizione per definire con maggiore efficacia la perdita della sostanza di prova. Per queste sostanze sono necessarie ulteriori repliche. In tutti i casi, la determinazione delle concentrazioni della sostanza di prova deve essere eseguita su un solo contenitore di replica per ogni concentrazione di prova (o sulla miscela dei contenuti dei recipienti delle repliche).

I mezzi di prova specificamente preparati per l'analisi delle concentrazioni di esposizione durante la prova devono essere trattati come quelli utilizzati per le prove, devono cioè essere inoculati con alghe e incubati alle stesse condizioni. Se occorre effettuare l'analisi della concentrazione della sostanza di prova dissolta, può essere necessario separare le alghe dal mezzo. È preferibile effettuare la separazione tramite centrifuga con debole forza di accelerazione, sufficiente per far sedimentare le alghe.

Se è dimostrato che per tutta la durata della prova la concentrazione della sostanza oggetto di prova è stata conservata in modo soddisfacente entro un margine del ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione misurata inizialmente, l'analisi dei risultati può essere basata sui valori nominali o su quelli misurati inizialmente. Se lo scarto rispetto alla concentrazione nominale o a quella misurata inizialmente è superiore a ± 20 %, l'analisi dei risultati deve basarsi sulla concentrazione ottenuta con la media geometrica durante l'esposizione o su modelli che descrivono il declino della concentrazione della sostanza di prova (3)(8).

La prova di inibizione della crescita delle alghe è un sistema più dinamico di altre prove di tossicità acquatica a breve termine. Di conseguenza, può essere difficile definire le concentrazioni reali di esposizione, soprattutto per le sostanze adsorbenti sottoposte a prova a basse concentrazioni. In questi casi, la scomparsa della sostanza dalla soluzione per assorbimento sulla biomassa crescente delle alghe non significa che la sostanza di prova sia scomparsa dal sistema di prova. Quando il risultato della prova è analizzato, è opportuno verificare se una diminuzione della concentrazione della sostanza di prova nel corso della prova è accompagnato da una diminuzione dell'inibizione della crescita. In caso affermativo può essere presa in considerazione la possibilità di applicare un modello adeguato per descrivere la diminuzione della concentrazione della sostanza di prova (8). In caso contrario, può essere opportuno basare l'analisi dei risultati sulle concentrazioni iniziali (nominali o misurate).

1.8.12. **Altre osservazioni**

Deve essere eseguita un'osservazione microscopica per verificare l'aspetto normale e sano della coltura dell'inoculo e osservare eventuali aspetti anormali delle alghe (causati per esempio dall'esposizione alla sostanza di prova) al termine della prova.

▼M1

1.8.13. **Prova limite**

In determinate circostanze, per esempio quando una prova preliminare indica che la sostanza di prova non ha effetti tossici in concentrazioni fino a 100 $mg \cdot l^{-1}$ o fino al limite di solubilità nel mezzo di prova (a seconda del valore più basso), può essere svolta una prova limite che consiste nel confrontare le risposte in un gruppo di controllo e in un gruppo trattato (100 $mg \cdot l^{-1}$ o una concentrazione uguale al limite di solubilità). È fortemente raccomandato di confermare il risultato mediante un'analisi della concentrazione di esposizione. Tutte le condizioni di prova precedentemente descritte e i criteri di validità si applicano a una prova limite, ad eccezione del fatto che le repliche del trattamento devono essere almeno sei. Le variabili di risposta nel gruppo di controllo e di trattamento possono essere analizzate con una prova statistica per confrontare le medie, per esempio con un test t di Student. Se le varianze dei due gruppi sono ineguali, è eseguito un test t adattato per varianze ineguali.

1.8.14. **Modifica per sostanze fortemente colorate**

L'irraggiamento (intensità della luce) deve avere i valori massimi della scala prescritta nel presente metodo di prova: 120μE m-2 s-1 o superiore.

Il percorso ottico deve essere abbreviato con riduzione del volume delle soluzioni di prova (nella gamma di 5-25 ml).

Occorre effettuare un'agitazione sufficiente (per esempio rimescolando moderatamente) per ottenere una frequenza elevata di esposizione delle alghe all'irraggiamento elevato sulla superficie della coltura.

2. **DATI**

2.1. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELLE CURVE DI CRESCITA

La biomassa dei contenitori di prova può essere espressa nell'unità del parametro di sostituzione utilizzato per misurarla (per esempio, numero di cellule, fluorescenza).

Si riportino in una tabella la concentrazione stimata della biomassa nelle colture di prova e di controllo, le concentrazioni della sostanza di prova e i tempi delle misure registrati con una precisione minima di un'ora, al fine di rappresentare graficamente le curve di crescita. Entrambe le scale logaritmica e lineare possono essere utili in questa prima fase, ma le scale logaritmiche sono indispensabili e generalmente danno una migliore rappresentazione delle variazioni del ritmo di crescita nel corso della prova. Si osservi che nella rappresentazione grafica la crescita esponenziale è espressa con una linea retta su scala logaritmica e che l'inclinazione (pendenza) di questa retta indica il tasso di crescita specifico.

Utilizzando i grafici risultanti, verificare se le colture di controllo si sviluppano nel corso dell'intera prova al ritmo esponenziale previsto. Esaminare attentamente tutti i punti e i grafici risultanti e verificare che i dati grezzi e i metodi utilizzati non siano falsati da errore. Verificare in particolare tutti i punti che sembrano scostarsi per un errore sistematico. Se appare evidente che il procedimento utilizzato comporta errori individuabili e/o molto probabili, lo specifico punto deve essere evidenziato come valore aberrante e non deve essere incluso nella successiva analisi statistica. (Una concentrazione algale nulla in uno dei due o tre contenitori trattati in modo identico può indicare che l'inoculazione non è avvenuta correttamente o che il contenitore non è stato pulito sufficientemente bene.) Le ragioni che giustificano l'esclusione di un punto perché considerato «valore aberrante» devono essere esposte chiaramente nella relazione di prova. Sono accettate soltanto le ragioni dovute a (rari) errori metodologici e non a mancanza di precisione. I metodi statistici di identificazione dei valori aberranti offrono una soluzione limitata a questo tipo di problema e non possono sostituire il giudizio dell'esperto. Preferibilmente, i valori aberranti (segnalati come tali) devono essere mantenuti nelle successive rappresentazioni grafiche o tabulari dei dati.

▼M1

2.2. VARIABILI DI RISPOSTA

Questa prova mira a determinare gli effetti della sostanza di prova sulla crescita delle alghe. Il metodo di prova descrive due variabili di risposta, giacché negli Stati membri esistono preferenze e requisiti normativi diversi. Affinché i risultati della prova siano accettabili in tutti gli Stati membri, gli effetti devono essere valutati in funzione delle due variabili di risposta (a) e (b) definite di seguito.

a) Tasso di crescita specifico medio: questa variabile di risposta è calcolata in base all'incremento logaritmico della biomassa durante il periodo sperimentale, espresso in giorni.

b) Rendimento: questa variabile di risposta corrisponde al valore della biomassa alla fine della prova dopo aver sottratto il valore della biomassa all'inizio della prova.

Per l'applicazione del presente metodo nel quadro normativo comunitario, il calcolo dei risultati deve essere basato su un tasso di crescita medio specifico per le ragioni di seguito illustrate. Giova osservare che i valori di tossicità calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzano i risultati della prova. I valori EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_x) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento (E_yC_x) se le condizioni sperimentali di questo metodo di prova sono rispettate, a causa del fondamento matematico dei due approcci. Questa differenza è dovuta soltanto al calcolo matematico, non si tratta di una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame. Il concetto del tasso di crescita specifico medio si basa sullo schema generale di crescita esponenziale delle alghe in colture non limitate, in cui la tossicità è valutata sulla base degli effetti sul tasso di crescita, senza tenere conto del livello assoluto del tasso di crescita specifico di controllo, della curva discendente di concentrazione-risposta o della durata della prova. I risultati basati sulla variabile di rendimento dipendono invece da tutte queste altre variabili. La E_yC_x dipende dal tasso di crescita specifico della specie di alga utilizzata in ciascuna prova e dal tasso di crescita specifico massimo, che può variare da una specie di alga all'altra, o da un ceppo all'altro. Questa variabile non deve essere utilizzata per confrontare la sensibilità alle sostanze tossiche delle specie o ceppi di alga. Seppure sia preferibile, dal punto di vista scientifico, valutare la tossicità in base al tasso di crescita specifico medio, il presente metodo propone anche stime basate sul rendimento per soddisfare i requisiti normativi vigenti in alcuni paesi.

2.2.1. **Tasso di crescita specifico medio**

Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'incremento logaritmico della biomassa, per ciascun contenitore dei gruppi trattati e di controllo, utilizzando la formula riportata di seguito:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (giorno}^{-1}\text{)}$$

in cui:

μ_{i-j}: è il tasso di crescita specifico medio dal momento *i* al momento *j*;

X_i: è la biomassa al momento *i*;

X_j: è la biomassa al momento *j*.

▼M1

Per ciascuno gruppo trattato e di controllo, calcolare un tasso di crescita a medio termine e le stime della varianza.

Calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo della prova (generalmente dal giorno 0 al giorno 3), prendendo come valore di partenza, il valore nominale della biomassa inoculata anziché il suo valore misurato, poiché ciò permette generalmente di ottenere una maggiore precisione. Se lo strumento utilizzato per misurare la biomassa consente di determinare con sufficiente precisione una piccola biomassa di inoculo (per esempio un citometro a flusso), può essere utilizzata la concentrazione della biomassa misurata inizialmente. Valutare anche il tasso di crescita «sezione per sezione», calcolato come i tassi di crescita specifici di ciascun giorno di prova (giorni 0-1, 1-2 e 2-3) e verificare se il tasso di crescita di controllo rimane costante (cfr. i criteri di validità, punto 1.7). Il fatto che il tasso di crescita specifico del primo giorno sia sensibilmente inferiore al tasso di crescita specifico medio può indicare una fase di latenza. Se è possibile ridurre al minimo e praticamente eliminare la fase di latenza nelle colture di controllo mediante un'adeguata propagazione della precoltura, la presenza di una fase di latenza nelle colture esposte può stare ad indicare una fase di recupero successiva ad uno choc tossico iniziale o un'esposizione ridotta causata da una perdita di sostanza di prova (compreso l'assorbimento sulla biomassa delle alghe) dopo l'esposizione iniziale. Il tasso di crescita «sezione per sezione» permette quindi di studiare i vari effetti della sostanza di prova durante il periodo di esposizione. Una differenza significativa tra il tasso di crescita «sezione per sezione» e il tasso di crescita medio sta a indicare l'esistenza di uno scarto rispetto alla crescita esponenziale costante, scarto che richiede un esame attento delle curve di crescita.

Si calcoli la percentuale di inibizione del tasso di crescita per ciascun replicato del gruppo trattato secondo la formula seguente:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

in cui:

$\%I_r$: è la percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio;

μ_C: è il valore medio del tasso di crescita specifico (μ) medio nel gruppo di controllo;

μ_T: è il tasso di crescita specifico medio di uno dei replicati del gruppo trattato.

Se le soluzioni di prova sono preparate utilizzando un solvente, per calcolare la percentuale di inibizione si devono utilizzare i controlli con solvente anziché i controlli senza solvente.

2.2.2. **Rendimento**

Il rendimento è calcolato in funzione della differenza tra il valore della biomassa alla fine della prova e il suo valore all'inizio della prova per ciascun contenitore dei gruppi trattati e di controllo. Per ciascuna concentrazione di prova e di controllo, calcolare un rendimento medio e le stime della varianza. La percentuale di inibizione del rendimento ($\%I_r$) può essere calcolata per ciascuna replica di ciascun gruppo trattato, secondo la formula seguente:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

in cui:

% I_y: è la percentuale di riduzione del rendimento;

Y_C: è il valore medio del rendimento nel gruppo di controllo;

Y_T: è il valore del rendimento di uno dei replicati del gruppo trattato.

2.3. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELLE CURVE CONCENTRAZIONE-RISPOSTA

Tracciare su un grafico la percentuale di inibizione in funzione del logaritmo della concentrazione della sostanza di prova e esaminare con attenzione i punti ottenuti, senza tenere conto dei punti eliminati perché considerati valori aberranti nel corso della prima fase. Interpolare, manualmente o con programma informatico, una curva regolare tra i punti per ottenere una prima impressione della relazione concentrazione-risposta e successivamente procedere con un metodo più dettagliato, preferibilmente un metodo statistico computerizzato. In funzione dell'impiego al quale i dati sono destinati, della qualità (precisione) e della quantità dei dati e della disponibilità di strumenti di analisi dei dati, si potrà decidere (in modo fondato in alcuni casi) di interrompere l'analisi dei dati in questa fase e prendere in considerazione soltanto le cifre chiave, vale a dire i valori EC_{50} e EC_{10} (e/o EC_{20}), della curva interpolata manualmente (cfr. anche il seguente punto sugli effetti di stimolazione). Valide ragioni per non ricorrere ad un metodo statistico possono includere:

— ai fini dell'affidabilità, i dati trattati con strumenti informatizzati non danno risultati più affidabili di quelli ottenuti in base all'analisi di un esperto — in queste circostanze, alcuni programmi informatici potrebbero persino non riuscire a fornire alcuna soluzione affidabile (le ripetizioni possono non convergere, ecc.),

— gli effetti che stimolano la crescita possono non essere trattati correttamente dai programmi informatici disponibili (cfr. infra).

2.4. METODI STATISTICI

L'obiettivo consiste nell'ottenere una relazione quantitativa della concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata dopo avere effettuato una trasformazione di linearizzazione dei dati di reazione — per esempio in unità probit, logit o Weibull (9), ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle irregolarità inevitabili dei valori e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (9). Occorre rilevare che i metodi analitici usuali che ricorrono alle trasformazioni probit, logit o Weibull sono destinati ad essere utilizzati con dati quantali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono essere modificati per poter essere utilizzati con i dati concernenti la crescita o la biomassa. Alcune procedure specifiche che consentono di determinare i valori EC_x a partire da dati continui sono reperibili nei riferimenti 10, 11 e 12. L'utilizzo di un'analisi della regressione non lineare è precisato nell'appendice 4.

▼M1

Per ciascuna variabile di risposta, utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori EC_x. Laddove possibile, determinare gli intervalli di confidenza a 95 % per ogni stima. La validità dell'adeguatezza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione dovrebbe essere valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni contenitore replicato e non sulle medie dei gruppi trattati. Tuttavia, se risulta difficile o impossibile interpolare una curva perché i dati sono troppo dispersi, si può in quel caso ricorrere ad una regressione sulle medie dei gruppi, il che consente di ridurre l'influenza dei valori che potrebbero essere aberranti. Il ricorso a questa opzione deve essere indicato nella relazione di prova come uno scostamento dalla procedura normale, dovuto al risultato insoddisfacente prodotto dall'interpolazione della curva con i valori dei singoli replicati.

Le stime della EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con *bootstrapping* (13), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.

Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, per gli effetti della sostanza di prova sul tasso di crescita, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla o un metodo di tendenza. Possono risultare utili i test di Dunnett o di William (14, 15, 16, 17, 18). È necessario controllare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Questo controllo può essere effettuato graficamente o con un test formale (18), come il test di Levene o di Bartlett. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi analitici come i test di tendenza regressivi di Jonkheere. Il riferimento 12 fornisce ulteriori informazioni sulla determinazione della NOEC.

Alcuni progressi recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali della EC_x basate sulla regressione. Per questa prova sulle alghe non sono stati fissati valori adeguati di x. Tuttavia, un intervallo tra il 10 e il 20 % sembra adeguato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile menzionare entrambi i valori EC_{10} e EC_{20}.

2.5. STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA

Si osserva a volte una stimolazione della crescita (inibizione negativa) a basse concentrazioni. Questo fenomeno può derivare da ormesi («stimolazione tossica») o dall'introduzione di fattori di stimolazione della crescita, trasportati dalla sostanza di prova, nel mezzo minimo utilizzato. Si noti che l'aggiunta di sostanze nutritive minerali non dovrebbe esercitare alcun effetto diretto dato che il mezzo di prova deve contenere un eccesso di sostanze nutritive nel corso della prova. La stimolazione a basse dosi può essere generalmente ignorata nei calcoli della EC_{50}, a meno che sia molto pronunciata. Tuttavia, se tale stimolazione è estrema o se si deve calcolare un valore EC_x per un valore basso di x, potrebbero essere necessarie procedure particolari. Si eviti, per quanto possibile, di eliminare dall'analisi dei dati le risposte minime della stimolazione e, se il software di interpolazione della curva non accetta una stimolazione di piccola entità, può essere usata un'interpolazione lineare mediante bootstrapping. Se la stimolazione è estrema, è possibile ricorrere a un modello di ormesi (19).

▼M1

2.6. INIBIZIONE NON TOSSICA DELLA CRESCITA

Le sostanze di prova che assorbono la luce possono dar luogo a una riduzione del tasso di crescita, poiché l'ombreggiatura diminuisce la quantità di luce disponibile. Occorre distinguere questi tipi di effetti fisici dagli effetti tossici modificando le condizioni sperimentali; menzionare i primi separatamente nella relazione. I riferimenti 2 e 3 danno indicazioni al riguardo.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SULLA PROVA

La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— stato fisico e proprietà fisico-chimiche pertinenti, compreso il limite di solubilità in acqua,

— dati di identificazione chimica, compresa la purezza.

Specie oggetto della prova:

— ceppo, fornitore o origine e condizioni di coltura utilizzate.

Condizioni sperimentali:

— data dell'inizio della prova e durata della prova,

— descrizione della prova: contenitori di prova, volumi delle soluzioni, densità della biomassa all'inizio della prova,

— composizione del mezzo,

— concentrazioni di prova e replicati (per esempio, numero di replicati, numero di concentrazioni di prova e progressione geometrica applicata),

— descrizione dei metodi di preparazione delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di solventi, ecc.,

— apparecchiatura per le colture,

— intensità e qualità dell'illuminazione (fonte, omogeneità),

— temperatura,

— concentrazioni testate: concentrazioni di prova nominali e tutti i risultati delle analisi volti a determinare la concentrazione della sostanza di prova nei contenitori di prova; devono essere indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione,

— tutte le deviazioni rispetto al metodo di prova,

— metodo di determinazione della biomassa e dimostrazione della correlazione tra il parametro misurato e il peso secco.

Risultati:

— valori del pH all'inizio e alla fine della prova in tutti i contenitori trattati,

— biomassa in ciascun contenitore in ciascun punto di prelievo e metodo di misurazione della biomassa,

▼M1

— curve di crescita (biomassa in funzione del tempo),

— calcolo delle variabili di risposta per ciascun replicato, con valore medio e coefficiente di variazione dei replicati,

— rappresentazione grafica del rapporto concentrazione-risposta,

— stima della tossicità per le variabili di risposta, per esempio EC_{50}, EC_{10} e EC_{20} e relativi intervalli di confidenza. Qualora siano calcolate, la LOEC e la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle,

— se è stata effettuata un'analisi della varianza (ANOVA), la portata dell'effetto individuabile (ovvero la differenza meno significativa),

— stimoli alla crescita eventualmente osservati in un gruppo trattato,

— altri effetti osservati, per esempio modifiche morfologiche delle alghe,

— analisi dei risultati, compresa l'influenza sul risultato del test risultante dagli scostamenti dal presente metodo di prova.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

2. ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

4. ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692

6. Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

7. Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

9. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

▼M1

10. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

11. Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

12. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

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

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

17. Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

18. Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

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

▼M1

Appendice 1

Specie dimostratesi idonee alla prova

Alghe verdi

— *Pseudokirchneriella subcapitata*, (già nota come *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (già nota come *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomee

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cianobatteri

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Fonti delle specie

Le specie raccomandate sono disponibili in colture unialgali dalle seguenti collezioni (in ordine alfabetico):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
STATI UNITI

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
REGNO UNITO

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
3400 Göttingen
GERMANIA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
STATI UNITI

▼M1

Aspetto e caratteristiche delle specie raccomandate

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspetto	singole cellule, curve e ritorte	per lo più singole cellule, ovali	bastoncelli	catene formate da cellule ovali	bastoncelli
Dimensioni (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume cellulare (μm^3/cell)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Peso secco cellulare (mg/cell)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Tasso di crescita (3) (giorno^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Misurato con un contatore elettronico di particelle.
(2) Calcolato sulla base delle dimensioni.
(3) Tasso di crescita generalmente osservato in mezzo OCSE esposto a un'intensità luminosa approssimativamente di 70 µE m^{-2} ·s^{-1} e a 21 °C.

Raccomandazioni particolari per la coltura e la manipolazione delle specie di prova raccomandate

Pseudokirchneriella subcapitata e *Desmodesmus subspicatus*

Queste alghe verdi sono generalmente facili da coltivare in vari terreni di coltura. Le collezioni di colture forniscono agli utenti informazioni sui terreni adeguati. Le cellule sono generalmente separate e la densità cellulare si misura facilmente con un contatore elettronico di particelle o microscopio.

Anabaena flos-aquae

La coltura madre si conserva in diversi terreni di coltura. In particolar modo si deve evitare che i batch di coltura abbiano superato la fase esponenziale di crescita al momento del rinnovo, poiché il recupero è difficile a questo punto.

L'*Anabaena flos-aquae* forma catene di cellule raccolte in spirali (aggregati). La dimensione di tali aggregati varia in funzione delle condizioni di coltura. Può essere necessario spezzare tali aggregati per contare le cellule al microscopio o con contatore elettronico di particelle, per determinare la biomassa.

Le catene di sottocampioni possono essere spezzate in vari punti mediante sonicazione, per ridurre la variabilità di calcolo. Processi di sonicazione più lunghi del necessario per spezzare le catene in piccoli segmenti potrebbero distruggere le cellule. L'intensità e la durata della sonicazione devono essere identiche per ciascuno gruppo trattato.

Per contribuire a compensare la variabilità si contino sufficienti campi nella griglia dell'emocitometro (almeno 400). Ciò aumenterà l'affidabilità delle determinazioni della densità al microscopio.

Dopo aver diviso le catene di cellule mediante attenta sonicazione, il volume cellulare totale di Anabaena può essere determinato utilizzando un contatore elettronico di particelle. La potenza della sonicazione deve essere regolata in modo da evitare di rompere le cellule.

Utilizzare un agitatore a vortice o strumento analogo per assicurare che la sospensione di alghe utilizzata per inoculare i contenitori di prova sia sufficientemente mescolata e omogenea.

▼M1

I contenitori di prova devono essere posti su tavoli scuotitori reciproci con moto rettilineo alternato o con moto rotatorio a circa 150 giri al minuto. In alternativa, l'*Anabaena* può anche essere agitata ad intermittenza al fine di evitare la formazione di aggregati. Qualora invece ciò avvenga, si provvederà a prelevare campioni rappresentativi ai fini della misurazione della biomassa. Un'agitazione vigorosa prima del prelievo può essere necessaria per disgregare gli ammassi di alghe.

Synechococcus leopoliensis

La coltura madre si conserva in diversi terreni di coltura. Le collezioni di colture forniscono informazioni agli utenti sui terreni adeguati.

La *Synechococcus leopoliensis* cresce formando bastoncelli isolati. La minuscola dimensione delle cellule ne rende difficile la conta al microscopio ai fini della misurazione della biomassa. In questo caso, è utile disporre di un contatore elettronico capace di contare particelle di dimensione fino a 1 μm. È applicabile anche la misurazione fluorimetrica in vitro.

Navicula pelliculosa

La coltura madre si conserva in diversi terreni di coltura. Le collezioni di colture forniscono informazioni agli utenti sui terreni adeguati. Si noti che in questo caso deve essere aggiunto silicato.

La *Navicula pelliculosa* può formare aggregati in alcune condizioni colturali. A causa della produzione lipidica, le cellule algali tendono a volte ad accumularsi nella pellicola che si forma in superficie. Se ciò avviene, si devono prendere misure apposite durante il prelievo di sottocampioni ai fini della determinazione della biomassa per garantire la rappresentatività dei campioni. Può risultare necessaria un'agitazione vigorosa, per esempio tramite un agitatore a vortice.

▼**M1**

Appendice 2

Mezzi di crescita

Può essere utilizzato uno dei due mezzi di crescita seguenti:

Mezzo OCSE: Mezzo originale della linea guida 201 dell'OCSE, conforme alla norma ISO 8692

Mezzo AAP dell'EPA (USA), conforme all'ASTM.

Nella preparazione di questi mezzi devono essere utilizzati reagenti o sostanze di grado «analitico» e acqua deionizzata.

Composizione del mezzo AAP (EPA USA) e di quello indicato nella linea guida 201 dell'OCSE

Componente	EPA		OCSE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) La relazione molare dell'EDTA sul ferro è leggermente superiore all'unità. Ciò impedisce al ferro di precipitare e minimizza allo stesso tempo la chelazione degli ioni di metalli pesanti.

Nella prova condotta sulla diatomea *Navicula pelliculosa*, ai due mezzi deve essere aggiunto $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$, per raggiungere una concentrazione di 1,4 Mg di Si/l.

Il pH del mezzo è ottenuto al punto di equilibrio tra il sistema carbonato del mezzo e la pressione parziale di CO_2 nell'aria atmosferica. Una relazione approssimativa tra il pH a 25 °C e la concentrazione molare di bicarbonato è espressa dalla seguente formula:

$$PH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

Con 15 mg/l $NaHCO_3$, pH_{eq} = 7,5 (mezzo USA-EPA) e con 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (mezzo OCSE).

Composizione degli elementi del mezzo di prova

Elemento	EPA	OCSE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparazione del mezzo di crescita OCSE

Sostanza nutritiva	Concentrazione nella soluzione madre
Soluzione madre 1: macroelementi	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Soluzione madre 2: ferro	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Soluzione madre 3: oligoelementi	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Soluzione madre 4: bicarbonato	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Le soluzioni madre sono sterilizzate mediante filtrazione su membrana (diametro medio dei pori: 0,2 μm) o con autoclavaggio (15 minuti a 120 °C). Conservare le soluzioni al buio e alla temperatura di 4 °C.

Le soluzioni madre 2 e 4 sono sterilizzate solo mediante filtrazione su membrana, non devono essere sottoposte ad autoclavaggio.

▼M1

Preparare il mezzo di crescita aggiungendo un volume adeguato delle soluzioni madre da 1 a 4 all'acqua:

Aggiungere a 500 ml di acqua deionizzata:

— 10 ml di soluzione madre 1

— 1 ml di soluzione madre 2

— 1 ml di soluzione madre 3

— 1 ml di soluzione madre 4

Portare a 1 000 ml con acqua deionizzata.

Attendere che il preparato raggiunga l'equilibrio con il CO_2 atmosferico, se necessario facendo gorgogliare aria sterile e filtrata per alcune ore.

Preparazione del mezzo di crescita AAP

A1.1. Aggiungere 1 ml di ciascuna soluzione madre di cui ai punti A1.2.1-A1.2.7 a circa 900 ml di acqua deionizzata o distillata, e diluire fino al volume di 1 litro.

A1.2. Preparare le soluzioni madre macronutrienti sciogliendo i seguenti composti in 500 ml di acqua deionizzata o distillata. I reagenti A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 e A1.2.4 possono essere combinati in un'unica soluzione madre.

A1.2.1. $NaNO_3$-12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$-6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$-2,205 g.

A1.2.4. *Soluzioni madre macronutrienti*-(cfr. A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4-0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$-7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$-Cfr. Nota A1.1.

Nota A1.1. Da utilizzare soltanto per le diatomee. Può essere aggiunto direttamente (202,4 mg) o tramite soluzione madre per raggiungere una concentrazione finale di 20 mg/l di Si nel mezzo di crescita.

A1.3. La soluzione madre macronutriente è preparata sciogliendo i seguenti composti in 500 ml di acqua deionizzata o distillata:

A1.3.1. H_3BO_3-92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$-207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$-1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$-79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$-0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$-3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$-0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$-150,000 mg.

[Disodio (etilendiamina-)tetracetato].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$-0,005 mg Cfr. Nota A1.2.

Nota A1.2. Da utilizzare soltanto nel mezzo di crescita per le soluzioni madre di diatomee.

A1.4. Regolare il pH a 7,5 ± 0,1 con 0,1 *N* o 1,0 *N* NaOH o HCl.

A1.5. Filtrare il mezzo in un contenitore sterile attraverso un filtro a membrana con pori di 0,22 μm se si utilizza un contatore di particelle, o attraverso un filtro con pori di 0,45 μm se non si utilizza il contatore di particelle.

A1.6. Conservare il mezzo di crescita al buio, alla temperatura di circa 4 °C fino all'utilizzo.

▼M1

Appendice 3

Esempio di metodo di coltura delle alghe

Osservazioni generali

La preparazione di colture sulla base del seguente procedimento mira a ottenere colture algali destinate ai test di tossicità.

Si devono usare metodi adatti per assicurare che le colture algali non siano infette da batteri. Sono auspicabili colture axeniche, ma devono essere utilizzate colture unialgali.

Tutte le operazioni devono essere eseguite in condizioni sterili per evitare ogni contaminazione con batteri o altre alghe.

Attrezzature e materiale

Cfr. Metodo di prova: attrezzature.

Metodo per ottenere colture algali

Preparazione di soluzioni nutritive (mezzo)

Tutti i sali minerali del mezzo sono preparati sotto forma di soluzioni madre concentrate e depositate al freddo e al riparo dalla luce. Queste soluzioni sono sterilizzate tramite filtrazione o con autoclavaggio.

Preparare il mezzo aggiungendo una quantità adeguata di soluzione madre all'acqua distillata sterile, facendo attenzione ad evitare ogni rischio di infezione. Per i mezzi solidi, aggiungere 0,8 % di agar.

Coltura madre

Le colture madri che fungono da materiale di prova iniziale sono piccole colture algali trasferite con regolarità su mezzo di crescita fresco. Nel caso in cui le colture non vengano utilizzate con regolarità, esse vanno strisciate su pezzi di agar in provette inclinate. Le colture sono trasferite su mezzo fresco almeno una volta ogni due mesi.

Le colture madri sono coltivate in matracci conici contenenti il mezzo adeguato (volume di circa 100 ml). Quando le alghe sono incubate a 20 °C con illuminazione continua è necessario un trasferimento settimanale.

Durante il trasferimento, una certa quantità di coltura «vecchia» viene trasferita con pipette sterili in una beuta contenente mezzo fresco; la quantità deve essere tale che, nel caso delle specie a crescita rapida, la concentrazione iniziale sia circa 100 volte inferiore di quella della coltura vecchia.

Il tasso di crescita di una specie può essere determinato dalla curva di crescita. Se questa è nota, è possibile stimare la densità alla quale la coltura deve essere trasferita ad un mezzo nuovo. Ciò deve essere fatto prima che la coltura raggiunga la fase di mortalità.

Precoltura

La precoltura serve a fornire un quantitativo di alghe sufficiente per l'inoculo delle colture di prova. La precoltura è incubata in condizioni sperimentali e utilizzata quando è ancora in crescita esponenziale, solitamente dopo un periodo di incubazione da 2 a 4 giorni. Qualora contengano cellule deformate o anomale, le colture algali devono essere scartate.

▼M1

Appendice 4

Analisi dei dati tramite regressione non lineare

Osservazioni generali

L'effetto osservato nelle prove sulle alghe e nelle altre prove di crescita di microrganismi (aumento della biomassa) è espresso, per sua natura, da una variabile continua o discreta; tale variabile è data dalla velocità del processo se si utilizza il tasso di crescita o dalla sua integrale in funzione del tempo se si sceglie la biomassa. Queste due variabili sono raffrontate con il corrispondente risultato medio osservato su repliche di non esposti che presentano l'effetto massimo alle condizioni imposte, in cui la luce e la temperatura sono i principali fattori determinanti nei test sulle alghe. Il sistema è distribuito o omogeneo e la biomassa può essere considerata un continuum, senza considerare le singole cellule. La distribuzione della varianza del tipo di risposta di tale sistema dipende soltanto dai fattori sperimentali (descritti generalmente dalle distribuzioni log-normale o normale dell'errore), contrariamente a quanto avviene negli esperimenti biologici classici i cui effetti sono espressi con dati quantali e per i quali spesso si presume che la tolleranza (generalmente con distribuzione binomiale) di ciascun organismo costituisca la componente dominante della varianza. In questo caso, le risposte di controllo hanno valore zero o quello del livello di fondo.

Nella situazione semplice, l'effetto normalizzato o relativo (r) diminuisce da 1 (inibizione nulla) a 0 (inibizione al 100 %). Si noti che tutti gli effetti hanno un errore associato e che le inibizioni negative evidenti possono essere calcolate come risultato del solo errore casuale.

Analisi della regressione

Modelli

Un'analisi della regressione mira a descrivere quantitativamente la curva concentrazione-risposta sotto forma di funzione matematica della regressione $Y = f(C)$ o, più frequentemente, $F(Z)$ dove $Z = \log C$. La funzione inversa, $C = f^{-1}(Y)$ permette di calcolare i valori EC_x, compresi i valori EC_{50}, EC_{10} e EC_{20}, e i corrispondenti intervalli di confidenza a 95 %. Molte funzioni matematiche semplici hanno dimostrato di descrivere correttamente la relazione concentrazione-risposta ottenuta nelle prove di inibizione della crescita delle alghe. Fra dette funzioni rientrano, per esempio, l'equazione logistica, l'equazione asimmetrica di Weibull e la distribuzione log-normale, che sono tutte curve sigmoidee che tendono asintoticamente a 1 per $C \rightarrow 0$ e a 0 per $C \rightarrow$ infinito.

L'utilizzo di modelli di funzioni soglia continue (per esempio il modello di Kooijman per «l'inibizione della crescita della popolazione», Kooijman et al, 1996) costituisce una soluzione proposta recentemente in alternativa ai modelli asintotici. Questo modello suppone che non si producano effetti a concentrazioni inferiori ad una certa soglia, EC0+, stimata tramite estrapolazione della relazione concentrazione-risposta che consiste nell'intercettare l'asse delle concentrazioni per mezzo di una funzione continua semplice non differenziabile al punto di partenza.

Giova notare che l'analisi può essere una semplice minimizzazione delle somme dei quadrati dei residui (supponendo che la varianza sia costante) o dei quadrati ponderati se l'eterogeneità della varianza è compensata.

▼M1

Procedimento

Scegliere un'equazione funzionale adeguata, Y = f (C), e interpolare i dati con una regressione non lineare. Utilizzare preferibilmente le misure rilevate in ciascuna beuta anziché i valori medi delle repliche, per trarre quante più informazioni possibile dai dati. D'altra parte, se la varianza è elevata, l'esperienza pratica induce a supporre che le medie delle repliche possono fornire una stima matematica più solida, meno influenzata dagli errori casuali dei dati rispetto a ciascun punto preso singolarmente.

Rappresentare su un grafico i valori misurati e la curva interpolata e verificare se l'interpolazione è adeguata. L'analisi dei valori residui può essere uno strumento particolarmente utile a questo proposito. Se la funzione scelta per interpolare la curva concentrazione-risposta non descrive l'intera curva o un segmento fondamentale di questa, per esempio l'effetto alle basse concentrazioni, si scelga un altro modello di interpolazione, per esempio una curva asimmetrica, quale la funzione di Weibull, anziché la funzione simmetrica. Le inibizioni negative possono porre problemi con, per esempio, la funzione di distribuzione log-normale, che richiede parimenti una funzione alternativa di regressione. È sconsigliato assegnare un valore nullo o un valore positivo di piccola entità a questi valori negativi perché ciò distorce la distribuzione degli errori. Per stimare i valori di EC_{xlow} può essere utile procedere a interpolazioni separate su parti della curva, per esempio il segmento in cui l'inibizione relativa è bassa. Sulla base dell'equazione interpolata (con «stima inversa», $C = f^{-1}(Y)$), calcolare stime specifiche caratteristiche della EC_x e riportare almeno la EC_{50} e una o due EC_{xlow}. L'esperienza maturata nelle prove pratiche ha dimostrato che la precisione della prova sulle alghe permette generalmente di ottenere una stima ragionevolmente precisa con soglia di inibizione del 10 % se i punti disponibili sono sufficientemente numerosi — a meno che non si produca una stimolazione alle basse concentrazioni, che renderebbe confusi i risultati della prova. La precisione della stima dei valori EC_{20} è spesso migliore di quelli EC_{10}, perché la EC_{20} si situa generalmente sulla parte quasi lineare della curva centrale concentrazione-risposta. A volte, la EC_{10} può essere difficile da interpretare a causa della stimolazione di crescita, di modo che, sebbene la EC_{10} si ottenga generalmente con una precisione sufficiente, si raccomanda di citare sempre anche la EC_{20}.

Fattori di ponderazione

In generale, la varianza sperimentale non è costante e include una componente proporzionale; per questo motivo risulta opportuno procedere regolarmente ad una regressione ponderata. I fattori di ponderazione per tale analisi sono generalmente considerati inversamente proporzionali alla varianza:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Molti programmi di regressione permettono di effettuare un'analisi della regressione ponderata con fattori di ponderazione riportati in una tabella. Per maggiore semplicità, conviene normalizzare i fattori di ponderazione moltiplicandoli per $n/\sum w_i$ (n è il numero dei punti) di modo che la loro somma risulti 1.

Normalizzare le risposte

La normalizzazione con il valore medio delle risposte pone alcuni problemi di principio e dà luogo ad una struttura della varianza piuttosto complicata. Dividendo i valori ottenuti dalle prove per il loro valore medio al fine di ottenere la percentuale di inibizione, si introduce un errore supplementare dovuto all'errore sulla media di controllo. A meno che l'errore non sia trascurabile, si devono correggere i fattori di ponderazione applicati alla regressione e gli intervalli di confidenza in funzione della covarianza con il controllo (17). Si sottolinea l'importanza di ottenere un'elevata precisione nella stima della media dei valori di controllo, per ridurre al minimo la varianza complessiva delle risposte relative. Tale varianza si calcola con la seguente formula:

▼M1

(il deponente $_i$ è riferito al livello di concentrazione i e il deponente $_0$ ai controlli)

$$Y_i = \text{Risposta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

con una varianza:

$$Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$$

e, giacché

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ and } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

con una distribuzione normale dei dati e delle repliche m_i e m_0:

$$Var(r_i) = \sigma^2/m_i$$

la varianza totale della risposta relativa, Y_i diventa quindi:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

L'errore sulla media dei controlli è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di repliche di controlli utilizzati per il calcolo della media, e a volte è giustificato includere dati storici, riducendo così l'errore in modo sensibile. Un metodo alternativo consiste nel non normalizzare i dati né interpolare i valori relativi alle risposte assolute, ivi comprese le risposte dei controlli, bensì introdurre il valore della risposta dei controlli come parametro aggiuntivo da interpolare mediante regressione non lineare. Con una consueta equazione di regressione a due parametri, questo metodo richiede l'interpolazione di 3 parametri e richiede pertanto più punti rispetto alla regressione non lineare su dati normalizzati utilizzando un valore predeterminato della risposta di controllo.

Intervalli di confidenza inversi

Il calcolo degli intervalli di confidenza di una regressione non lineare mediante una stima inversa è abbastanza complesso e generalmente non rientra fra le opzioni standard dei normali programmi di calcolo statistico. Intervalli di confidenza approssimativi possono essere ottenuti con programmi classici di regressione non lineare, tramite una riparametrizzazione (Bruce e Versteeg, 1992) consistente nel riformulare l'equazione matematica con le stime desiderate, per esempio la EC_{10} e la EC_{50}, come parametri da stimare. (Sia la funzione $I = f(\alpha, \beta, \text{concentrazione})$, si utilizzino le relazioni di definizione $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ e $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ per sostituire $f(\alpha, \beta, \text{concentrazione})$ con una funzione equivalente $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{concentrazione})$.

Un calcolo più diretto (Andersen et al, 1998) consiste nel mantenere l'equazione di origine e applicare un'espansione di Taylor attorno alle medie di r_i e r_0.

Negli ultimi anni si sono diffusi i metodi «bootstrapping». Questi metodi utilizzano i dati misurati e un ri-campionamento frequente diretto da un generatore di numeri casuali, per stimare la distribuzione empirica della varianza.

Bibliografia

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricoltural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

C.4. BIODEGRADAZIONE DETERMINAZIONE DELLA «PRONTA» (READY) BIODEGRADABILITÀ

PARTE I. CONSIDERAZIONI GENERALI

1.1. INTRODUZIONE

Vengono descritti sei metodi d'analisi che permettono di valutare la pronta biodegradabilità di composti chimici in un mezzo acquoso in condizioni aerobiche:

a) Carbonio organico disciolto (DOC) — rimozione lenta (Metodo C.4-A)

b) «Screening» OCSE modificato — rimozione lenta del DOC (Metodo C.4-B)

c) Sviluppo di biossido di carbonio (CO_2) — Saggio di Sturm modificato) (Metodo C.4-C)

d) Respirometria manometrica (Metodo C.4-E)

e) Bottiglia chiusa (Metodo C.4-E)

f) MITI (Ministero del Commercio Internazionale e dell'Industria — Giappone) (Metodo C.4-F)

Nella Parte I del metodo sono date indicazioni di carattere generale nonchè considerazioni comuni per tutti sei i saggi. Gli aspetti specifici dei metodi sono presentati nelle parti da II a VII. Gli allegati contengono definizioni, formule e materiale operativo.

Un saggio di confronto interlaboratori OCSE, effettuato nel 1988, ha mostrato che i metodi forniscono dei risultati coerenti. Tuttavia, secondo le caratteristiche fisiche della sostanza da saggiare, si può preferire l'uno o l'altro metodo.

1.2. SCELTA DEL METODO PIÙ APPROPRIATO

Allo scopo di scegliere il metodo più appropriato, è essenziale disporre di informazioni sulla solubilità, sulla tensione di vapore e sulle caratteristiche di adsorbimento del composto chimico. Dovrebbe essere nota la struttura chimica o la formula bruta per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOD, COD, misurati (si vedano gli allegati I e II).

I composti chimici da esaminare che sono solubili in acqua, ad una concentrazione di almeno 100 mg/l, possono essere valutati con tutti i metodi, a condizione che non siano volatili e non diano luogo a fenomeni di adsorbimento. Nella tabella n. 1 vengono riportati metodi idonei per quei composti chimici, volatili o adsorbibili, scarsamente solubili in acqua. Nell'allegato IH è descritto come si possono trattare i composti chimici scarsamente solubili in acqua e quelli volatili. Composti chimici moderatamente volatili possono essere controllati mediante il metodo di rimozione lenta del DOC se nei contenitori di prova si dispone di uno spazio gassoso sufficiente (che dovrebbe opportunamente tappato). In questo caso, è necessario eseguire anche un controllo abiotico per tener conto di eventuali perdite per fenomeni fisici.

▼B

Tabella 1

Applicabilità dei metodi di saggio

Saggio	Metodo analitico	Idoneità del metodo per sostanze:		
		scars. solub.	volatili	adsorbibili
Rimozione lenta DOC	Carbonio organico disciolto	—	—	+/–
Rimozione lenta OCSE modificato	Carbonio organico disciolto	—	—	+/–
Sviluppo CO_2	Respirometria: sviluppo CO_2	+	—	+
Respirometria manometrica	Respirometria manometrica: consumo d'ossigeno	+	+/–	+
Bottiglia chiusa	Respirometria: ossigeno disciolto	+/–	+	+
MITI	Respirometria: consumo d'ossigeno	+	+/–	+

Per interpretare i risultati ottenuti, in particolare quando i valori di biodegradabilità sono bassi o marginali, è necessario acquisire ulteriori informazioni riguardo alla purezza e alle proporzioni relative dei componenti principali del materiale da saggiare.

Informazioni sulla tossicità del composto chimico da saggiare, nei confronti dei batteri (vedi allegato IV), possono essere molto utili per una scelta mirata della concentrazione da sottoporre a saggio e per una corretta interpretazione dei bassi valori di biodegradazione.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Allo scopo di verificare la procedura, si controllano prodotti chimici di riferimento che rispettano i criteri di pronta biodegradabilità installando un pallone apportuno in parallelo come parte delle normali prove sperimentali.

Composti chimici adatti sono anilina (distillata di fresco), acetato di sodio e benzoato di sodio. Questi prodotti chimici di riferimento si degradano tutti in questi metodi anche quando non si aggiunga deliberatamente inoculo.

È stato suggerito che si dovrebbe cercare un prodotto chimico di riferimento che sia facilmente biodegradabile, ma che richieda l'aggiunta di un inoculo, anche nel saggio della bottiglia chiusa. È stato proposto l'idrogenoftalato di potassio, ma mancano le prove per accettare questa sostanza come sostanza di riferimento.

Nei saggi respirometrici, i composti contenenti azoto possono influire sull'assorbimento di ossigeno a causa della nitrificazione (si vedano gli allegati II e V).

1.4. PRINCIPIO DEI METODI DI SAGGIO

Una soluzione, o sospensione, della sostanza in esame in un mezzo minerale viene inoculata e incubata in condizioni aerobiche al buio o a luce diffusa. La quantità di DOC introdotta nella soluzione con l'inoculo dovrebbe essere quanto più bassa possibile in paragone alla quantità di DOC dovuta alla sostanza in esame. Per valutare l'attività endogena dell'inoculo, si eseguono, in parallelo, dei saggi in bianco con l'inoculo ma senza sostanze in esame, in quanto l'attività endogena delle cellule, in presenza della sostanza, non si concilia esattamente con quella del controllo. Un saggio con una sostanza di riferimento viene eseguito in parallelo per valutare l'efficacia della procedura.

▼B

In generale, la degradazione viene seguita mediante la determinazione di parametri significativi, come DOC, produzione di CO_2 e consumo dell'ossigeno. Le misure vengono effettuate ad intervalli sufficientemente frequenti per permettere l'identificazione della biodegradazione dall'inizio alla fine. Con respirometri automatici, la misurazione è continua. Il DOC viene misurato in aggiunta ad un altro parametro, di solito all'inizio e al termine della prova. Si può anche utilizzare un'analisi chimica specifica per valutare la degradazione primaria della sostanza in esame e per determinare la concentrazione delle eventuali sostanze intermedie formate (questa analisi è obbligatoria nel saggio MITI).

Normalmente la prova dura 28 giorni. Tuttavia è possibile terminare il saggio prima dei 28 giorni, per esempio appena la curva della degradazione biologica ha raggiunto un livello stazionario per almeno tre determinazioni. Le prove possono anche essere prolungate oltre i 28 giorni quando la curva mostra che la biodegradazione è iniziata ma che non si è ancora raggiunto lo stato stazionario al 28° giorno.

1.5. CRITERIO DI QUALITÀ

1.5.1. **Riproducibilità**

A causa della natura della biodegradazione e delle popolazioni batteriche miste usate come inoculi, le determinazioni devono essere eseguite almeno in doppio.

È esperienza comune che quanto più grande è la concentrazione di microorganismi aggiunti inizialmente al mezzo colturale, tanto minori saranno le variazioni tra le repliche. Prove di intercalibrazione tra laboratori hanno mostrato che vi possono essere grandi variazioni tra i risultati ottenuti da differenti laboratori, ma normalmente si ottiene un buon accordo con composti chimici di riferimento facilmente biodegradabili.

1.5.2. **Validità del saggio**

Il saggio viene considerato valido se la differenza tra i valori estremi delle prove in multiplo di rimozione del composto chimico in esame al «plateau», alla fine del saggio o alla fine della fase di crescita (rime window) di 10 giorni, è minore del 20 % e se la degradazione percentuale della sostanza di riferimento ha raggiunto il livello corrispondente alla «pronta» biodegradabilità in 14 giorni. Se non si verifica una di queste condizioni, la prova deve venire ripetuta. Data la rigorosità dei metodi, bassi valori non significano necessariamente che la sostanza in esame non sia biodegradabile nell'ambiente, ma che sarà necessario ulteriore lavoro per definire la biodegradabilità.

Se in un saggio di tossicità, contenente sia la sostanza in esame che un composto chimico di riferimento, in 14 giorni si verifica una degradazione inferiore al 35 % (in base al DOC) o minore del 25 % (in base a ThOD o $ThCO_2$), si deve supporre che i composti chimici in esame siano inibitorì (si veda anche l'allegato IV). Le prove dovrebbero essere ripetute, possibilmente con l'uso di una concentrazione minore di sostanza chimica in esame e/o una concentrazione più elevata di inoculo, ma non superiore a 30 mg per litro di solido.

1.6. PROCEDURE GENERALI E PREPARAZIONI

Le condizioni generali che valgono per le prove sono riassunte in Tabella 2. Le apparecchiature e le altre condizioni sperimentali valide per un particolare tipo di saggio sono descritte più avanti al paragrafo «saggio specifico».

▼B

Tabella 2

Condizioni sperimentali

Saggio	Rimozione lenta DOC	Sviluppo CO_2	Respirometria manometrica	Screenig OCSE tnodif.	Bottiglia chiuasa	MITI (I)
Concentrazione della sostanza in esame						
in mg/L			100		2-10	100
mg DOC/L	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/L			50-100		5-10	
Concentrazione dell'inoculo (in cellule/L, approssimata)	≤ 30 mg/l SS o ≤ 100 ml effluente/L (10^7-10^8)			0,5 ml effluente secondario/l (10^5)	≤ 5 ml di effluente/L (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Concentrazione di elementi nel mezzo minerale (in mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4± 0,2					preferibilmente 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = carbonio organico disciolto ThoD = domanda teorica ossigeno SS = solidi sospesi

1.6.1. **Acqua di diluizione**

L'acqua deionizzata o distillata, esente da concentrazioni inibitrici di sostanze tossiche (per esempio ioni Cu^{++}), è usata come solvente. Essa deve contenere non oltre il 10 % del carbonio organico introdotto mediante il materiale in esame. L'elevata purezza dell'acqua per il saggio è necessaria per eliminare valori di bianco elevati. La contaminazione può essere dovuta a impurezze intrinseche, all'impiego di resine a scambio ionico o a materiale lisato proveniente da batteri e alghe. Per ciascuna serie di saggi usare una sola partita d'acqua, controllata preventivamente mediante analisi DOC. Detto controllo non è necessario per il saggio della bottiglia chiusa, perchè il consumo dì ossigeno da parte dei microorganismi dell'acqua sia basso.

▼B

1.6.2. **Soluzioni «stock» dei sali minerali**

Per preparare le soluzioni per il saggio, devono essere preventivamente preparate delle soluzioni «stock» di appropriata concentrazione dei sali minerali. Possono essere usate le seguenti soluzioni «stock» (con differenti fattori di diluizione) per i metodi: rimozione lenta DOC, screening OCSE modificato, sviluppo di CO_2, respirometria manometrica, saggio della bottiglia chiusa.

I fattori di diluizione e, per il saggio MITI, la preparazione specifica del mezzo minerale sono indicati nei saggi specifici.

Soluzioni «stock»:

Preparare le seguenti soluzioni «stock» utilizzando reagenti puri per analisi.

(a)	Diidrogenoortofosfato monopotassico, KH_2PO_4	8,50 g
	Monoidrogenoortofosfato dipotassico, K_2HPO_4	21,75 g
	Monoidrogenoortofosfato disodico diidrato Na_2HPO_4. 2 H_2O	33,40 g
	Cloruro d'ammonio, NH_4Cl	0,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litroll pH della soluzione deve essere 7,4	
(b)	Cloruro di calcio anidro, $CaCl_2$	27,50 g
	O cloruro di calcio diidrato, $CaCl_2$- 2 H_2O	36,40 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(c)	Solfato di magnesio eptaidrato, $MgSO_4$. 7 H_2O	22,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(d)	Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3$. 6 H_2O	0,25 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro.	

Nota: allo scopo dì evitare di dover preparare questa soluzione immediatamente prima dell'uso, aggiungere una goccia di HCl concentrato o 0,4 g di acido etilendiamminotetra-acetico sale disodico (EDTA) per litro.

1.6.3. **Soluzioni «stock» di composti chimici**

Per esempio, sciogliere da 1 a 10 g, a seconda della sostanza chimica da saggiare o di riferimento in acqua deionizzata e portare a 1 litro quando la solubilità sia superiore a 1 g/l. Altrimenti, preparare soluzioni «stock» del mezzo minerale, oppure aggiungere la sostanza chimica direttamente al mezzo minerale. Per la solubilizza-zione dì composti chimici poco solubili, si veda l'allegato III, ma nel saggio MITI (Metodo C.4-F), non si devono usare nè solventi nè emulsionanti.

▼B

1.6.4. **Inoculi**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico (non clorate), acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi. Per i saggi di rimozione lenta del DOC, sviluppo di CO_2 e respirometria manometrica, se si usa fango attivo esso dovrebbe essere prelevato da un impianto di trattamento 0 da una unità su scala di laboratorio che riceva principalmente scarichi domestici. Si è visto che gli inoculi provenienti da altre fonti danno luogo ad una dispersione maggiore dei risultati. Per lo screening OCSE modificato e per il saggio della bottiglia chiusa occorre un inoculo più diluito senza fiocchi di fango; la fonte preferita è un effluente secondario di un impianto di trattamento delle acque di rifiuto domestiche o una rispettiva unità su scala di laboratorio. Per il saggio MITI l'inoculo viene ricavato da una miscela di fanghi di diversa provenienza ed è descritto nel paragrafo di questo saggio specifico.

1.6.4.1. *Inoculo da fanghi attivi*

Raccogliere un campione di fango attivo fresco dal serbatoio di aereazione di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente acque di origine domestica. Rimuovere, se necessario, le particelle grossolane mediante filtrazione attraverso un setaccio fine, e quindi mantenere il fango in condizioni aerobiche.

In alternativa, decantare o centrifugare (per esempio a 1 100 g per 10 minuti) dopo la rimozione di eventuali particelle grossolane. Scartare il surnatante. Il fango può essere lavato nel mezzo minerale. Sospendere il fango concentrato in mezzo minerale per ottenere una concentrazione di 3-5 g di solidi sospesi/l e aereare fino a quando è necessario.

Il fango dovrebbe essere prelevato da un impianto convenzionale ben funzionante. Se il fango è stato preso da un impianto ad alta potenzialità o si ritiene contenga inibitori dovrebbe essere lavato. Decantare o centrifugare il fango risospeso dopo accurata miscelazione, scartare il surnatante e risospendere il fango lavato in un volume ulteriore di terreno minerale. Ripetere questa procedura fino a quando il fango può essere considerato esente da eccesso di substrato e da inibitori.

Dopo avere ottenuto la completa risospensione, con fango non trattato, prelevare un'aliquota prima dell'uso per la determinazione del peso secco dei solidi sospensi.

Un'ulteriore alternativa è quella di omogeneizzare il fango attivo (3-5 g di solidi sospesi/l). Trattare il fango in un miscelatore meccanico per due minuti a velocità media. Decantare il fango miscelato per 30 minuti, o più a lungo se necessario, e utilizzare il liquido sovrastante per l'uso come inoculo nel rapporto di 10 ml/l nel mezzo minerale.

1.6.4.2. *Altre fonti di inoculo*

Esso può essere ottenuto da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio che riceve prevalentemente scarichi domestici. Raccogliere un campione fresco e mantenerlo in condizioni aerobiche durante il trasporto. Lasciare decantare per 1 ora o filtrare con carta da filtro grossolana e mantenere l'effluente decantato o il filtrato in condizioni aerobiche fino a quando è necessario. Si possono usare fino a 100 ml di questo tipo di inoculo per litro di mezzo minerale.

▼B

Una fonte alternativa per l'inoculo è l'acqua superficiale. In questo caso, raccogliere un'idonea quantità di campione acqua superficiale, per esempio acqua di fiume, di lago, e mantenerla in condizioni aerobiche fino a quando è necessario. Se è il caso, concentrare l'inoculo mediante filtrazione o centrifugazione.

1.6.5. **Precondizionamento degli inoculi**

Gli inoculi possono essere precondizionati alle condizioni sperimentali, ma non preadattati al composto chimico in esame. Il precondizionamento consiste nell'aereare fango attivo nel mezzo minerale o effluente secondario per 5-7 giorni alla temperatura di prova. Il precondizionamento migliora tavolta la precisione dei metodi sperimentali riducendo i valori del bianco. Sì ritiene non necessario precondizionare l'inoculo nel metodo MITI.

1.6.6. **Controlli abiotici**

Quando è necessario, controllare la possibile degradazione abiotica della sostanza in esame determinando la rimozione di DOC, l'assorbimento di ossigeno o lo sviluppo di biossido di carbonio in controlli sterili che non contengono inoculo. La sterilizzazione può essere fatta mediante filtrazione attraverso una membrana (0,2- 0,45 micrometri), mediante l'aggiunta di una sostanza tossica di idonea concentrazione. Se viene usata una membrana filtrante, prelevare i campioni in modo asettico per mantenerli sterili. A meno che l'adsorbimento della sostanza chimica saggiata non sia risultato precedentemente assente, i saggi che misurano la biodegradazione come rimozione del DOC (carbonio organico disciolto), specialmente con inoculi a fanghi attivi, dovrebbero includere un controllo abiotico con inoculo tossico.

1.6.7. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Il numero di contenitori usati in una prova tipo è descritto nei rispettivi metodi di ciascun saggio.

Possono essere usati i seguenti tipi di contenitori:

— sospensione: contenente la sostanza per il saggio e l'inoculo

— bianco: contenente solo l'inoculo

— controllo: contenente la sostanza di riferimento e l'inoculo

— controllo abiotico sterile: contenente la sostanza per il saggio sterile (vedi 1.6.6.)

— controllo dell'adsorbimento: contenente la sostanza per il saggio, l'inoculo e l'agente sterilizzante

— controllo della tossicità: contenente la sostanza per il saggio, la sostanza di riferimento e l'inoculo

Le determinazioni nella sospensione in esame e nel bianco dovrebbero essere fatti in parallelo. È consigliabile effettuare le determinazioni in parallelo negli altri contenitori al meglio.

Tuttavia ciò non sempre è possibile. Assicurarsi che vengano prelevati un numero sufficiente di campioni o vengano effettuate un numero sufficiente di letture per permettere di valutare la rimozione percentuale nell'arco di 10 giorni.

▼B

1.7. DATI E VALUTAZIONE

Nel calcolo della degradazione percentuale (D_t), si utilizzano i valori medi delle misure in doppio del parametro significativo nei recipienti di prova e nel bianco dell'inoculo. Le formule sono rappresentate nei paragrafi relativi ai saggi specifici. L'andamento della degradazione viene illustrato graficamente e con l'indicazione della fase di crescita (time window) di 10 giorni. Calcolare e riportare la rimozione percentuale ottenuta al termine della fase di crescita (time window) di 10 giorni e il valore raggiunto nella fase di stabilizzazione o al termine della prova, a seconda dei casi.

Nelle prove respirometriche, i composti che contengono azoto possono influire sul consumo di ossigeno a causa della nitrificazione (si vedano gli allegati II e V).

1.7.1. **Misura della degradazione mediante determinazione del DOC**

La percentuale di degradazione nel tempo (D_t) dovrebbe essere calcolata separatamente nei recipienti contenenti la sostanza da esaminare usando i valori medi della misura in doppio del DOC perché il saggio possa avere significato. Ciò può essere calcolato usando la seguente equazione:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

dove:

D_t = degradazione % al tempo t,

C_o = concentrazione iniziale media di DOC nel mezzo di coltura inoculato contenente la sostanza in esame (mg DOC/1),

C_t = concentrazione media di DOC nel mezzo di coltura inoculato contenente la sostanza in esame al tempo t (mg DOC/-1),

C_{bo} = concentrazione media iniziale di DOC ne! bianco del mezzo minerale inoculato (mg DOC/l),

C_{bt} = concentrazione media di DOC nel bianco del mezzo minerale inoculato al tempo t (mg DOC/l).

Tutte le concentrazioni sono misurate sperimentalmente.

1.7.2. **Misura della degradazione mediante analisi specifica**

Quando sono disponibili dati analitici specifici, calcolare la degradazione biologica primaria dalla relazione:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

dove:

D_t = degradazione % al tempo t, normalmente 28 giorni,

S_a = quantità residua di sostanza in esame nel terreno inoculato al termine della prova (mg),

S_b = quantità residua di sostanza in esame nella prova in bianco con acqua/mezzo minerale a cui è stata aggiunta solo la sostanza in esame (mg).

▼B

1.7.3. **Degradazione abiotica**

Se è usato un controllo abiotico sterile, calcolare la percentuale di degradazione abiotica usando:

$$\% \text{ di degradazione abiotica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

dove

$C_{s(0)}$ = concentrazione del DOC nel controllo sterile al giorno 0,

$C_{s(t)}$ = concentrazione del DOC nel controllo sterile al giorno t.

1.8. RELAZIONE

La relazione del saggio deve, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— sostanze chimiche sperimentali di riferimento, e loro purezza,

— condizioni del saggio,

— inoculo: natura e località del campionamento, concentrazione ed eventuale trattamento di precondizionamento,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nelle acque di scarico, se note,

— tempi di conduzione del saggio e temperatura,

— nel caso di sostanze chimiche scarsamente solubili, il tipo di trattamento adottato,

— metodo di saggio applicato; dovrebbero essere fornite ragioni scientifiche e una spiegazione per eventuali modifiche alla procedura,

— registrazione dei dati,

— dovrebbero essere indicati eventuali fenomeni di inibizione osservati,

— eventuale degradazione abiotica osservata,

— dati analitici chimici specifici, se disponibili,

— dati analitici sugli intermedi, se disponibili,

— grafico della degradazione percentuale in funzione del tempo per le sostanze in esame e per quelle di riferimento; la fase di latenza, la fase di degradazione, la fase di crescita (rime window) di 10 giorni e la pendenza devono essere indicate chiaramente (allegato I). Se il saggio ha rispettato il criterio di validità, per il grafico può essere usata la media della percentuale di degradazione dei recipienti contenenti la sostanza da esaminare,

— la rimozione percentuale dopo la fase di crescita (time window) di 10 giorni, nonché. La stabilizzazione o il termine della prova.

PARTE II. **SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC** (Metodo C.4-A)

II.1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato del mezzo minerale inoculato, contenente una concentrazione nota della sostanza in esame (10-40 mg DOC/l) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene aereato al buio o in luce diffusa a 22 ± 2 °C.

▼B

La degradazione viene seguita mediante analisi del DOC a intervalli regolari in un arco di tempo di oltre 28 giorni. Il grado di biodegradazione viene calcolato esprimendo la concentrazione di DOC rimossa (corretta del bianco di controllo dell'inoculo) in percento di concentrazione presente inizialmente. Il grado di degradazione biologica primaria può anche essere calcolato da una analisi chimica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

II.2. DESCRIZIONE DEL METODO

II.2.1. **Apparecchiatura**

a) Beute, per esempio, da 250 ml a 2 litri, secondo il volume necessario per l'analisi DOC;

b) tavola di agitazione — in grado di accogliere le beute, con controllo automatico della temperatura oppure disposta in un ambiente a temperatura costante — e di potenza tale da mantenere le condizioni aerobiche in tutte le beute;

c) apparecchio di filtrazione con membrane adatte;

d) analizzatore di DOC;

e) apparecchio per determinare l'ossigeno disciolto;

f) centrifuga.

II.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi 1.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

II.2.3. **Preparazione e precondizionamemo dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. e 1.6.5.

II.2.4. **Preparazione delle beute**

Introdurre, per esempio, porzioni da 800 ml di mezzo minerale in beute da 2 litri e aggiungere volumi sufficienti di soluzioni concentrate delle sostanze in esame e di riferimento a beute separate in modo da ottenere una concentrazione di sostanza chimica equivalente a 10-40 mg DOC/1. Controllare il valore del pH e correggerlo, se necessario, a pH = 7,4. Inoculare i palloni con fango attivo o altra fonte di inoculo (vedi I.6.4.), in modo da ottenere una concentrazione finale non superiore a 30 mg di solidi sospesi/l. Preparare inoltre controlli di inoculo in mezzo minerale senza il composto chimico in esame nè quello di riferimento.

Se necessario, usare un recipiente per controllare il possibile effetto inibitore della sostanza chimica in esame inoculando una soluzione contenente, nel mezzo minerale, concentrazioni confrontabili della sostanza chimica in esame e di quella di riferimento.

Inoltre, se richiesto, preparare un'ulteriore beuta sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi 1.6,6.).

▼B

In aggiunta, se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia adsorbita in modo significativo sul vetro, sul fango etc., effettuare una valutazione preliminare per determinare il grado probabile di adsorbimento e quindi l'idoneità del saggio per il composto chimico (vedi Tabella 1). Preparazione di un recipiente contenente la sostanza da esaminare, l'inoculo e l'agente sterilizzante.

Portare i volumi in tutte le beute a 11 con mezzo minerale, e, dopo miscelazione, prelevare un campione da ciascuna beuta per determinare la concentrazione iniziale di DOC (vedi allegato II.4). Coprire le aperture delle beute, per esempio, con un foglio di alluminio, in modo da permettere uno scambio libero di aria tra la beuta e l'atmosfera circostante. Inserire poi i contenitori nella tavola di agitazione e avviare il saggio.

II.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per l'adsorbimento

Recipiente 8: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

II.2.6. **Esecuzione del saggio**

Durante l'esecuzione del saggio, determinare la concentrazione di DOC in ciascuna beuta, in doppio, a intervalli di tempo noti, in modo sufficientemente regolare per poter determinare il momento di inizio della fase di crescita (time window) di 10 giorni e la rimozione percentuale al termine della fase dì crescita (time window) di 10 giorni. Prelevare solo il volume minimo necessario di sospensione di prova per ciascuna determinazione.

Prima del campionamento, compensare le perdite per evaporazione dalle beute mediante l'aggiunta di acqua di diluizione (I.6.1) nella quantità richiesta, se necessario. Miscelare il mezzo di coltura accuratamente prima di prelevare un campione e assicurarsi che il materiale eventualmente aderente alle pareti dei recipienti sia disciolto o sospeso prima del campionamento. Filtrare su membrana o centrifugare (vedi allegato II.4) immediatamente dopo aver prelevato il campione. Analizzare i campioni filtrati e centrifugati lo stesso giorno, altrimenti conservarli a 2-4 ^{o}C per un massimo di 48 ore o al di sotto di - 18 ^{o}C per un periodo più lungo.

II.3. DATI E RELAZIONE

II.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Calcolare la degradazione percentuale al tempo t come indicato al punto I.7.1. (determinazione del DOC) e (analisi specifica) punto I.7.2. facoltativa.

Trascrivere tutti i risultati su moduli predisposti.

▼B

II.3.2. **Validità dei risultati**

Vedi I.5.2.

II.3.3. **RELAZIONE**

Vedi 1.8.

II.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA CHIMICA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, t_0: ... mg/l come sostanza

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento applicato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **DETERMINAZIONI DEL CARBONIO**

Analizzatore di carbonio: ...

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Sostanza chemica in esame più inoculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					

▼B

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bianco dell'inoculo senza sostanza chemica in esame	3	C_1					
		C_2					
		C, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VALUTAZIONE DEI DATI GREZZI**

Beuta Nr		% degradazione dopo in giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

7. **CONTROLLO ABIOTICO** (facoltativo)

	Tempo (in giorni)	
	0	t
DOC conc. in (mg/L) nel controllo sterile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ di degradazione abiotica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALISI SPECIFICA DEL COMPOSTO CHIMICO** (facoltativa)

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Controllo sterile	S_b	

▼B

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Saggio del mezzo inoculato	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. **SAGGIO DI SCREENING OCSE MODIFICATO** (Metodo C.4-B)

III.l. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume noto di mezzo minerale contenente una concentrazione nota della sostanza in esame (10-40 mg DOC/1) come unica fonte nominale di carbonio organico viene inoculato con 0,5 ml di effluente per litro di mezzo minerale. La miscela viene aerata al buio o in luce diffusa a 22 ± 2 °C.

La degradazione viene seguita mediante analisi del DOC a intervalli regolari in un arco di tempo di 28 giorni. Il grado di biodegradazione viene calcolato esprimendo la concentrazione dì DOC rimossa (corretta del bianco di controllo dell'inoculo) in percento della concentrazione presente inizialmente. Il grado di degradazione biologica primaria può anche essere calcolato mediante analisi chimica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

III.2. DESCRIZIONE DEL METODO

III.2.1. Apparecchiatura

a) Beute, per esempio da 250 ml a 2 litri, secondo il volume necessario per l'analisi del DOC;

b) tavola di agitazione — in grado di accogliere le beute, con controllo automatico della temperatura oppure disposta in un ambiente a temperatura costante — e di potenza sufficiente a mantenere le condizioni aerobiche in tutte le beute;

c) apparecchio di filtrazione con membrane adatte;

d) analizzatore di DOC;

e) apparecchio per determinare l'ossigeno disciolto;

f) centrifuga.

III.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

In questo metodo si utilizzano solo 0,5 ml di effluente/litro come inoculo e pertanto può essere necessario integrare il terreno con oligoelementi e fattori di crescita aggiungendo 1 ml per ciascuna delle seguenti soluzioni per litro di terreno finale.

▼B

Soluzione di oligoelementi:

Solfato di manganese tetraidrato, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Acido borico, H_3BO_3	57,2 mg
Solfato di zinco eptaidrato, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Eptamolibdato d'ammonio, $(NH_4)_6 MO_7O_{24}$	34,7 mg
Chelato di Fe ($FeCl_3$ acido etilendiammino-tetraacetico)	100,0 mg

Sciogliere in un matraccio e portare a 1 000 ml con acqua di diluizione.

Soluzione di vitamine:

Estratto di lievito	15,0 mg

Sciogliere l'estratto di lievito in 100 ml di acqua e sterilizzare attraverso una membrana da 0,2 micron, preparare la soluzione al momento dell'uso.

III.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo è ottenuto da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da un'unità pilota di laboratorio alimentata prevalentemente da scarichi domestici.

È usato in ragione di 0,5 ml/l di mezzo minerale. Vedi I.6.4.2. e I.6.5.

III.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Introdurre, per esempio, porzioni da 800 ml di mezzo minerale in beute da 2 litri e aggiungere volumi sufficienti di soluzioni stock delle sostanze in esame e di riferimento a beute separate in modo da ottenere una concentrazione di sostanza chimica equivalente a 10-40 mg DOC/l. Controllare il valore del pH e correggerlo, se necessario, a pH = 7,4. Inoculare le beute con effluente di acque di scarico (0,5 ml/litro) (vedi I.6.4.2.). Preparare inoltre controlli dell'inoculo nel mezzo minerale senza le sostanze chimiche in esame e di riferimento.

Se necessario, usare un recipiente per controllare il possibile effetto inibitore della sostanza chimica in esame inoculando una soluzione contenente, nel mezzo minerale, concentrazioni confrontabili della sostanza chimica in esame e di quella di riferimento.

Inoltre, se richiesto, preparare un'ulteriore beuta sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi I.6.6.).

In aggiunta, se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia adsorbita in modo significativo sul vetro, sul fango ecc, effettuare una valutazione preliminare per determinare il grado probabile di adsorbimento e quindi l'idoneità del saggio per il composto chimico (vedi Tabella 1). Preparazione di un recipiente contenente la sostanza da esaminare, l'inoculo e l'agente sterilizzante.

Portare i volumi in tutte le beute a 1 l con mezzo minerale, e, dopo miscelazione, prelevare un campione da ciascuna beuta per determinare la concentrazione iniziale di DOC (vedi allegato II.4). Coprire le aperture delle beute, per esempio con un foglio di alluminio, in modo da permettere uno scambio libero di aria tra la beuta e l'atmosfera circostante. Inserire poi i recipienti nella tavola di agitazione e avviare il saggio.

▼B

III.2.5. **Numero di contenitori usati in una prova tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per l'adsorbimento

Recipiente 8: controllo per la tossicità

Vedi 1.6.7.

III.2.6. **Esecuzione del saggio**

Durante l'esecuzione del saggio, determinare la concentrazione di DOC in ciascuna beuta, in doppio, a intervalli di tempo noti, in modo sufficientemente regolare per poter determinare il momento di inizio della fase di crescita (time window) di 10 giorni e la rimozione percentuale al termine della fase di crescita (time window) di 10 giorni. Prelevare solo il volume mìnimo necessario dì sospensione di prova per ciascuna determinazione.

Prima del campionamento, compensare le perdite per evaporazione dalle beute mediante l'aggiunta di acqua di diluizione (I.6.1), se necessario, nella quantità richiesta. Miscelare il mezzo di coltura accuratamente prima di prelevare un campione e assicurarsi che il materiale eventualmente aderente alle pareti dei recipienti sia disciolto o sospeso prima del campionamento. Filtrare su membrana o centrifugare (vedi allegato II.4) immediatamente dopo aver prelevato il campione. Analizzare i campioni filtrati e centrifugati lo stesso giorno, altrimenti conservarli a 2-4 ºC per un massimo di 48 ore o al di sotto di - 18 ºC per un periodo più lungo.

III.3. DATI E RELAZIONE

III.3.1. **Trattamento dei risultati**

Calcolare la degradazione percentuale al tempo t come indicato al punto I.7.1. (determinazione del DOC) e, facoltativamente, al punto I.7.2. (analisi specifica).

Trascrivere tutti i risultati su moduli predisposti.

III.3.2. Validità dei risultati

Vedi I.5.2.

III.3.3. RELAZIONE

Vedi I.8.

III.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo.

SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC SCREENING OCSE MODIFICATO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

▼B

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, t_o: ... mg/l come sostanza

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento applicato: ... mg/l

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. DETERMINAZIONI DEL CARBONIO

Analizzatore di carbonio: ...

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Sostanza chimica in esame più inoculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Bianco dell'inoculo senza sostanza chimica in esame	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VALUTAZIONE DEI DATI GREZZI**

Beuta n.		% degradazione dopo n giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Beuta n.		% degradazione dopo n giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

7. **CONTROLLO ABIOTICO** (facoltativo)

	Tempo (in giorni)	
	0	t
DOC conc. in mg/L nel controllo sterile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

% di degradazione abiotica $= \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$

8. **ANALISI SPECIFICA DEL COMPOSTO CHIMICO** (facoltativa)

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Controllo sterile	S_b	
Saggio del mezzo inoculato	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. SAGGIO DI SVILUPPO DEL CO_2 (Metodo C.4-C)

IV.1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato di mezzo minerale inoculato contenente una concentrazione nota della sostanza chimica in esame (10-20 mg DOC o TOC/l) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene aerato mediante il passaggio di aria esente da biossido di carbonio ad una portata controllata, al buio o a luce diffusa. La degradazione viene seguita per 28 giorni determinando il biossido di carbonio prodotto, che viene assorbito su idrossido di bario o di sodio e che viene misurato per titolazione dell'idrossido di bario residuo o come carbonio inorganico. La quantità di biossido di carbonio prodotta dalla sostanza chimica in esame (corretta, per tener conto di quella derivante dal bianco dell'inoculo) viene espressa come percentuale di $ThCO_2$. Il grado di degradazione biologica può anche essere calcolato da un'analisi DOC supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

▼B

IV.2. DESCRIZIONE DEL METODO

IV.2.1. **Apparecchiatura**

a) Palloni, 2-5 litri, dotati ciascuno di un tubo di aerazione che giunge quasi al fondo del recipiente e di una uscita;

b) agitatori magnetici quando la valutazione viene effettuata su sostanze chimiche scarsamente solubili;

c) bottiglie per l'assorbimento di gas;

d) dispositivo per controllare e misurare il flusso d'aria;

e) apparecchio per la rimozione del biossido di carbonio per la preparazione d'aria esente da biossido di carbonio; in alternativa, una miscela di ossigeno esente da CO_2 e azoto esente da CO_2 prelevata da bombole di gas nelle proporzioni corrette (20 % O_2:80 % N_2);

f) dispositivo per la determinazione del biossido di carbonio, o per titolazione o mediante qualche tipo di analizzatore del carbonio inorganico;

g) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

h) analizzatore del DOC (facoltativo).

IV.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

IV.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. e I.6.5.

IV.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Per esempio, i seguenti volumi e pesi indicano i valori per palloni da 5 litri contenenti 3 litri di sospensione. Se si utilizzano volumi più piccoli, modificare proporzionatamente i valori, ma assicurarsi che il biossido di carbonio formato possa venire misurato con accuratezza.

In ciascun pallone da 5 litri introdurre 2 400 ml di mezzo minerale. Aggiungere un volume appropriato del fango attivo preparato (vedi I.6.4.1. e I.6.5.) in modo da ottenere una concentrazione di solidi sospesi non maggiore di 30 mg/l nei 3 litri finali di miscela inoculata. In alternativa, diluire per prima cosa il fango preparato in modo da ottenere una sospensione a 500-1 000 mg/l nel mezzo minerale prima di aggiungerne un'aliquota al contenuto del pallone da 5 litri per realizzare una concentrazione di 30 mg/l; questo assicura una maggior precisione. È possibile usare altre fonti di inoculo (vedi I.6.4.2.).

Aerare queste miscele inoculate con aria esente da CO_2 per una notte in modo da bonificare il sistema dal biossido di carbonio.

▼B

Aggiungere il materiale in esame e la sostanza di riferimento, separatamente, come volumi noti delle soluzioni concentrate ai palloni in multiplo, in modo da ottenere concentrazioni, fornite dalle sostanze chimiche aggiunte, da 10 a 20 mg di DOC o TOC/l; lasciare alcuni palloni senza aggiunta di sostanze chimiche come controlli dell'inoculo. Aggiungere le sostanze chimiche in esame, scarsamente solubili, direttamente nei palloni in una percentuale in peso o in volume, oppure trattarle come descritto nell'allegato III.

Se richiesto, usare un pallone per controllare il possibile effetto inibitore della soluzione chimica in esame aggiungendo le sostanze chimiche in esame e di riferimento alle stesse concentrazioni alle quali sono presenti negli altri palloni.

Inoltre, se richiesto, utilizzare un pallone sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente, utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi I.6.6.). Sterilizzare mediante l'aggiunta di una sostanza tossica ad una idonea concentrazione.

Portare i volumi delle sospensioni in tutti i palloni a 3 l mediante l'aggiunta del mezzo minerale preventivamente aerato con aria esente da CO_2. In alternativa, si possono prelevare dei campioni per l'analisi del DOC (vedi allegato II.4.) e/o per l'analisi specifica. Collegare le bottiglie di assorbimento alle uscite dell'aria dei palloni.

Se si utilizza idrossido di bario, collegare tre bottiglie di assorbimento, contenenti ciascuna 100 ml di soluzione 0,0125 M di idrossido di bario, in serie con ciascun pallone da 5 l. La soluzione deve essere esente da solfati e carbonati precipitati e la sua concentrazione deve essere determinata immediatamente prima dell'uso. Se si utilizza idrossido di sodio, collegare due recipienti di cattura, dove il secondo agisce da controllo per verificare che tutto il biossido di carbonio è stato assorbito nel primo. Sono adatte bottiglie di assorbimento con chiusure per bottiglie da siero. Aggiungere 200 ml di idrossido di sodio 0,05 M a ciascuna bottiglia, quantità sufficiente per assorbire la quantità totale di biossido di carbonio sviluppata quando la sostanza chimica in esame è completamente degradata. La soluzione di idrossido di sodio, anche quando è stata preparata di fresco, conterrà tracce di carbonati; questo valore viene corretto sottraendo il carbonato contenuto nel bianco.

IV.2.5. **Numero di palloni usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

IV.2.6. **Esecuzione del saggio**

Iniziare la prova facendo gorgogliare aria esente da CO_2 attraverso le sospensioni ad una portata di 30-100 ml/min. Prelevare periodicamente dei campioni dal contenitore che assorbe il biossido di carbonio per l'analisi del contenuto di CO_2. Durante i primi 10 giorni si raccomanda di effettuare l'analisi ogni due o tre giorni, poi ogni cinque giorni fino al ventottesimo giorno in modo da poter identificare la fase di crescita (time window) di 10 giorni.

▼B

Al ventottesimo giorno, prelevare dei campioni (facoltativamente) per l'analisi del DOC e/o l'analisi specifica, misurare il pH delle sospensioni e aggiungere 1 ml di acido cloridrico concentrato a ciascun contenitore; aerare i contenitori per una notte per scacciare il biossido di carbonio presente nelle, sospensioni in esame. Al giorno ventinovesimo eseguire l'ultima analisi del biossido di carbonio sviluppato.

Nei giorni di misura del CO_2, scollegare l'assorbitore dell'idrossido di bario più vicino al pallone e titolare la soluzione di idrossido con HCl 0,05 M utilizzando fenolftaleina come indicatore. Spostare gli assorbitori rimanenti di un posto verso il pallone e porre un nuovo assorbitore contenente 100 ml di idrossido di bario 0,0125 M fresco all'estremità più lontana della serie. Effettuare le titolazioni quando necessario, per esempio quando si vede una sostanziale precipitazione nella prima trappola e prima che sia evidente una precipitazione nella seconda, oppure almeno ogni settimana. In alternativa, con NaOH come assorbente, prelevare con una siringa una piccola aliquota di campione (secondo le caratteristiche dell'analizzatore di carbonio usato) della soluzione di idrossido di sodio nell'assorbitore più vicino al pallone. Iniettare il campione nella parte per il carbonio inorganico dell'analizzatore di carbonio ed effettuare direttamente l'analisi del biossido di carbonio sviluppato.

Analizzare il contenuto della seconda trappola solo al termine del saggio per correggere eventuali trascinamenti di biossido di carbonio.

IV.3. DATI E RELAZIONE

IV.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

La quantità di CO_2 catturata nell'assorbitore al momento della titolazione è data da:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

in cui:

V = volume di HCl utilizzato per la titolazione dei 100 ml nell'assorbitore (ml),

C_B = concentrazione della soluzione di idrossido di bario (M),

C_A = concentrazione della soluzione di acido cloridrico (M),

se C_B è 0,0125 MeCA è 0,05 M, la titolazione per 100 ml di idrossido di bario è 50 ml e il peso di CO_2 è dato da:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titolato} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Così, in questo caso, il fattore di conversione del volume di HCl titolato in mg di CO_2 prodotta è 1,1.

Calcolare i pesi di CO_2 prodotto dall'inoculo da solo e dall'inoculo più la sostanza chimica in esame utilizzando i rispettivi valori di titolazione; la differenza è il peso di CO_2 prodotto dalla sostanza chimica in esame da sola.

Per esempio, se l'inoculo da solo fornisce una titolazione di 48 ml e l'inoculo più sostanza chimica in esame fornisce 45 ml.

CO_2 dall'inoculo = 1,1 × (50 - 48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 dall'inoculo più sostanza chimicain esame= 1,1 × (50 - 45) = 5,5 mg

e così il peso di CO_2 prodotto dalla sostanza chimica in esame è 3,3 mg.

La degradazione biologica percentuale si calcola da:

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodotti} \times 100}{\text{Th}CO_2 \text{ prodotti mgdi sostanza chimica in esame aggiunta}}$$

o,

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodotti} \times 100}{\text{mg TOC aggiunti nella prova} \times 3,67}$$

dove 3,67 è il fattore di conversione (44/12) da carbonio a biossido di carbonio.

Ricavare la degradazione percentuale dopo ogni intervallo di tempo aggiungendo la percentuale dei valori di $ThCO_2$ calcolati per ciascuno dei giorni in cui è stata misurata fino a quel momento.

Per gli assorbitori all'idrossido di sodio, calcolare la quantità di biossido di carbonio prodotto, espressa come 1C (mg), moltiplicando la concentrazione di IC nell'assorbente per il volume dell'assorbente.

Calcolare la degradazione percentuale dalla:

$$\% \text{ Th}CO_2 = \frac{\text{mg IC del pallone di prova} - \text{mg IC del bianco}}{\text{mg TOC aggiunti come sostanza chimica in esame}} \times 100$$

Calcolare il grado di rimozione del DOC (facoltativo) come descritto al punto 1.7. Registrare questi risultati, e tutti gli altri, sui registri forniti.

IV.3.2. **Validità dei risultati**

Il contenuto di carbonio inorganico nella sospensione della sostanza chimica in esame nel mezzo minerale all'inizio della prova deve essere minore del 5 % del carbonio totale e lo sviluppo totale di CO_2 nel bianco dell'inoculo al termine della prova non dovrebbe normalmente superare i 40 mg/l di terreno. Se si ottengono valori maggiori di 70 mg CO_2/l, si dovrebbero esaminare criticamente i dati e la tecnica sperimentale.

Vedi anche I.5.2.

IV.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

IV.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DI SVILUPPO DEL BIOSSIDO DI CARBONIO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

▼B

Concentrazione iniziale nel mezzo: ... mg/l come sostanza

C totale aggiunto al contenitore: ... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **PRODUZIONE DI BIOSSIDO DI CARBONIO E DEGRADABILITÀ**

Metodo: $Ba(OH)_2$/NaOH/altro: ...

Tempo (giorno)	CO_2 formato prova (mg)		CO_2 formato bianca (mg)		CO_2 formato kumulativo (mg)		% $ThCO_2$ cumulativo $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	media	3 / 4	media	1	2	1	2	media
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: formati simili possono essere usati per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

6. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio:

Tempo (giorno)	Bianco mg/l	Sostanza chimica in esame mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) 0 al termine dell'incubazione

▼B

$$\% \text{ DOC rimosso } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAZIONE ABIOTICA** (facoltativa)

$$\% \text{ degradazione abiotica } = \frac{\text{Formazione di } CO_2 \text{ contenitore sterile dopo 28 giorni (mg)}}{ThCO_2(mg)} \times 100$$

PARTE V. **SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO** (Metodo C.4-D)

V. 1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato di mezzo minerale inoculato, contenente una concentrazione nota della sostanza chimica in esame (100 mg/l della sostanza chimica in esame in modo da fornire almeno 50-100 mg ThOD/1) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene tenuto sotto agitazione in un contenitore chiuso a temperatura costante (± 1 °C o meno) per un tempo fino a 28 giorni. Il consumo di ossigeno viene determinato o misurando la quantità di ossigeno (prodotto elettroliticamente) necessario per mantenere costante il volume di gas nel contenitore del respirometro, oppure dalla variazione di volume o di pressione (o da una combinazione delle due variazioni) nell'apparecchiatura. Il biossido di carbonio sviluppato viene assorbito in una soluzione di idrossido di potassio o un altro assorbente adatto. La quantità di ossigeno consumata dalla sostanza chimica in esame (corretta del consumo del bianco dell'inoculo, controllato in parallelo) viene espressa in percentuale di ThOD o COD. In alternativa, la degradazione primaria può anche essere calcolata mediante analisi specifica supplementare fatta all'inizio e alla fine dell'incubazione e la degradazione ultima mediante analisi del DOC.

V.2. DESCRIZIONE DEL METODO

V.2.1. **Apparecchiatura**

a) Adatto respirometro;

b) sistema di regolazione della temperatura che mantenga ± 1 °C, o miglio;

c) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

d) analizzatore di carbonio (facoltativo).

V.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

V.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., 1.6.4.1., I.6.4.2. e I.6.5.

V.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Preparare separatamente le soluzioni delle sostanze chimiche in esame e di riferimento nel mezzo minerale, normalmente equivalenti ad una concentrazione di 100 mg di sostanza chimica/1 (che forniscono almeno 50-100 mg ThOD/1) utilizzando le soluzioni concentrate (stock).

▼B

Calcolare la ThOD sulla base della formazione di sali di ammonio, salvo che si preveda una nitrificazione, nel qual caso il calcolo dovrebbe essere basato sulla formazione di nitrati (vedi allegato H.2.).

Determinare i valori di pH e, se necessario, regolare a pH = 7,4± 0,2.

Sostanze scarsamente solubili dovrebbero essere aggiunte in una fase più avanzata (vedi nel seguito).

Se si deve determinare la tossicità della sostanza chimica in esame, preparare una ulteriore soluzione nel mezzo minerale contenente sia la sostanza chimica in esame che quella di riferimento alle stesse concentrazioni delle singole soluzioni.

Se è richiesta una misura dell'assorbimento chimico-fisico dell'ossigeno, preparare una soluzione sterile della sostanza chimica in esame ad una concentrazione, normalmente, di 100 mg ThOD/1 mediante aggiunta di una idonea sostanza tossica (vedi I.6,6.).

Introdurre il volume richiesto di soluzione delle sostanze chimiche rispettivamente in esame e di riferimento, in contenitori almeno in doppio. Aggiungere ad ulteriori contenitori il mezzo minerale da solo (per i controlli dell'inoculo) e, se richiesto, la soluzione mista della sostanza chimica di prova/riferimento e la soluzione sterile.

Se la sostanza chimica in esame è scarsamente solubile, aggiungerla direttamente a questo stadio, in ragione del peso o del volume, oppure trattarla come descrino nell'allegato III. Nel comparto di assorbimento della CO_2, aggiungere idrossido di potassio, pastiglie di calce sodata o altro assorbente.

V.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo sterile

Recipiente 7: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

V.2.6. **Esecuzione del saggio**

Aspettare che i contenitori abbiano raggiunto la temperatura desiderata, inoculare i recipienti appropriati con fango attivo preparato o altra fonte di inoculo in modo da ottenere una concentrazione di solidi sospesi non superiore a 30 mg/l. Montare l'apparecchiatura, avviare l'agitatore e controllare la tenuta nei confronti dell'aria, e iniziare la misura del consumo di ossigeno. Di solito non sono richieste ulteriori attenzioni a parte quella di effettuare le necessarie letture e i controlli giornalieri per verificare che vengano mantenute la temperatura corretta ed una adeguata agitazione.

Calcolare il consumo di ossigeno con letture effettuate ad intervalli regolari e frequenti, utilizzando i metodi forniti dal fabbricante dell'apparecchiatura. Al termine dell'incubazione, normalmente 28 giorni, misurare il pH del contenuto dei contenitori, sopratutto se il consumo di ossigeno è basso o maggiore della $ThOD_{NH4}$ (vedi composti contenenti azoto).

▼B

Se necessario, prelevare campioni dai contenitori del respirometro, all'inizio e alla fine, per l'analisi del DOC o per l'analisi chimica specifica (vedi allegato II.4.). Al momento del prelievo iniziale, assicurarsi che il volume della sospensione in esame che rimane nel contenitore sia noto. Quando l'ossigeno viene consumato da una sostanza in esame contenente azoto, determinare l'aumento della concentrazione dei nitriti e dei nitrati durante i 28 giorni e calcolare la correzione per l'ossigeno consumato mediante nitrificazione (allegato V).

V.3. DATI E RELAZIONE

V.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Dividere il consumo di ossigeno (mg) da parte della sostanza chimica in esame dopo un tempo stabilito (corretto del controllo del bianco di inoculo dopo lo stesso tempo) per il peso della sostanza chimica in esame usata. Questo fornisce il BOD espresso come mg di ossigeno/mg di sostanza chimica in esame, cioè

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2 \text{ consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame.

Calcolare la percentuale di degradazione biologica con una delle seguenti relazioni:

$$\%\ \text{degrad. biologica} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}} \times 100$$

o

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}}{\text{COD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}} \times 100$$

Si dovrebbe notare che questi due metodi non forniscono necessariamente lo stesso valore; dei due è preferibile usare il primo.

Per le sostanze in esame che contengono azoto, utilizzare il valore appropriato di ThOD (NH_4 o NO_3) secondo quanto è noto o ci si aspetta per quanto riguarda il verificarsi della nitrificazione (allegato II.2). Se viceversa si verifica una nitrificazione non completa, effettuare una correzione che tenga conto dell'ossigeno consumato dalla nitrificazione in base alle variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati (allegato V).

Quando si effettuano determinazioni facoltative del carbonio organico e/o di una sostanza chimica specifica, calcolare la degradazione percentuale come descritto al punto I.7.

V.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno da parte del bianco dell'inoculo è normalmente di 20-30 mg O_2/l e non dovrebbe essere maggiore di 60 mg/l in 28 giorni. Valori più elevati di 60 mg/l richiedono un esame critico dei dati e delle tecniche sperimentali. Se il valore del pH è al di fuori del campo 6-8,5 ed il consumo di ossigeno da parte della sostanza chimica in esame è minore del 60 %, si dovrebbe ripetere la prova con una minore concentrazione della sostanza chimica in esame.

Vedi anche I.5.2.

▼B

V.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

V.4. **MODULARIO**

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l

Concentrazione iniziale nel mezzo, C_o: ... mg/l

Volume nel recipiente di saggio (V): ... ml

ThOD o COD: ... mg O_2/mg sostanza saggiata (NH_4, NO_3)

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **CONSUMO DI OSSIGENO: BIODEGRADABILITÀ**

		Tempo (giorni)											
		0		7		14			21			28	
O_2 cons. (mg) sostanza chimica in esame	1												
	2												
	a, media												
O_2 cons. (mg) bianco	3												
	4												
	b, media												
BOD (mg) corretto	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg di sostanza chimica in esame	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tempo (giorni)											
		0		7		14			21			28	
% degradazione $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Media (*)												

V = Volume del mezzo nel contenitore d'esame
(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **CORREZIONE PER LA NITRIFICAZIONE** (vedi allegato V)

Giorno		0	28	Differenza
(i)	Concentrazione nitrati (mg N/l)			(N)
(ii)	Ossigeno equivalente (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Concentrazione nitriti (mg N/l)			(N)
(iv)	Ossigeno equivalente (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ossigeno equivalente totale	—	—	

7. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio: ...

Tempo (giorno)	Bianco mg/l	Sostanza chimica in esame mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) o al termine dell'incubazione

$$\% \text{ DOC rimosso } = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SOSTANZA CHIMICA SPECIFICA** (facoltativa)

S_b = concentrazione nel controllo chimico-fisico (sterile) al ventottesimo giorno.

S_a = concentrazione nel pallone inoculato al ventottesimo giorno.

$$\% \text{ biodegradazione } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAZIONE ABIOTICA** (facoltativa)

a = consumo di ossigeno nei contenitori sterili dopo 28 giorni, (mg).

$$\text{consumo di ossigeno per mg di sostanza chimica in esame } = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(vedi sezioni 1 e 3)

$$\% \text{ degradazione abiotica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

PARTE VI. **SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA** (Metodo C.4-E)

VI.l. PRINCIPIO DEL METODO SPERIMENTALE

La soluzione della sostanza chimica in esame nel mezzo minerale, di solito a 2-5 mg/l, viene inoculata con un numero relativamente piccolo di microorganismi provenienti da una popolazione mista e mantenuti in bottiglie chiuse, completamente piene, al buio a temperatura costante. La degradazione viene seguita mediante l'analisi dell'ossigeno disciolto su un arco di tempo di 28 giorni. La quantità di ossigeno consumata dalla sostanza chimica in esame, corretta per tener conto del bianco dell'inoculo controllato in parallelo, è espressa in percentuale di ThOD o COD.

VI.2. DESCRIZIONE DEL METODO

VI.2.1. **Apparecchiatura**

a) Bottiglie per BOD, con tappi di vetro, per esempio da 250-300 ml;

b) bagno d'acqua o incubatore per mantenere le bottiglie a temperatura costante (± 1 °C o meglio) con l'esclusione di luce;

c) bottiglie di vetro grandi (2-5 l) per la preparazione dei terreni e per il riempimento delle bottiglie per BOD:

d) elettrodo a ossigeno e misuratore, o apparecchiatura e reagenti per la titolazione di Winkler.

VI.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione della soluzione concentrata, vedi I.6.2.

Miscelare 1 ml di soluzioni da (a) a (d) e portare a 1 l con acqua di diluizione.

VI.2.3. **Preparazione dell'inoculo**

L'inoculo è normalmente proveniente da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio alimentata prevalentemente da scarichi domestici. In alternativa una sorgente d'inoculo è un'acqua superficiale. Normalmente si usa da una goccia (0,05 ml) a 5 ml di filtrato per litro di mezzo minerale; è utile eseguire delle prove sperimentali per valutare il volume ottimale per un dato effluente (vedi I.6.4.2 e I.6.5.).

VI.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Aerare fortemente il mezzo minerale per almeno 20 minuti. Eseguire ogni serie di esperimenti con mezzo minerale ottenuto dalla stessa partita. In generale, il mezzo è pronto per l'uso dopo essere stato a riposo per 20 ore alla temperatura di prova. Determinare la concentrazione dell'ossigeno disciolto a scopo di controllo; il valore dovrebbe essere di circa 9 mg/l a 20 °C. Eseguire tutte le operazioni di trasferimento e di riempimento del terreno saturato con aria evitando la formazione di bolle, per esempio mediante l'uso di sifoni.

▼B

Preparare gruppi paralleli di bottiglie per BOD per la determinazione delle sostanze chimiche di prova e di riferimento in serie sperimentali simultanee. Preparare un numero sufficiente di bottiglie per BOD, includendo i bianchi dell'inoculo, per permettere di fare delle misure almeno in doppio del consumo di ossigeno agli intervalli di prova desiderati, per esempio dopo 0, 7, 14, 21 e 28 giorni. Per assicurarsi di poter identificare la fase di crescita di 10 giorni (time window), possono essere necessarie un maggior numero di bottiglie.

Aggiungere mezzo minerale completamente aerato a bottiglie grandi in modo che esse siano riempite per circa un terzo. Aggiungere poi una quantità sufficiente delle soluzioni concentrate della sostanza chimica in esame e della sostanza chimica di riferimento a bottiglie grandi separate in quantità tale che la concentrazione finale delle sostanze chimiche sia normalmente non superiore a 10 mg/l. Non aggiungere sostanze chimiche al terreno di controllo del bianco contenuto in una ulteriore bottiglia grande.

Allo scopo di garantire che l'attività dell'inoculo non sia contenuta, la concentrazione dell'ossigeno disciolto non deve scendere al di sotto di 0,5 mg/l nelle bottiglie per BOD. Questo limita la concentrazione della sostanza chimica in esame a circa 2 mg/l. Tuttavia, per composti scarsamente degradabili e per quelli con un basso ThOD, si possono usare 5-10 mg/l. In alcuni casi, è consigliabile eseguire prove su serie in parallelo della sostanza chimica a due differenti concentrazioni, per esempio 2 e 5 mg/l. Normalmente, si calcola il ThOD sulla base della formazione di sali d'ammonio ma, se è prevista la nitrificazione, si calcola sulla base della formazione di nitrato ($ThOD_{NO3}$: vedi allegato II.2). Tuttavia, se si verifica una nitrificazione non completa, si effettua una correzione tenendo conto delle variazioni di concentrazione di nitrito e nitrato determinate mediante analisi (vedi allegato V).

Se si deve studiare la tossicità della sostanza chimica in esame (nel caso per esempio sia stato trovato preventivamente un basso valore di biodegradabilità), è necessaria un'altra serie di bottiglie.

Preparare un'altra bottiglia grande, che deve contenere mezzo minerale aerato (fino a circa un terzo del suo volume) più la sostanza chimica in esame e la sostanza chimica di riferimento alle concentrazioni finali normalmente uguali a quelle usate nelle altre bottiglie grandi.

Inoculare le soluzioni contenute nelle bottiglie grandi con effluente secondario (da una goccia, o circa 0,05 ml, a 5 ml/l) o con un'altra fonte, come acqua di fiume (vedi I.6.4.2.). Infine, portare a volume le soluzioni con mezzo minerale aerato utilizzando un tubo flessibile che arrivi fino al fondo della bottiglia per realizzare una adeguata miscelazione.

VI.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

In una prova tipica si usano le seguenti bottiglie:

— almeno 10 contenenti la sostanza chimica in esame e l'inoculo (sospensione in esame),

— almeno 10 contenenti solo l'inoculo (bianco dell'inoculo),

— almeno 10 contenenti la sostanza chimica di riferimento e l'inoculo (controllo),

▼B

— e, quando sia necessario, 6 bottiglie contenenti la sostanza chimica in esame, la sostanza chimica di riferimento e l'inoculo (controllo di tossicità). Tuttavia, per poter essere sicuri di riuscire a identificare la fase di crescita (time window) di 10 giorni, sarà necessario un numero di bottiglie circa doppio.

VI.2.6. Esecuzione dei saggio

Dosare immediatamente ciascuna soluzione preparata nel rispettivo gruppo di bottiglie per BOD mediante un tubo flessibile prelevandola dal quarto inferiore (non dal fondo) dell'opportuna bottiglia grande in modo che tutte le bottiglie per BOD siano completamente riempite. Battere delicatamente per rimuovere eventuali bolle d'aria. Analizzare immediatamente le bottiglie al tempo zero per determinare l'ossigeno disciolto mediante il metodo di Winkler o il metodo all'elettrodo. Il contenuto delle bottiglie può venire conservato per un'analisi successiva mediante il metodo di Winkler aggiungendo solfato di manganese (II) e idrossido di sodio (il primo reagente di Winkler). Conservare le bottiglie, accuratamente tappate, contenenti l'ossigeno fissato in forma di ossido di manganese (III) idrato marrone, al buio a 10-20 °C per non oltre 24 ore prima di procedere con le fasi rimanenti del metodo di Winkler. Tappare le bottiglie in multiplo rimanenti assicurandosi che non siano intrappolate bolle d'aria, e incubare a 20 °C al buio. Ciascuna serie deve essere accompagnata da una serie parallela completa per la determinazione del bianco del mezzo inoculato. Prelevare bottiglie almeno in doppio di tutte le serie per l'analisi dell'ossigeno disciolto ad intervalli di tempo (almeno settimanali) durante i 28 giorni di incubazione.

I campioni settimanali dovrebbero permettere la valutazione della rimozione percentuale in una fase di crescita di 14 giorni, mentre un campionamento ogni 3-4 giorni dovrebbe permettere di identificare la fase di crescita di 10 giorni, il che richiederà un numero di bottiglie circa doppio.

Per sostanze in esame contenenti azoto, si devono apportare delle correzioni per il consumo dell'ossigeno che si verifica nell'eventuale nitrificazione. A questo scopo, usare il metodo dell'elettrodo a O_2 per la determinazione della concentrazione di ossigeno disciolto e prelevare poi un campione dalla bottiglia per BOD per analizzare nitriti e nitrati. Dall'aumento di concentrazione dei nitriti e dei nitrati, calcolare l'ossigeno consumato (vedi allegato V).

VI.3. DATI E RELAZIONE

VI.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Calcolare per prima cosa il BOD dopo ciascun periodo di tempo sottraendo il consumo di ossigeno (mg O_2/l) del bianco dell'inoculo da quello presentato dalla sostanza chimica in esame. Dividere questo consumo corretto per la concentrazione (mg/l) della sostanza chimica in esame per ottenere il BOD specifico come mg di ossigeno per mg di sostanza chimica in esame. Calcolare la biodegradabilità percentuale dividendo il BOD specifico per il ThOD specifico (calcolato secondo l'allegato II.2) o per il COD (determinato mediante analisi, vedi allegato II.3), come segue:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2 \text{ consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

▼B

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}} \times 100$$

o

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}}{\text{COD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}} \times 100$$

Si noti che questi due metodi non forniscono necessariamente lo stesso valore; è preferibile usare il primo dei due.

Per le sostanze in esame che contengono azoto, utilizzare il valore appropriato di ThOD (NH_4 o NO_3) secondo quanto è noto o ci si aspetta per quanto riguarda il verificarsi della nitrificazione (allegato II.2). Se si verifica la nitrificazione ma non è completa, calcolare una correzione per tener conto dell'ossigeno consumato dalla nitrificazione in base alle variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati (allegato V).

VI.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno nel bianco dell'inoculo non dovrebbe superare 1,5 mg di ossigeno disciolto/l dopo 28 giorni. Valori più elevati di questo richiedono un esame delle tecniche sperimentali. La concentrazione residua di ossigeno nelle bottiglie di prova non dovrebbe scendere al di sotto di 0,5 mg/l dopo questo tempo. Livelli di ossigeno cosi bassi sono validi solo se il metodo usato per la determinazione dell'ossigeno disciolto è in grado di misurare accuratamente livelli cosi bassi.

Vedi anche I.5.2.

VI.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

VI.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l

Concentrazione iniziale nella bottiglia: ... mg/l

ThOD o COD: .. mg O_2/mg sostanza saggiata

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

▼B

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **DETERMINAZIONE DEL DO**

Metodo: Winkler/elettrodo

Analisi dei contenitori

Tempo di incubazione (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Bianco (senza sostanza chimica)	1	C_1				
	2	C_2				
Media	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Sostanza chimica in esame	1	a_1				
	2	a_2				
Media	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **CORREZIONE PER LA NITRIFICAZIONE** (vedi allegato V)

Tempo di incubazione (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentrazione nitrati (mg N/l)				
(ii)	Variazione della concentrazione dei nitrati (mg N/l)	—			
(iii)	Ossigeno equivalente (mg/l)	—			
(iv)	Concentrazione nitriti (mg N/l)				
(v)	Variazione della concentrazione dei nitriti (mg N/l)	—			
(vi)	Ossigeno equivalente (mg/l)	—			
(iii + vi)	Ossigeno equivalente totale (mg/l)	—			

7. **CONSUMO DI DO: % DEGRADAZIONE**

	Abbattimento dopo n giorni (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Recipiente 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Recipiente 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Abbattimento dopo n giorni (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Recipiente 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ ThOD chemical}}$				
Recipiente 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ ThOD chemical}}$				
$\%\ D \text{ mean } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Non prendere il valore medio se c'è una notevole differenza tra due dati replicati.

m_{to} = valore nel recipiente di saggio al tempo 0

m_{tx} = valore nel recipiente di saggio al tempo x

m_{bo} = valore medio del bianco al tempo 0

m_{bx} = valore medio del bianco al tempo x

Applicare anche la correzione per la nitrificazione da iii + vi della sezione 6.

8. **CONSUMI DI DO DEL BIANCO**

Consumo di ossigeno da parte del bianco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Questo consumo è importante per la validità del saggio. Non deve essere inferiore a 1,5 mg/l.

PARTE VII. **SAGGIO MITI** (Metodo C.4-F)

VII.1. PRINCIPIO DEL METODO

Il consumo di ossigeno da parte di una soluzione o sospensione agitata della sostanza chimica in esame in un mezzo minerale inoculato con microorganismi non adattati, coltivati in modo speciale, viene misurato in modo automatico in un arco di tempo di 28 giorni in un respirometro tenuto in ambiente chiuso al buio a 25 ± 1 °C. Il biossido di carbonio sviluppato viene assorbito mediante calce sodata. La biodegradabilità è espressa come percentuale di ossigeno consumato (corretta del consumo del bianco) rispetto all'assorbimento teorico (ThOD). La percentuale di biodegradanbilità primaria viene inoltre calcolata mediante una analisi chimica specifica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione e, possibilmente, mediante analisi del DOC.

VII.2. DESCRIZIONE DEL METODO

VII.2.1. **Apparecchiatura**

a) Misuratore elettrolitico automatico di BOD o respirometro equipaggiato normalmente con 6 bottiglie da 300 ml ciascuna munite di contenitori per l'assorbimento del CO_2;

▼B

b) camera e/o bagno d'acqua a temperatura costante a 25 ºC ± 1 ºC o meglio;

c) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

d) analizzatore di carbonio (facoltativo).

VII.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Preparare le seguenti soluzioni concentrate (stock) utilizzando reattivi puri per analisi e acqua (I.6.1.)-

(a)	Diidrogenoortofosfato monopotassico, KH_2PO_4	8,50 g
	Monoidrogenoortofosfato dipotassico, K_2HPO_4	21,75 g
	Monoidrogenoortofosfato disodico dodecaidrato $Na_2HP0_4.12\ H_2O$	44,60 g
	Cloruro d'ammonio, NH_4Cl	1,70 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
	Il pH della soluzione deve essere 7,2	
(b)	Solfato di magnesio eptaidrato, $MgSO_4.7\ H_2O$	22,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(c)	Cloruro di calcio anidro, $CaCl_2$	27,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(d)	Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3.6\ H_2O$	0,25 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro.	

Prelevare 3 ml di ciascuna soluzione (a), (b), (c) e (d) e portare a 1 litro.

VII.2.3. **Preparazione dell'inoculo**

Raccogliere campioni freschi provenienti da almeno 10 località, principalmente da aree nelle quali vengono usati e scaricati vari prodotti chimici. Raccogliere da località come impianti di trattamento degli scarichi di fognatura, trattamento delle acque di scarico industriali, fiumi, laghi, mari, campioni da 1 litro di fango, terreno superficiale, acqua e così via e miscelare accuratamente insieme. Dopo avere rimosso la sostanza galleggiante e aver lasciato il resto a riposo, regolare il surnatante a pH 7 ± 1 con idrossido di sodio o acido fosforico.

Utilizzare un volume appropriato del surnatante filtrato per riempire un recipiente a fango attivo del tipo riempi e preleva e aerare il liquido per circa 23 ore e mezzo. Trenta minuti dopo avere arrestato l'aerazione, scartare circa un terzo del volume totale di surnatante e aggiungere un volume uguale di una soluzione (pH = 7) contenente lo 0,1 % rispettivamente di glucosio, peptone e ortofosfato monopotassico al materiale decantato e ricominciare l'aereazione. Ripetere questa procedura una volta al giorno. L'unità del fango deve essere fatta funzionare secondo la buona pratica di laboratorio: gli effluenti dovrebbero essere limpidi, la temperatura dovrebbe mantenersi a 25 ± 2 ºC, il pH dovrebbe essere 7 ± 1, il fango ben decantato, una sufficiente aereazione per mantenere la miscela aerobica per tutto il tempo, devono essere presenti protozoi e l'attività del fango deve essere verificata contro una sostanza di riferimento almeno ogni tre mesi. Non usare il fango come inoculo prima di almeno un mese di funzionamento, ma nemmeno dopo più di quattro mesi. Prelevare, quindi, campioni da almeno 10 località ad intervalli regolari, una volta ogni tre mesi.

▼B

Allo scopo di mantenere il fango fresco e quello vecchio alla stessa attività, miscelare il surnatante filtrato di un fango attivo in uso con un volume uguale del surnatante filtrato di una miscela raccolta di fresco da 10 fonti e coltivare il liquido combinato come visto sopra. Prelevare il fango da usarsi come inoculo 18-24 ore dopo che l'unità è stata alimentata.

VII.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Preparare i seguenti sei palloni:

n. 1: sostanza chimica in esame in acqua di diluizione a 100 mg/l

n. 2, 3 e 4: sostanza chimica in esame nel mezzo minerale a 100 mg/l

n. 5: sostanza chimica di riferimento (per esempio anilina) nel mezzo minerale a 100 mg/l

n. 6: mezzo minerale da solo

Aggiungere le sostanze chimiche scarsamente solubili direttamente, in ragione del peso o del volume, o trattarle come descritto nell'allegato III, salvo il fatto che non si devono usare né solventi né agenti emulsionanti. Aggiungere l'assorbente del CO_2 in tutti i contenitori in speciali recipienti appositamente previsti. Regolare il pH nei contenitori n. 2, 3 e 4 a 7,0.

VII.2.5. **Esecuzione del saggio**

Inoculare i palloni n. 2, 3 e 4 (sospensioni in esame), n. 5 (controllo dell'attività) e n. 6 (bianco dell'inoculo) con un piccolo volume dell'inoculo fino ad una concentrazione di 30 mg/l di solidi sospesi. Non si aggiunge inoculo nel contenitore n. 1, che serve da controllo abiotico. Montare l'apparecchiatura, controllare che sia a tenuta d'aria, avviare gli agitatori e iniziare la misura dell'assorbimento di ossigeno in condizioni di buio. Controllare giornalmente la temperatura, l'agitatore e il registratore del consumo di ossigeno coulometrico e annotare tutte le eventuali variazioni di colore del contenuto dei contenitori. Leggere il consumo di ossigeno per i sei palloni mediante un idoneo metodo, per esempio direttamente dal registratore scrivente a sei punti, che produce una curva di BOD. Al termine dell'incubazione, normalmente 28 giorni, misurare il pH del contenuto nei contenitori e determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame residua e di tutti gli eventuali intermedi e, nel caso di sostanze solubili in acqua, la concentrazione di DOC (allegato II.4). Porre una cura particolare nel caso di sostanze chimiche volatili. Se si prevede la nitrificazione, determinare, se possibile, la concentrazione di nitrati e nitriti.

VII.3. DATI E RELAZIONE

VII.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Dividere il consumo di ossigeno (mg) da parte della sostanza chimica in esame dopo un tempo stabilito (corretto del controllo del bianco di inoculo dopo lo stesso tempo) per il peso della sostanza chimica in esame usata. Questo fornisce il BOD espresso come mg di ossigeno/mg di sostanza chimica in esame, cioè

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2 \text{ consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame

▼B

La biodegradazione percentuale si ottiene poi da:

$$\%\ \text{degrad. biologica} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{ mg sostanza chimica)}} \times 100$$

Per le miscele, calcolare il ThOD dall'analisi elementare, come per i composti semplici. Utilizzare il valore appropriato di ThOD ($ThOD_{NH4}$ o $ThOD_{NO3}$) a secondo che la nitrificazione sia assente o completa (allegato II.2). Se, tuttavia, si verifica la nitrificazione ma non è completa, calcolare la correzione, che tenga conto dell'ossigeno consumato per nitrificazione, dalle variazioni di concentrazione di nitriti e nitrati (allegato V).

Calcolare la biodegradazione primaria percentuale dalla perdita del composto chimico (progenitore) specifico (vedi I.7,2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Se c'è stata una perdita di sostanza chimica in esame nel contenitore n. 1 che misura la rimozione chimico-fisica, riportare questa nella relazione e usare la concentrazione della sostanza chimica in esame (S_b) dopo 28 giorni in questo pallone per calcolare la biodegradazione percentuale.

Quando si effettuano misure (facoltative) di DOC, calcolare la biodegradazione finale percentuale da:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

come descritto al punto I.7.1. Se c'è stata una perdita di DOC nel pallone n. 1, che misura la rimozione chimico-fisica, utilizzare la concentrazione di DOC in questo pallone per calcolare la biodegradazione percentuale.

Registrare tutti i risultati sui moduli allegati.

VII.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno da parte del bianco dell'inoculo è normalmente di 20-30 mg O_2/l e non dovrebbe essere maggiore di 60 mg/l in 28 giorni. Valori più elevati di 60 mg/l richiedono un esame critico dei dati e delle tecniche sperimentali. Se il valore del pH è al di fuori del campo 6-8,5 e il consumo di ossigeno da parte della sostanza chimica in esame è minore del 60 %, si dovrebbe ripetere la prova con una minore concentrazione della sostanza chimica in esame.

Vedi anche I.5.2.

Se la degradazione percentuale dell'anilina, calcolata dal consumo di ossigeno, non supera il 40 % dopo 7 giorni e il 65 % dopo 14 giorni, la prova viene considerata non valida.

VII.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

VII.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO MITI (I)

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

▼B

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, C_o: ... mg/l come sostanza

Volume della miscela di reazione, V: ... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOCULO**

Località di campionamento del fango:

1) ... 6) ...
2) ... 7) ...
3) ... 8) ...
4) ... 9) ...
5) ... 10) ...

Concentrazione dei solidi sospesi nel fango attivo dopo acclimatazione con liquido fognario sintetico = ... mg/l

Volume di fango attivo per litro di mezzo finale = ... ml

Concentrazione del fango nel mezzo finale = ... mg/l

5. **CONSUMO DI OSSIGENO: BIODEGRADABILITÀ**

Tipo di respirometro usato: ...

			Tempo (giorni)				
			0	7	14	21	28
O_2 cons. (mg) sostanza chimica in esame	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 cons. (mg) bianco	b						
O_2 cons. (mg) corretto	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BOD per mg di sostanza chimica in esame	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Conten. 1					
		Conten. 2					
		Conten. 3					
% degradazione $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		media (*)					

(*) Non prendere il valore medio se c'è una notevole differenza tra due dati replicati.

▼B

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio: ...

Contenitore	DOC				% DOC rimosso	Media
	Misurato		Corretto			
Acqua + sost. in esame	a				—	—
Fango + sost. in esame	b_1		b_1 - c			
Fango + sost. in esame	b_2		b_2 - C			
Fango + sost. in esame	b_3		b_3 - c			
Controllo del bianco	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC rimosso } = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATI ANALITICI DELLA SOSTANZA CHIMICA SPECIFICA**

	Quantità residua della sostanza chimica in esame al termine della prova	% degradazione
prova in bianco con acqua	S_b	
mezzo inoculato	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradazione} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcolare la degradazione % per i contenitori a_1, a_2 e a_3 rispettivamente.

8. **NOTE**

Se disponibile, allegare la curva del BOD in funzione del tempo.

▼B

ALLEGATO I

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

DO: Ossigeno disciolto (mg/1); è la concentrazione di ossigeno disciolto in un campione acquoso.

BOD: Domanda biochimica di ossigeno (g); è la quantità di ossigeno consumato dai microorganismi nella metabolizzazione di un composto in esame; espressa anche come grammi di ossigeno consumato per grammo di composto in esame (vedi metodo C.5).

COD: Domanda chimica di ossigeno (g); è la quantità di ossigeno consumata durante l'ossidazione di un composto in esame con dicromato acido caldo: fornisce una misura della quantità di materia ossidabile presente; espressa anche come grammi di ossigeno consumati per grammo di sostanza in esame (vedi metodo C.6).

DOC: Carbonio organico disciolto; è il carbonio organico presente in soluzione o che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri o che rimane nel surnatante dopo centrifugazione a 40 000 m/s^2 (± 4 000 g) per 15 minuti.

ThOD: Domanda teorica di ossigeno (mg); è la quantità totale di ossigeno richiesta per ossidare completamente una sostanza chimica; viene calcolata dalla formula molecolare (vedi allegato II.2) ed è espressa anche come mg di ossigeno richiesti per mg di sostanza in esame.

$ThCO_2$: Biossido di carbonio teorico (mg); è la quantità di biossido di carbonio prodotto calcolato dal contenuto di carbonio noto o misurato della sostanza in esame quando sia stata completamente mineralizzata; espresso anche come mg di biossido di carbonio sviluppati per mg di sostanza in esame.

TOC: Carbonio organico totale di un campione; è la somma del carbonio organico in soluzione e in sospensione.

IC: Carbonio inorganico.

TC: Carbonio totale; è la somma del carbonio organico e di quello inorganico presenti in un campione.

Biodegradazione primaria:

è l'alterazione della struttura chimica di una sostanza provocata da un'azione biologica, che dà come risultato la perdita delle proprietà specifiche di quella sostanza.

Biodegradazione ultima (aerobica):

è il livello di degradazione realizzato quando la sostanza in esame è completamente utilizzata da microorganismi, con il risultato della produzione di biossido di carbonio, acqua, sali minerali e nuovi costituenti cellulari microbici (biomassa).

Prontamente biodegradabile:

una classificazione arbitraria di sostanze chimiche che hanno superato certe prove specifiche di selezione riguardo alla biodegradabilità ultima; queste prove sono cosi rigorose che si suppone che tali composti si degraderanno biologicamente in modo rapido e completo in ambienti acquosi in condizioni aerobiche.

▼B

Intrinsecamente biodegradabile:

una classificazione di sostanze chimiche per le quali vi è una dimostrazione inequivocabile di biodegradazione (primaria o ultima) in qualsiasi riconosciuto saggio di biodegradabilità.

Trattabilità:

è la capacità di composti di essere rimossi durante il trattamento biologico di acque di scarico senza influire in modo dannoso sul funzionamento normale dei processi di trattamento. In generale, i composti prontamente biodegradabili possono essere trattaci, ma non tutti i composti intrinsecamente biodegradabili lo sono. Possono funzionare anche processi abiotici.

Tempo di latenza:

è il tempo che passa dall'inoculazione in un saggio di rimozione lenta a quando la degradazione percentuale è aumentata fino ad almeno il 10 %. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Tempo di degradazione:

è il tempo che passa dal termine del tempo di latenza al momento in cui si raggiunge il 90 % o il massimo livello di degradazione.

Finestra di 10 giorni:

sono i 10 giorni che seguono immediatamente il raggiungimento del 10 % di degradazione.

▼B

ALLEGATO II

CALCOLO E DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI SIGNIFICATIVI

Secondo il metodo scelto, saranno richiesti certi parametri somma. La sezione che segue descrive come ricavare questi valori. L'uso di questi parametri è descritto nei metodi specifici.

1. **Contenuto di carbonio**

   Il contenuto di carbonio viene calcolato dalla composizione elementare nota oppure viene determinato mediante analisi elementare della sostanza in esame.

2. **Domanda teorica di ossigeno (ThOD)**

   La domanda teorica di ossigeno (ThOD) può essere calcolata se è nota la composizione elementare, oppure se questa viene determinata mediante analisi elementare. Per il composto:

   $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

   senza nitrificazione, si ha

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{PM}\ mg/mg$$

   oppure, con nitrificazione,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{PM}\ mg/mg$$

3. **Domanda chimica di ossigeno (COD)**

   La domanda chimica di ossigeno (COD) viene determinata secondo il metodo C.6.

4. **Carbonio organico disciolto (DOC)**

   Il carbonio organico disciolto (DOC) è per definizione il carbonio organico di qualsiasi sostanza chimica o miscela in acqua che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri.

   Campioni estratti dal recipiente di prova vengono prelevati e filtrati immediatamente nell'apparecchiatura di filtrazione utilizzando un appropriato filtro a membrana. I primi 20 ml (quantità che può essere ridotta quando si usino filtri piccoli) del filtrato vengono scartati. Per l'analisi del carbonio si trattengono volumi di 10-20 ml, o minori, nel caso vengano iniettati (il volume dipende dalla quantità richiesta dall'analizzatore del carbonio). La concentrazione di DOC viene determinata mediante un analizzatore di carbonio organico che è in grado di misurare accuratamente una concentrazione di carbonio equivalente o minore del 10 % della concentrazione iniziale di DOC usata nella prova.

   Campioni filtrati che non possono essere analizzati lo stesso giorno di lavoro possono essere conservati in frigorifero a 2-4 °C per 48 ore o al di sotto di - 18 °C per periodi più lunghi.

   Note:

   I filtri a membrana sono spesso impregnati di tensioattivi per la idrofilizzazione. Così i filtri possono contenere fino a parecchi mg di carbonio organico solubile che interferirebbe nelle determinazioni di biodegradabilità. I tensioattivi e altri composti organici solubili vengono rimossi dai filtri bollendoli in acqua deionizzata per tre periodi di 1 ora ciascuno. I filtri possono poi venire conservati in acqua per una settimana. Se si utilizzano cartucce filtranti a perdere, ciascuna partita deve essere controllata per confermare che non liberi carbonio organico solubile.

▼B

Secondo il tipo di filtro a membrana, la sostanza chimica in esame può essere trattenuta per adsorbimento. Pertanto può essere consigliabile assicurarsi che la sostanza chimica in esame non venga trattenuta dal filtro.

Una centrifugazione a 40 000 m/s^2 (4 000 g) per 15 minuti può venire usata al posto della filtrazione per differenziare tra TOC e DOC. Il metodo non è affidabile a una concentrazione iniziale < 10 mg DOC/l perché o non vengono rimossi tutti i batteri, oppure viene ridisciolto carbonio come parte del plasma batterico.

BIBLIOGRAFIA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th, ed. Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngröβen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuβ Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

ALLEGATO III

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADABILITÀ DI SOSTANZE SCARSAMENTE SOLUBILI

Nei saggi di biodegradabilità con sostanze scarsamente solubili, si dovrebbe prestare una particolare attenzione agli aspetti seguenti:

Mentre i liquidi omogenei raramente creano problemi di campionamento, si raccomanda di omogenizzare i materiali solidi mediante mezzi appropriati per evitare errori dovuti alla disomogenità. Un'attenzione particolare deve essere adoperata quando occorrono campioni rappresentativi di pochi mg prelevati da miscele di prodotti chimici o sostanze con grandi quantità di impurezze.

Durante le prove si possono usare varie forme di agitazione. Bisogna porre attenzione ad applicare semplicemente una agitazione sufficiente per mantenere in dispersione la sostanza chimica e ad evitare un surriscaldamento, eccessiva formazione di schiuma e eccessive forze di taglio.

Si può usare un emulsionante che fornisca una dispersione stabile della sostanza chimica. Esso non dovrebbe essere tossico per i batteri e non dovrebbe essere biodegradato né provocare schiuma nelle condizioni sperimentali.

Gli stessi criteri valgono per i solventi e gli emulsionanti.

Non è raccomandabile usare carriers solidi per le sostanze in esame solide, ma essi possono essere adatti per le sostanze oleose.

Quando si utilizzano sostanze ausiliarie, come emulsionanti, solventi e veicoli, si dovrebbe eseguire una prova in bianco contenente la sostanza ausiliaria.

Per studiare la biodegradabilità di composti scarsamente solubili si può usare uno qualunque dei tre saggi respirometrici CO_2, BOD, MITI.

BIBLIOGRAFIA

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradabily testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

ALLEGATO IV

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADABILITÀ DI SOSTANZE CHIMICHE DI SOSPETTA TOSSICITÀ PER L'INOCULO

Quando una sostanza chimica viene sottoposta ad un saggio di pronta biodegradabilità e risulta non biodegradabile, si raccomanda di eseguire la procedura seguente se si vuole distinguere tra inibizione e inerzia (Reynolds et al., 1987).

Si devono usare inoculi simili o identici per i saggi di tossicità e degradazione biologica.

Per valutare la tossicità di sostanze chimiche studiate in saggi di pronta biodegradabilità, sembra appropriata l'applicazione di uno dei metodi, o una loro combinazione, di inibizione del tasso di respirazione del fango (saggio di inibizione della respirazione del fango attivo — direttiva 88/302/CEE), BOD e/o inibizione della crescita.

Se si deve evitare l'inibizione dovuta a tossicità, si suggerisce di usare nelle prove di pronta biodegradabilità una concentrazione della sostanza in esame minore di 1/10 dei valori di EC_{50} (o minore dei valori di EC_{20}) ottenuti nelle prove di tossicità. I composti con un valore di Ec_{50} maggiore di 300 mg/l è improbabile che abbiano effetti tossici nelle prove di pronta biodegradabilità.

I valori di EC_{50} minori di 20 mg/l è probabile che pongano seri problemi per la successiva esecuzione delle prove. Si devono impiegare concentrazioni di prova basse, che richiedono l'uso del saggio rigoroso e sensibile della bottiglia chiusa oppure l'uso di materiale marcato ^{14}C. In alternativa, un inoculo acclimatato può permettere di usare concentrazioni più elevate della sostanza in esame. In questo ultimo caso, tuttavia, si perde lo specifico criterio di pronta biodegradabilità.

BIBLIOGRAFIA

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

ALLEGATO V

CORREZIONE DELL'ASSORBIMENTO DI OSSIGENO PER INTERFERENZA DOVUTA A NITRIFICAZIONE

Errori dovuti al fatto di non considerare la nitrificazione, nella valutazione del consumo di ossigeno nella biodegradabilità di sostanze in esame che non contengono azoto, sono marginali (minori del 5 %), anche se si verifica, in modo irregolare, l'ossidazione dell'azoto ammoniacale nel mezzo, tra i recipienti di prova e i recipienti del bianco. Invece, per le sostanze di prova, che contengono azoto, possono verificarsi gravi errori.

Se si è avuta nitrificazione ma questa non è completa, il consumo di ossigeno osservato, nella miscela di reazione, può essere corretto tenendo conto della quantità di ossigeno utilizzata nell'ossidazione dell'ammonio a nitrito e nitrato, se si determinano le variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati durante l'incubazione, tenendo conto delle equazioni seguenti:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Complessivamente:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Dall'equazione (1) risulta che l'ossigeno consumato da 28 g d'azoto, contenuti nel cloruro d'ammonio (NH_4Cl) ossidato a nitrito è pari a 96 g, il che corrisponde ad un fattore di 3,43 (96/28). Nello stesso modo dall'equazione (3) l'assorbimento di ossigeno da parte di 28 g di azoto, ossidati a nitrato, è di 128 g, il che corrisponde ad un fattore di 4,57 (128/28).

Poichè le reazioni avvengono *in sequenza,* in quanto sono eseguite da specie batteriche distinte e differenti, è possibile che la concentrazione di nitrito aumenti o diminuisca; in quest'ultimo caso si formerà una concentrazione equivalente di nitrato. Così, l'ossigeno consumato nella formazione di nitrato è 4,57 moltiplicato per l'aumento di concentrazione del nitrato, mentre l'ossigeno associato alla formazione di nitrito è 3,43 moltiplicato per l'aumento di concentrazione del nitrito o per la diminuzione della sua concentrazione; la perdita di ossigeno è - 3,43 moltiplicato per la diminuzione di concentrazione.

Cioè:

O_2 consumato nella formazione di nitrato = 4,57 × aumento di concentrazione dei N-nitrati (4)

e

O_2 consumato nella formazione di nitrito = 3,43 × aumento della concentrazione di N-nitrito (5)

e

O_2 perso nella sparizione dei nitriti = - 3,43 × diminuzione della concentrazione di N-nitriti (6)

Di modo chel'assorbimento di O_2 dovuto alla nitrificazione = ± 3,43 × variazione della concentrazione di N-nitrito + 4,57 × aumento della concentrazione di N-nitrato (7)

e così l'assorbimento di O_2 dovuto all'ossidazione del C = assorbimento osservato totale - assorbimento dovuto alla nitrificazione (8)

In alternativa, se si determina solo l'N totale ossidato, l'assorbimento di ossigeno dovuto alla nitrificazione può essere assunto, in prima approssimazione, pari a 4,57 × aumento di N ossidato.

Il valore corretto per il consumo di ossigeno dovuto all'ossidazione di C viene poi confrontato con il ThOD NH_4, come calcolato nell'allegato II.

▼B

C.5. DEGRADAZIONE — DOMANDA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo serve a misurare la domanda biochimica di ossigeno (BOD) delle sostanze organiche solide e liquide.

I dati ottenuti con questa prova riguardano i composti idrosolubili; è tuttavia possibile, almeno in linea di principio, esaminare anche i composti volatili e quelli poco solubili in acqua.

Il metodo può essere applicato soltanto a sostanze organiche che non esercitano azione inibitoria sui batteri alla concentrazione impiegata per le prove. Se la sostanza non è solubile, per ottenere una buona dispersione potrà essere necessario ricorrere a speciali accorgimenti, come l'impiego di ultrasuoni.

Informazioni preliminari in merito alla tossicità del composto chimico possono risultare utili per interpretare i valori più bassi e per scegliere adeguate concentrazioni per la prova.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Si definisce BOD la quantità di ossigeno che un determinato quantitativo della sostanza in esame richiede, in determinate condizioni, per consentire il verificarsi del processo di ossidazione biochimica.

I risultati vengono espressi in g di BOD per g di sostanza esaminata.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

È consigliabile impiegare una sostanza di riferimento adatta per verificare l'attività dell'inoculo.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità predeterminata della sostanza in esame, disciolta o dispersa in un mezzo idoneo ben aerato, viene inoculata con opportuni microorganismi e posta in incubazione al buio, a temperatura ambiente determinata e costante.

Il BOD viene determinato dalla differenza del contenuto di ossigeno disciolto all'inizio e alla fine del saggio. La durata del saggio deve essere almeno di 5 giorni e non più di 28 giorni.

Deve essere effettuata in parallelo una prova in bianco, su un sistema analogo, ma non contenente la sostanza in esame.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La determinazione del BOD non può essere ritenuta una valida determinazione della biodegradabilità di una sostanza. Il presente metodo può essere considerato unicamente come un saggio orientativo.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

Si prepara preliminarmente una soluzione od una dispersione della sostanza da esaminare, per ottenere una concentrazione di BOD compatibile con il metodo impiegato. Si determina successivamente il BOD seguendo un qualunque metodo nazionale o internazionale normalizzato.

▼B

2. **DATI E VALUTAZIONE**

Il BOD ottenuto nella soluzione preliminare viene calcolato conformemente al metodo normalizzato prescelto e convertito in grammi di BOD per grammo di sostanza esaminata.

3. **RELAZIONE**

Va precisato il metodo impiegato.

La domanda biochimica di ossigeno deve risultare dalla media di almeno tre misurazioni valide.

Va indicata ogni informazione ed ogni osservazione utile per l'interpretazione del saggio, soprattutto per quanto riguarda le impurezze, lo stato fisico, gli effetti tossici, la composizione intrinseca della sostanza ed ogni altro elemento tale da influenzarne i risultati.

Nella relazione va indicato l'eventuale impiego di un additivo mirante a impedire la nitrificazione biologica.

4. BIBLIOGRAFIA

Elenco di metodi normalizzati, quali ad esempio:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand

NBN 407: Biochemical oxygen demand

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The determination of biochemical oxygen demand, 1981, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. DEGRADAZIONE — DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo è destinato alla determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD) delle sostanze organiche solide o liquide, secondo una tecnica normalizzata ed arbitraria, in condizioni di laboratorio prefissate.

Per effettuare la prova ed interpretarne i risultati sarà utile disporre di dati sulla formula chimica della sostanza (ad esempio: sali alogenati, sali ferrosi di composti organici, composti organoclorurati).

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

La richiesta chimica di ossigeno è una misura dell'ossidabilità di una sostanza, espressa come equivalente in ossigeno di un reattivo ossidante consumato dalla sostanza in condizioni di laboratorio prestabilite.

Il risultato si esprime in g COD/g sostanza in esame.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nell'esame di nuovi prodotti non è necessario impiegare costantemente sostanze di riferimento. Queste dovrebbero servire essenzialmente a calibrare saltuariamente il metodo e fornire la possibilità di confrontare i risultati con quelli ottenuti applicando un altro metodo.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità prestabilita della sostanza da esaminare, disciolta o dispersa in acqua, viene ossidata con potassio dicromato in ambiente fortemente acido per H_2SO_4, impiegando solfato d'argento come catalizzatore e facendo bollire a ricadere per due ore. La quantità residua di dicromato viene determinata titolando con solfato di ferro (II) e ammonio standardizzato.

Nel caso delle sostanze contenenti cloro, si aggiunge solfato di mercurio (*) per ridurre l'interferenza dei cloruri.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Data l'arbitrarietà di determinazione del metodo, il COD è un «indicatore di ossidabilità» e come tale viene usato come un metodo pratico per determinare la sostanza organica.

Nella prova possono interferire i cloruri; anche riducenti o ossidanti inorganici possono interferire con la determinazione del COD.

Alcuni composti ciclici e molte sostanze volatili (per esempio acidi grassi inferiori) non vengono ossidati completamente da questo saggio.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

Si prepara una soluzione o una dispersione della sostanza da saggiare, in modo da ottenere una domanda chimica di ossigeno compresa tra 250 e 600 mg/l di COD.

(*) Dopo l'uso, le soluzioni contenenti sali di mercurio devono essere tranate in modo da evitare la diffusione di mercurio nell'ambiente.

▼B

Osservazioni

Nel caso di sostanze scarsamente solubili o non disperdibili, si può pesare una quantità di sostanza, finemente polverizzata od allo stato liquido, corrispondente a 5 mg di COD, e si colloca nell'apparecchio sperimentale con acqua.

La domanda chimica di ossigeno (COD) viene spesso determinata, specialmente nel caso di sostanze scarsamente solubili, secondo una variante al metodo, cioè in un sistema chiuso con un equalizzatore di pressione (H. Kelkenberg, 1975). Con questa variante, è spesso possibile riuscire a quantificare composti che si determinano solo con difficoltà con il metodo convenzionale, per esempio acido acetico. Anche questo metodo fallisce tuttavia nel caso della piridina. Se si aumenta la concentrazione del dicromato di potassio descritta nel riferimento (1), fino a 0,25 N (0,0416 M), la pesata diretta di 5-10 mg di sostanza viene facilitata, e ciò è essenziale per la determinazione del COD di sostanze scarsamente solubili in acqua (rif. 2).

Altrimenti, il COD viene poi determinato seguendo un qualunque metodo nazionale o internazionale normalizzato.

2. **DATI E VALUTAZIONI**

Il COD del recipiente sperimentale viene calcolato secondo il metodo normalizzato prescelto e trasformato in grammi di COD per grammi della sostanza in esame.

3. **RELAZIONE**

Nella relazione deve essere indicato il metodo di riferimento.

Il COD deve risultare dalla media di almeno tre misure. Devono essere riferiti tutti i dati e le osservazioni significative per l'interpretazione dei valori ottenuti: ciò vale particolarmente per le impurezze, lo stato fisico e le proprietà della sostanza (se note), qualora possano influire sui risultati.

Va altresì riferito l'eventuale impiego di solfato mercurico per minimizzare l'interferenza dei cloruri.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Kelkenberg, H.Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compound;. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Elenco dei metodi standardizzati, ad esempio:

NBN T 91-201 Determinaition of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analyis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADAZIONE — DEGRADAZIONE ABIOTICA: IDROLISI IN FUNZIONE DEL PH

1. METODO

Il metodo di seguito descritto è equivalente alle linee guida OCSE TG 111 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Le sostanze chimiche possono penetrare nelle acque superficiali per immissione diretta, dispersione di sostanze nebulizzate, scorrimento, drenaggio, smaltimento dei rifiuti, tramite gli effluenti industriali, domestici o agricoli o per deposizione atmosferica, e in acqua possono subire trasformazioni mediante processi chimici (ad es. idrolisi, ossidazione), fotochimici e/o microbici. Le presenti linee guida descrivono un metodo di prova di laboratorio per valutare la trasformazione idrolitica abiotica delle sostanze chimiche nei sistemi acquatici ai valori di pH normalmente riscontrabili nell'ambiente (pH 4-9) e sono basate su linee guida già esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Scopo degli esperimenti è determinare: i) la velocità di idrolisi della sostanza di prova in funzione del pH, e ii) l'identità o la natura e la velocità di formazione e degradazione dei prodotti dell'idrolisi ai quali gli organismi possono essere esposti. Tali esperimenti possono risultare necessari per le sostanze chimiche immesse direttamente in acqua o in grado di penetrare nell'ambiente attraverso le altre vie sopra indicate.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ DI MISURA

Cfr. allegato 2.

1.3. APPLICABILITÀ DEL METODO

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze chimiche (marcate o non marcate) per le quali sia disponibile un metodo analitico di sufficiente accuratezza e sensibilità; è applicabile a composti leggermente volatili o non volatili sufficientemente solubili in acqua, ma non a sostanze chimiche che presentano elevata volatilità in acqua (ad es. fumiganti o solventi organici) e che non possono pertanto essere mantenute in soluzione nelle condizioni sperimentali del presente saggio. L'esecuzione del saggio potrebbe risultare difficile con sostanze scarsamente solubili in acqua (8).

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Soluzioni tampone acquose sterili con differenti valori di pH (4, 7 e 9) sono trattate con la sostanza di prova e incubate al buio in condizioni controllate di laboratorio (a temperature costanti). Ad opportuni intervalli di tempo, le soluzioni tampone sono analizzate per identificare e quantificare la sostanza di prova e i prodotti dell'idrolisi. L'uso di sostanze di prova marcate (ad es. ^{14}C) facilita la determinazione del bilancio di massa.

Questo metodo di prova è concepito secondo uno schema articolato in più fasi (o livelli), illustrato e descritto nell'allegato 1. Ogni fase è avviata sulla base dei risultati della fase precedente.

▼B

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di idrolisi è possibile utilizzare sostanze di prova marcate o non marcate. Generalmente per studiare il meccanismo di idrolisi e per determinare il bilancio di massa si preferisce utilizzare materiale marcato; tuttavia, in casi particolari, la marcatura può non essere affatto necessaria. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C, ma possono risultare utili anche altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Nei limiti del possibile, la marcatura va posizionata nella parte o nelle parti più stabili della molecola. Se per esempio la sostanza di prova contiene un anello, la marcatura va effettuata su questo anello; se la sostanza di prova contiene due o più anelli potrebbero essere necessari studi separati per valutare il destino di ciascun anello marcato e ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti dell'idrolisi. La sostanza di prova deve avere una purezza minima del 95 %.

Prima di eseguire il saggio di idrolisi è necessario disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua [metodo di prova A.6];

b) solubilità in solventi organici;

c) pressione di vapore [metodo di prova A.4] e/o costante della legge di Henry;

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua [metodo di prova A. 8];

e) costante di dissociazione (pK_a) [linee guida OCSE 112] (9);

f) tasso di fototrasformazione diretta o indiretta in acqua, a seconda dei casi.

Occorre disporre di metodi analitici per la quantificazione della sostanza di prova e, se necessario, per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti dell'idrolisi in soluzioni acquose (cfr. anche punto 1.7.2).

1.6. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Ove possibile, occorre utilizzare sostanze di riferimento per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti dell'idrolisi mediante metodi spettroscopici e cromatografici o altri metodi di sensibilità adeguata.

1.7. CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1. **Recuperi**

L'analisi delle soluzioni tampone (almeno in duplicato) o dei loro estratti subito dopo l'aggiunta della sostanza di prova fornisce una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione della sostanza. Nelle ultime fasi degli esperimenti i recuperi sono dati dai rispettivi bilanci di massa (in caso di utilizzo di sostanze marcate). Sia per le sostanze marcate che per le sostanze non marcate i recuperi devono essere compresi tra il 90 % e il 110 % (7). Qualora sia tecnicamente difficile raggiungere questo intervallo, si considera accettabile un recupero del 70 % per le sostanze non marcate, ma in tal caso occorre fornire una giustificazione.

▼B

1.7.2. **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del(i) metodo(i) analitico(i) utilizzato(i) per quantificare la sostanza di prova e i prodotti dell'idrolisi può essere verificata mediante analisi in duplicato delle stesse soluzioni tampone (o dei loro estratti) dopo la formazione di una quantità di prodotti dell'idrolisi sufficiente a permetterne la quantificazione.

Il metodo analitico deve essere sufficientemente sensibile da consentire di quantificare concentrazioni della sostanza di prova uguali o inferiori al 10 % della concentrazione iniziale. All'occorrenza i metodi analitici devono essere anche sufficientemente sensibili da consentire di quantificare qualsiasi prodotto dell'idrolisi che rappresenti almeno il 10 % della dose applicata (in qualsiasi fase del saggio) fino al 25 % o meno della sua concentrazione massima.

1.7.3. **Intervalli di confidenza dei dati cinetici dell'idrolisi**

Occorre calcolare e indicare gli intervalli di confidenza di tutti i coefficienti di regressione, delle costanti di velocità, dei tempi di dimezzamento e di tutti gli altri parametri cinetici (ad es. DT_{50}).

1.8. DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1. **Attrezzature e apparecchiature**

Il saggio deve essere realizzato in recipienti di vetro (ad es. provette, piccoli matracci), al buio e in condizioni sterili, se necessario, a meno che dalle informazioni preliminari (quali ad esempio il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua) non risulti che la sostanza di prova può aderire al vetro. In tal caso, può essere necessario prendere in considerazione l'uso di materiali alternativi come il teflon. Per ovviare al problema dell'aderenza al vetro è possibile ricorrere ad uno o più dei seguenti metodi:

— determinazione della massa della sostanza di prova e dei prodotti dell'idrolisi assorbiti dal recipiente di prova;

— uso di un bagno ad ultrasuoni;

— lavaggio con solvente di tutti i recipienti in vetro in ciascun intervallo di campionamento;

— uso di prodotti formulati;

— uso di una maggiore quantità di cosolvente per aggiungere la sostanza di prova al sistema. In caso di utilizzo di un cosolvente, quest'ultimo non deve idrolizzare la sostanza di prova.

Sono normalmente necessari bagnomaria agitanti a temperatura controllata o incubatori termostatici per l'incubazione delle varie soluzioni di prova.

È necessaria la normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

— pH-metro;

▼B

— strumenti analitici e in particolare apparecchi per gascromatografia (GC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), compresi gli opportuni sistemi di rilevazione per l'analisi delle sostanze radiomarcate e non marcate, o per il metodo della diluizione isotopica inversa;

— strumenti di identificazione, quali ad esempio spettrometria di massa (MS), gascromatografia con spettrometria di massa (GC-MS), cromatografia liquida ad alta risoluzione con spettrometria di massa (HPLC-MS), risonanza magnetica nucleare (NMR), ecc.;

— contatore a scintillazione liquida;

— imbuti separatori per estrazione liquido-liquido;

— strumenti per la concentrazione delle soluzioni e degli estratti (ad es. evaporatore rotante);

— dispositivi per il controllo della temperatura (ad es. bagnomaria).

I reagenti chimici utilizzati comprendono ad esempio:

— solventi organici di grado analitico quali l'esano, il diclorometano, ecc.;

— liquido di scintillazione;

— soluzioni tampone (per una descrizione più dettagliata cfr. punto 1.8.3).

Tutti i recipienti di vetro, l'acqua di grado reagente e le soluzioni tampone da utilizzare nei saggi di idrolisi devono essere sterilizzati.

1.8.2. **Applicazione della sostanza di prova**

La sostanza di prova deve essere applicata in soluzione acquosa nelle varie soluzioni tampone (cfr. allegato 3). Per permettere un'adeguata dissoluzione è consentito, se necessario, l'uso di piccole quantità di solventi miscibili in acqua (ad es. acetonitrile, acetone, etanolo) per l'applicazione e la distribuzione della sostanza di prova, che tuttavia non devono di norma superare l'1 % v/v. L'uso di una concentrazione più elevata di solventi (ad es. in caso di sostanze poco solubili) è ammesso solo se è possibile dimostrare che il solvente non ha alcun effetto sull'idrolisi delle sostanze di prova.

Si sconsiglia di utilizzare regolarmente prodotti formulati, in quanto non si può escludere che gli ingredienti della formulazione interferiscano con il processo di idrolisi. L'impiego di materiale formulato può tuttavia rappresentare un'alternativa adeguata nel caso di sostanze di prova scarsamente idrosolubili o caratterizzate da aderenza al vetro (cfr. punto 1.8.1).

Occorre utilizzare un'unica concentrazione della sostanza di prova, che non deve essere superiore a 0,01 M o alla metà della concentrazione di saturazione (cfr. allegato 1).

▼B

1.8.3. **Soluzioni tampone**

Il saggio di idrolisi deve essere eseguito a valori di pH 4, 7 e 9. A tal fine occorre preparare soluzioni tampone utilizzando acqua e sostanze chimiche di grado reagente. Nell'allegato 3 sono indicati alcuni utili esempi di sistemi tampone. Occorre notare che il sistema tampone utilizzato può influenzare il grado di idrolisi; in tal caso occorre utilizzare un altro sistema tampone ([1]).

Il pH di ciascuna soluzione tampone va verificato con un pH-metro tarato ad una precisione di almeno 0,1 alla temperatura richiesta.

1.8.4. **Condizioni di prova**

1.8.4.1. *Temperatura*

Gli esperimenti di idrolisi devono essere effettuati a temperature costanti. A fini di estrapolazione è importante mantenere la variazione della temperatura entro ± 0,5 °C.

Se il comportamento idrolitico della sostanza di prova è sconosciuto, occorre eseguire un saggio preliminare (fase 1) ad una temperatura di 50 °C. I saggi cinetici di livello superiore devono essere eseguiti ad almeno tre temperature (compreso il saggio a 50 °C) a meno che il saggio di primo livello non abbia dimostrato la stabilità idrolitica della sostanza di prova. Si suggerisce un intervallo di temperature compreso tra 10 °C e 70 °C (preferibilmente con almeno una temperatura inferiore a 25 °C), che deve includere la temperatura di riferimento di 25 °C e la maggior parte delle temperature registrate sul campo.

1.8.4.2. *Illuminazione e ossigeno*

Tutti i saggi di idrolisi devono essere realizzati utilizzando metodi atti ad evitare effetti fotolitici. Occorre prendere tutte le misure opportune per evitare la formazione di ossigeno (ad esempio facendo gorgogliare elio, azoto o argon per 5 minuti prima di preparare la soluzione).

1.8.4.3. *Durata del saggio*

Il saggio preliminare deve essere eseguito per 5 giorni mentre i saggi di livello superiore devono essere eseguiti fino a quando non è idrolizzato il 90 % della sostanza di prova o per 30 giorni, a seconda dell'ipotesi che si verifica per prima.

1.8.5. **Esecuzione del saggio**

1.8.5.1. *Saggio preliminare (fase 1)*

Il saggio preliminare è eseguito a 50 ± 0,5 °C e a valori di pH 4,0, 7,0 e 9,0. Se dopo 5 giorni l'idrolisi è inferiore al 10 % ($t0,5_{25}$ oC > 1 anno), la sostanza di prova è considerata idroliticamente stabile e non è necessario eseguire altri saggi. Se la sostanza di prova è notoriamente instabile a temperature rappresentative di quelle ambientali ([2]), non è necessario eseguire il saggio preliminare. Il metodo analitico deve essere sufficientemente preciso e sensibile da consentire di rilevare una riduzione del 10 % della concentrazione iniziale.

([1]) Mabey e Mill raccomandano l'utilizzo di tamponi borati o acetati anziché di tamponi fosfati (11).

([2]) Tali informazioni possono provenire da altre fonti: può trattarsi ad esempio di dati sull'idrolisi di composti strutturalmente affini ricavati dalla letteratura scientifica o di dati ottenuti da altri saggi preliminari semiquantitativi di idrolisi eseguiti sulla sostanza di prova ad uno stadio precedente di sviluppo.

▼B

1.8.5.2. *Idrolisi di sostanze instabili (fase 2)*

Il saggio di livello superiore (avanzato) deve essere eseguito ai valori di pH ai quali la sostanza di prova è risultata instabile nel saggio preliminare. Le soluzioni tampone della sostanza di prova devono essere termostatizzate alle temperature selezionate. Per verificare se il comportamento cinetico è di primo ordine, ogni soluzione deve essere analizzata ad intervalli di tempo che permettano di ottenere almeno sei valori adeguatamente distanziati compresi in linea di principio tra il 10 % e il 90 % di idrolisi della sostanza di prova. Occorre prelevare singole repliche dei campioni (almeno due repliche contenute in recipienti di reazione separati) e analizzare il loro contenuto in ciascuno dei sei tempi di campionamento (per un minimo di dodici valori). Il ricorso ad un unico campione globale da cui prelevare singole aliquote della soluzione di prova in ciascun intervallo di campionamento si considera inadeguato, in quanto non consente l'analisi della variabilità dei dati e può comportare problemi di contaminazione della soluzione di prova. Al termine del saggio di livello superiore (ossia al raggiungimento del 90 % di idrolisi o trascorsi 30 giorni) occorre eseguire saggi di conferma della sterilità. Tuttavia, nel caso in cui non si osservi alcuna degradazione (ossia trasformazione), tali saggi non sono considerati necessari.

1.8.5.3. *Identificazione dei prodotti dell'idrolisi (fase 3)*

Occorre identificare con appositi metodi analitici tutti i principali prodotti dell'idrolisi, ossia almeno quelli che rappresentano una percentuale uguale o superiore al 10 % della dose applicata.

1.8.5.4. *Saggi facoltativi*

Per sostanze di prova idroliticamente instabili può essere necessario eseguire ulteriori saggi a valori di pH diversi da 4, 7 e 9. Ad esempio, a fini fisiologici può essere necessario effettuare un saggio in condizioni di maggiore acidità (ad es. pH 1,2) ad un'unica temperatura rilevante dal punto di vista fisiologico (37 °C).

2. **DATI**

La quantità di sostanza di prova e, se necessario, dei prodotti dell'idrolisi, deve essere espressa in percentuale della concentrazione iniziale applicata ed eventualmente in mg/L per ciascun intervallo di campionamento e per ogni pH e temperatura di prova. Nel caso in cui sia stata utilizzata una sostanza marcata occorre inoltre indicare il bilancio di massa, espresso in percentuale della concentrazione iniziale applicata.

Occorre fornire una rappresentazione grafica dei logaritmi delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo e identificare i principali prodotti dell'idrolisi, ossia almeno quelli che rappresentano una percentuale uguale o superiore al 10 % della dose applicata. I logaritmi delle concentrazioni di tali prodotti devono essere rappresentati graficamente nella stessa maniera della sostanza madre per evidenziare i tassi di formazione e distruzione.

▼B

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

È possibile calcolare in modo più preciso il tempo di dimezzamento o i valori del DT_{50} utilizzando adeguati modelli cinetici. Occorre indicare il tempo di dimezzamento e/o i valori del DT_{50} (compresi i limiti di confidenza) per ciascun pH e ciascuna temperatura, insieme ad una descrizione del modello utilizzato, dell'ordine cinetico e del coefficiente di determinazione (r^2). Se necessario, i calcoli devono essere applicati anche ai prodotti dell'idrolisi.

Nel caso di studi sulla velocità di reazione effettuati a diverse temperature, le costanti di velocità di pseudo-primo ordine (k_{obs}) dell'idrolisi devono essere descritte in funzione della temperatura. Il calcolo deve basarsi sulla scomposizione di k_{obs} in costanti di velocità dell'idrolisi in catalisi acida, neutra e in catalisi basica (rispettivamente k_H, $k_{neutral}$, e k_{OH}) e sull'equazione di Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

dove A_i e B_i sono le costanti di regressione, rispettivamente dall'intercetta e dalla pendenza, delle rette di *best fit* ottenute dalla regressione lineare di ln k_i rispetto all'inverso della temperatura assoluta espressa in Kelvin (T). Applicando le relazioni di Arrhenius all'idrolisi catalizzata da acidi, neutra e catalizzata da basi, è possibile calcolare le costanti di velocità di pseudo-primo ordine, e di conseguenza i tempi di dimezzamento relativi ad altre temperature per le quali non è possibile una determinazione sperimentale diretta della costante di velocità (10).

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La maggior parte delle reazioni di idrolisi segue un'apparente cinetica di primo ordine e quindi i tempi di dimezzamento sono indipendenti dalla concentrazione (cfr. equazione 4 nell'allegato 2). Ciò consente generalmente di applicare alle condizioni ambientali (concentrazioni $\leq 10^{-6}$ M) i risultati di laboratorio determinati a concentrazioni tra 10^{-2} e 10^{-3} M (10). Mabey e Mill (11) hanno indicato diversi esempi di buona corrispondenza tra la velocità di idrolisi di varie sostanze chimiche misurata in acque pure e in acque naturali, a condizione che siano stati misurati sia il pH che la temperatura.

3. RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (se si utilizza materiale radiomercato occorre indicare la posizione della marcatura) e relative proprietà fisico-chimiche (cfr. punto 1.5);

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza marcata e attività molare (nei casi opportuni).

▼B

Soluzioni tampone:

— date e dettagli della preparazione;

— tamponi e acqua utilizzati;

— molarità e pH delle soluzioni tampone.

Condizioni di prova:

— date di esecuzione degli esperimenti;

— quantità di sostanza di prova applicata;

— metodo e solventi (tipo e quantità) utilizzati per l'applicazione della sostanza di prova;

— volume delle soluzioni tampone trattate con la sostanza di prova incubate;

— descrizione del sistema di incubazione utilizzato;

— pH e temperatura durante l'esperimento;

— tempi di campionamento;

— metodo(i) di estrazione;

— metodi utilizzati per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei prodotti della relativa idrolisi nelle soluzioni tampone;

— numero di repliche dei campioni.

Risultati:

— ripetibilità e sensibilità dei metodi di analisi utilizzati;

— recuperi (al punto 1.7.1 sono indicati i valori percentuali necessari per la validità dello studio);

— dati e medie delle repliche dei campioni, sotto forma di tabelle;

— bilancio di massa nel corso e al termine degli studi (in caso di utilizzo di sostanze di prova marcate);

— risultati del saggio preliminare;

— discussione e interpretazione dei risultati;

— tutti i dati e i valori originari.

Le seguenti informazioni sono necessarie soltanto quando si determina la velocità di idrolisi:

— rappresentazione grafica delle concentrazioni delle sostanze di prova (ed eventualmente dei prodotti dell'idrolisi) in funzione del tempo per ciascun pH e ciascuna temperatura;

— tabelle dei risultati dell'equazione di Arrhenius per una temperatura di 20 °C/25 °C, specificando il pH, la costante di velocità [h^{-1} o g^{-1}], il tempo di dimezzamento o il DT_{50}, le temperature [espresse in °C], compresi i limiti di confidenza e i coefficienti di correlazione (r^2) o altre informazioni analoghe;

— meccanismo di idrolisi proposto.

▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adottata il 12 maggio 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Direttiva 95/36/CE della Commissione, del 14 luglio 1995, che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. Allegato V: destino e comportamento nell'ambiente.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (ottobre 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides (a cura di Mark R. Lynch).

(8) OCSE (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OCSE (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Parigi. OCSE (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

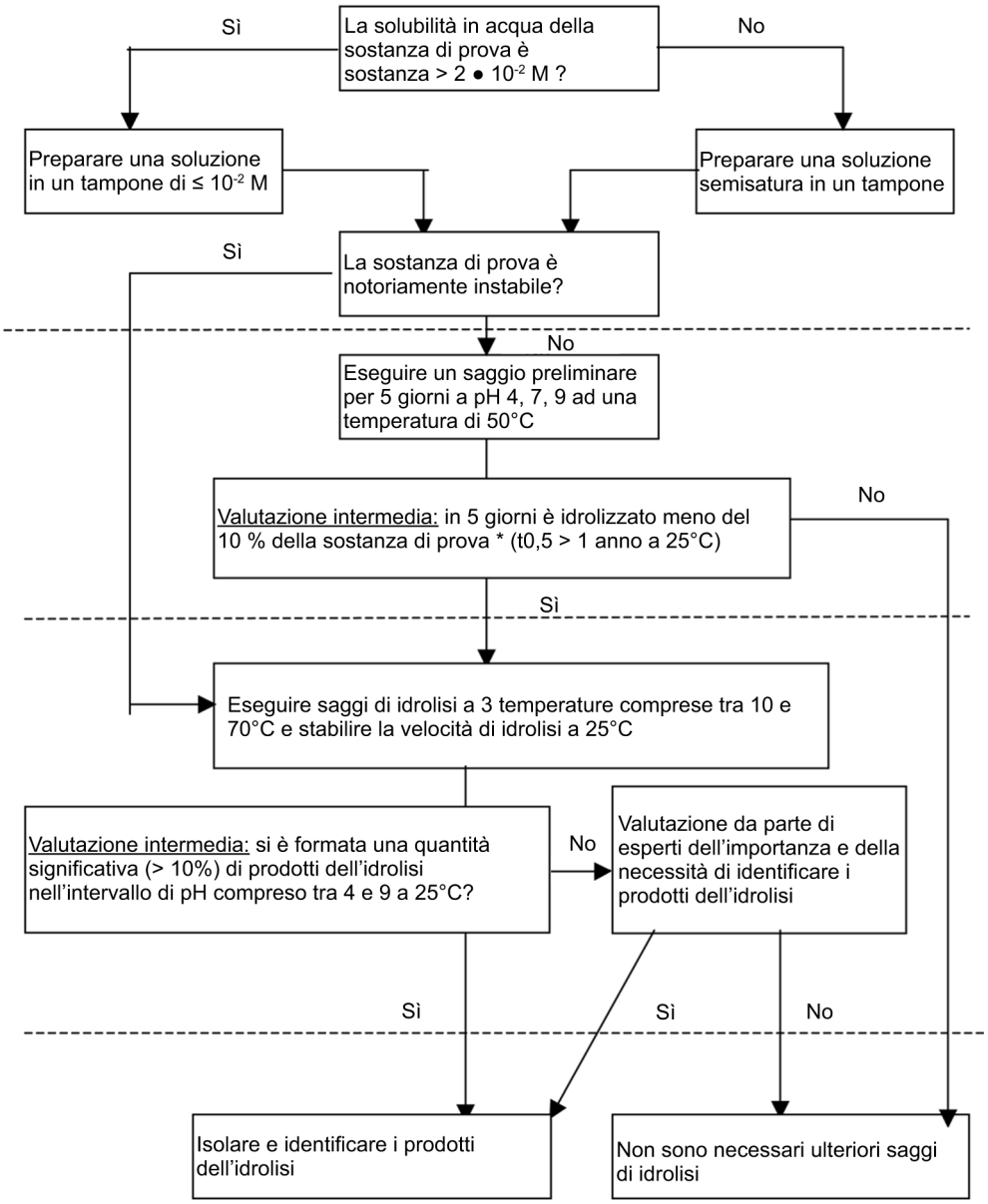
(10) Nelson, H., Laskowski D., Thermes S. e Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models (versione scritta della relazione presentata alla 14ª riunione annuale della Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas, novembre 1993).

(11) Mabey, W., Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions, J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

ALLEGATO 1

Schema delle fasi del saggio di idrolisi



* Il 10 % di idrolisi di una sostanza di prova a 50 °C corrisponde approssimativamente ad un tempo di dimezzamento di 30 giorni, equivalente a circa 1 anno a 25°C.

▼B

ALLEGATO 2

Definizioni e unità di misura

Le unità di misura del sistema internazionale (SI) dovrebbero essere utilizzate in ogni caso.

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza (sia il composto originale che i relativi prodotti di trasformazione).

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova.

Prodotti dell'idrolisi: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione idrolitica della sostanza di prova.

Idrolisi: reazione di una sostanza RX con l'acqua, con scambio netto del gruppo X con OH al centro della reazione:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

La velocità di riduzione della concentrazione di RX in questo processo semplificato è data da:

velocità = k $[H_2O]$ [RX] reazione di secondo ordine

o

velocità = k [RX] reazione di primo ordine

a seconda dello stadio cineticamente determinante. Poiché l'acqua è presente in forte eccesso rispetto alla sostanza di prova, questo tipo di reazione è normalmente descritto come «reazione di pseudo-primo ordine», e la costante di velocità osservata è data dalla relazione

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

e può essere ricavata dall'espressione

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

dove

t = tempo

e C_o, C_t = concentrazioni di RX al tempo 0 e al tempo t.

Le unità di questa costante hanno dimensioni di $(\text{tempo})^{-1}$ e il tempo di dimezzamento (tempo necessario per ottenere una reazione del 50 % di RX) è dato da

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Tempo di dimezzamento: ($t_{0,5}$) è il tempo necessario per l'idrolisi del 50 % della sostanza di prova quando la reazione può essere descritta mediante una cinetica di primo ordine; è indipendente dalla concentrazione.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 50 %; è diverso dal tempo di dimezzamento $t_{0,5}$ quando la reazione non segue una cinetica di primo ordine.

Stima di k a diverse temperature

Se sono note le costanti di velocità per due temperature, è possibile calcolare le costanti di velocità ad altre temperature utilizzando l'equazione di Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ o } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

La rappresentazione grafica di ln k rispetto ad 1/T è una linea retta con pendenza -E/R

in cui:

k = costante di velocità misurata a diverse temperature

E = energia di attivazione [kJ/mol]

T = temperatura assoluta [K]

R = costante universale dei gas [8,314 J/mol.K]

L'energia di attivazione è stata calcolata mediante analisi di regressione o tramite la seguente equazione:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

in cui: $T_2 > T_1$.

▼B

ALLEGATO 3

Sistemi tampone

A. **CLARK E LUBS:**

Miscele tampone di CLARK e LUBS (*)

Composizione	pH
0,2 N HCl e 0,2 N KCl a 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	2,2
0,1 M ftalato acido di potassio + 0,1 N HCl a 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,8
0,1 M ftalato acido di potassio + 0,1 N NaOH a 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,8

(*) I valori del pH riportati in queste tabelle sono stati calcolati a partire da misure del potenziale, utilizzando le equazioni standard di Sörensen (1909). I valori effettivi del pH sono superiori di 0,04 unità rispetto ai valori indicati nelle tabelle.

▼B

Composizione	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	6,0

Miscele tampone di CLARK e LUBS (segue)

0,1 M fosfato monopotassico + 0,1 N NaOH a 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH a 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF E VLEESCHHOUWER:**

Tamponi citrato di KOLTHOFF e VLEESCHHOUWER ([1])

Composizione	pH
0,1 M citrato monopotassico e 0,1 N HCl a 18 ºC (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,6
0,1 M citrato monopotassico e 0,1 N NaOH a 18 ºC (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 NNaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	6,0

([1]) Aggiungere qualche piccolo cristallo di timolo o altra sostanza simile per prevenire la formazione di muffe.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Miscele di borati di SÖRENSEN

Composizione		Sörensen 18 °C	Walbum, pH a		
ml di borace	ml di HCl/ NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borace + 0,1 NHCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borace + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Miscele di fosfati di SÖRENSEN

Composizione	pH
0,0667 M fosfato monopotassico + 0,0667 M fosfato disodico a 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 TOSSICITÀ PER I LOMBRICHI

SAGGIO SU TERRENO ARTIFICIALE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

In questo saggio di laboratorio la sostanza in esame viene aggiunta ad un terreno artificiale dove si pongono i lombrichi per quattordici giorni. Dopo tale periodo (facoltativamente dopo sette giorni) si esamina l'effetto letale della sostanza sui lombrichi. Il saggio fornisce un metodo di valutazione, a termine relativamente breve, dell'effetto sui lombrichi di sostanze chimiche assunte per via cutanea e alimentare.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

LC_{50}: concentrazione di una sostanza capace di uccidere il 50 % degli animali in esame entro il periodo del saggio.

1.3. Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento viene usata periodicamente per dimostrare che la sensibilità del sistema (di saggio) non è cambiata in modo significativo.

Come sostanza di riferimento si raccomanda cloroacetammide di grado analitico.

1.4. Principio del saggio

Il terreno è un elemento variabile; si usa pertanto, per questo saggio, un terreno fertile artificiale definito accuratamente. Lombrichi adulti della specie *Eisenia foetida* (vedi nota in appendice) vengono tenuti in un determinato terreno artificiale, trattato con diverse concentrazioni della sostanza in esame. Quattordici giorni (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio della prova, si sparge il contenuto dei recipienti su un vassoio e per ciascuna concentrazione si contano i lombrichi sopravvissuti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Il saggio è programmato in modo da essere il più possibile riproducibile per quanto concerne il substrato e gli organismi in esame. Alla fine del saggio, la mortalità fra gli animali di controllo non deve superare il 10 %, altrimenti la prova non è valida.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Materiali*

1.6.1.1. Substrato per il saggio

Come substrato di base per il saggio si usa un ben determinato terreno artificiale.

a) Substrato di base (percentuali espresse in peso secco)

— ►C1 10 % di torba di sfagno (con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante e finemente macinata) ◄;

▼B

— 20 % di argilla caolinica preferibilmente con più del 50 % di caolinite;

— circa 69 % di sabbia quarzosa industriale (sabbia a grana prevalentemente fine con oltre il 50 % dei granuli di dimensioni comprese fra 0,05 e 0,2 mm). Qualora la sostanza in esame non possa essere sufficientemente dispersa in acqua, per ogni recipiente (di saggio) andrebbero messi da parte 10 g di tale sabbia da mescolare successivamente con la sostanza stessa;

— circa 1 % di carbonato di calcio ($CaCO_3$) in polvere, chimicamente puro, aggiunto per portare il pH a 6,0 ± 0,5,

b) Substrato per il saggio

Il substrato per il saggio contiene i! substrato di base, la sostanza in esame e acqua deionizzata.

Il contenuto in acqua è circa dal 25 al 42 % del peso secco del substrato di base. Il contenuto in acqua del substrato si determina per essiccamento di un campione fino a peso costante, a 105 °C. II criterio base è che il terreno artificiale deve essere addizionato con acqua fino al punto in cui non vi sia acqua stagnante. Nel mescolare si dovrebbe fare attenzione ad ottenere una distribuzione uniforme della sostanza in esame e del substrato. Il procedimento seguito per addizionare la sostanza in esame al substrato deve essere riportato.

c) Substrato di controllo

Il substrato di controllo contiene il substrato di base e l'acqua. Se si usa un additivo, un ulteriore controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di additivo.

1.6.1.2. Recipienti per il saggio

Recipienti di vetro della capacità di circa un litro (adeguatamente coperti con coperchi di plastica, piatti o con una pellicola di plastica muniti di fori di ventilazione) vengono riempiti, sia per il saggio che per il controllo, con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco di substrato.

1.6.2. *Condizioni della prova*

I recipienti dovrebbero essere tenuti in camere climatizzate a 20 °C (± 2 °C) ed illuminate in continuazione. L'intensità luminosa dovrebbe essere compressa fra 400 e 800 lux.

La durata della prova è di quattordici giorni, ma è facoltativo fare una prima determinazione della mortalità a sette giorni dall'inizio del saggio.

1.6.3. *Procedimento del saggio*

Concentrazioni del saggio

Le concentrazioni della sostanza in esame sono espresse in peso della sostanza per peso secco del substrato di base (mg/kg):

Saggio orientativo

L'intervallo delle concentrazioni che causano una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % può essere determinato con un saggio orientativo che fornisca informazioni sull'intervallo di concentrazioni da impiegare nel saggio definitivo.

▼B

Si dovrebbe esaminare la sostanza alle seguenti concentrazioni: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg di sostanza/kg di substrato in esame (peso secco).

Se si deve effettuare un saggio definitivo completo, per ogni prova orientativa e per il controllo non trattato, potrebbe essere sufficiente un gruppo di dieci lombrichi per ciascuna concentrazione.

Saggio definitivo

I risultati del saggio orientativo vengono impiegati per scegliere almeno 5 concentrazioni in serie geometrica, che causino una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % e che differiscano fra loro per un fattore costante non superiore a 1,8.

Con questa serie di concentrazioni, il saggio dovrebbe consentire una stima la più precisa possibile del valore della LC_{50} e dei suoi limiti di confidenza.

Nella prova definitiva si usano almeno quattro gruppi di saggio per concentrazione e quattro per controlli non trattati, ciascuno con dieci lombrichi. I risultati ottenuti con questi gruppi saggiati in replicato vengono espressi con il valore medio e con la deviazione standard relativa.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto 1,8, danno una mortalità pari allo 0 ed al 100 %, questi due valori sono sufficienti ad indicare l'intervallo entro il quale è compresa la LC_{50}.

Miscela del substrato di base per il saggio e della sostanza in esame

Se possibile, il substrato per il saggio dovrebbe essere preparato senza alcun additivo che non sia acqua. Subito prima dell'inizio del saggio, si mescola con il substrato di base, oppure vi si sparge sopra uniformemente, con uno spruzzatore da cromatografia o dispositivo similare, un'emulsione o dispersione in acqua deionizzata o in altro solvente della sostanza da esaminare.

Se insolubile in acqua, la sostanza in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un idoneo solvente organico (per esempio esano, acetone, cloroformio).

Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Prima dell'uso occorre ventilare il substrato per il saggio. Si deve aggiungere una quantità di acqua pari a quella evaporata. Il controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di tutti gli additivi.

Se la sostanza in esame non è solubile, disperdibile o emulsionabile in solventi organici, 10 g di una miscela costituita da sabbia fine quarzosa e dalla quantità di sostanza in esame necessaria per trattare 500 g di peso secco di terreno artificiale, vengono mescolate con 490 g di peso secco del substrato per il saggio.

Per ciascun gruppo di saggio, si riempie ogni recipiente di vetro con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco, e sulla superficie del substrato si collocano 10 lombrichi precedentemente condizionati per 24 ore in un simile substrato umido e quindi lavati rapidamente ed asciugati dell'acqua in eccesso per assorbimento su carta da filtro.

▼B

I recipienti vengono coperti con coperchi, piatti o pellicole di plastica perforati per impedire l'essiccamento del substrato e sono mantenuti nelle condizioni sperimentali per quattordici giorni.

Le valutazioni andrebbero effettuate quattordici giorni (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio del saggio. Si sparge il substrato su un piatto di vetro o di acciaio inossidabile. Si esaminano i lombrichi e si determina il numero di quelli sopravvissuti. I lombrichi sono considerati morti se non reagiscono ad un leggero stimolo meccanico sull'estremità anteriore.

Se l'esame è effettuato dopo sette giorni, il recipiente è riempito di nuovo con lo stesso substrato ed i lombrichi sopravvissuti vengono collocati sulla sua superficie.

1.6.4. *Organismi per il saggio*

Gli organismi per il saggio dovrebbero essere individui adulti di *Eisenia foetida* (vedi la nota dell'allegato) (di almeno due mesi con clitella) del peso umido di 300-600 mg. (Per il metodo di allevamento vedi allegato).

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO E VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Si riportano le concentrazioni della sostanza esaminata con le rispettive percentuali di lombrichi morti.

Quando i dati sono affidabili si dovrebbero determinare il valore della LC_{50} e i limiti di confidenza (P = 0,05) utilizzando metodi standard (Litchfield e Wilcoxon, 1949 o un metodo equivalente). Il valore della LC_{50} dovrebbe essere espresso in mg di sostanza in esame per kg di substrato per il saggio (peso secco).

Nei casi in cui la pendenza della curva di concentrazione sia troppo elevata per consentire il calcolo della LC_{50}, è sufficiente una stima grafica di tale valore.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto di 1,8, danno mortalità pari allo 0 % ed al 100 %, questi due valori sono sufficienti per indicare l'intervallo entro il quale è situata la LC_{50}.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— la dichiarazione che la prova è stata eseguita conformemente ai criteri di qualità sopra riportati,

— il saggio effettuato (saggio orientativo e/o saggio definitivo),

— l'esatta descrizione delle condizioni in cui è stato effettuato il saggio o la dichiarazione che il saggio è stato condotto conformemente al metodo; qualsiasi modifica del procedimento deve essere riportata,

— l'esatta descrizione del procedimento seguito per mescolare la sostanza in esame con il substrato di base,

— informazioni sugli organismi impiegati per il saggio (specie, età, media ed intervallo di variazione del peso, condizioni di mantenimento e di allevamento fornitore),

▼B

— il metodo seguito per la determinazione della LC_{50},

— i risultati del saggio comprensivi di tutti i dati utilizzati,

— la descrizione dei sintomi e dei cambiamenti osservati nel comportamento degli organismi per il saggio,

— la mortalità nei controlli,

— la LC_{50} oppure la più elevata concentrazione saggiata che non provoca mortalità e la più bassa concentrazione saggiata che provoca il 100 % di mortalità, a quattordici giorni (facoltativamente a sette giorni) dopo l'inizio della prova,

— il grafico della curva concentrazione/risposta,

— i risultati ottenuti con la sostanza di riferimento, specificando se siano stati ottenuti in associazione con il saggio in questione o da precedenti saggi di controllo di qualità.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 207,* decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Edwards, C. A. e Lofty, 1977, *Biology of Earthworms,* Londra: Chapman and Hall, 331 pagine.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de Frante, Ecologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pagine.

(4) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. *96,* pagine *99.*

(5) Commissione delle Comunità europee 1983, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms.* Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlino 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ö*kotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Appendice

Allevamento e mantenimento dei lombrichi prima del saggio

Per l'allevamento si pongono gli animali, da 30 a 50 lombrichi adulti, in una scatola di allevamento con substrato fresco e si rimuovono dopo 14 giorni. Questi animali possono essere utilizzati per ulteriori gruppi di allevamento. I lombrichi nati dalle zooteche vengono impiegati per i saggi quando sono maturi (nelle condizioni prescritte, dopo 2-3 mesi).

Condizioni di allevamento e mantenimento

Camera climatizzata:	temperatura di 20 °C (± 2 °C), di preferenza illuminata ininterrottamente (intensità da 400 a 800 lux).
Scatole di allevamento:	idonei contenitori poco profondi del volume da 10 a 20 litri.
Substrato:	*Eisenia foetida* può essere allevata in diversi escrementi animali. Come terreno per l'allevamento si raccomanda l'uso di una miscela costituita dal 50 % in volume di torba e dal 50 % di sterco di mucca o di cavallo. Il terreno dovrebbe avere un pH di circa 6-7 (corretto con carbonato di calcio) ed una bassa conduttività ionica (meno di 6 mmhos o 0,5 % di concentrazione salina). Il substrato dovrebbe essere umido ma non troppo bagnato. Oltre al metodo sopra esposto si possono impiegare con buoni risultati anche altri procedimenti.

Nota: Esistono due varietà di *Eisenia foetida* che alcuni tassonomi hanno separato in specie (Bouché, 1972). Queste sono morfologicamente simili ma una, la *Eisenia foetida foetida*, ha delle tipiche strisce o fasce trasversali sui segmenti mentre l'altra, la *Eisenia foetida andrei*, ne è priva ed ha un colore rossiccio screziato. Ove possibile si dovrebbe usare la *Eisenia foetida andrei*. Se è disponibile la metodologia necessaria, si possono usare altre specie.

▼B

C.9 **BIODEGRADAZIONE**

ZAHN-WELLENS TEST

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Il metodo è destinato a valutare la potenziale biodegradabilità ultima ([1]) delle sostanze organiche idrosolubili e non volatili: esposte a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi nel corso di un saggio statico.

Può verificarsi un assorbimento chimico-fisico della sostanza in esame sui solidi sospesi; di ciò si dovrà tener conto nell'interpretare i risultati (vedi punto 3.2),

Le sostanze da studiare vengono impiegate a concentrazioni corrispondenti a valori del DOC compresi fra 50 e 400 mg/l o a valori del COD compresi fra 100 e 1 000 mg/l (DOC = carbonio organico disciolto; COD = domanda chimica di ossigeno). Dette concentrazioni, relativamente elevate, hanno il vantaggio dell'attendibilità analitica. I composti dotati di proprietà tossiche possono ritardare o inibire il processo di degradazione.

In questo metodo, la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto o la richiesta chimica di ossigeno vengono impiegate per valutare la biodegradazione ultima della sostanza in esame.

L'impiego simultaneo di un metodo di analisi specifico può permettere di valutare la biodegradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto all'esame di quelle sostanze organiche le quali, alle concentrazioni impiegate per la prova:

— sono solubili in acqua nelle condizioni sperimentali;

— hanno una tensione di vapore trascurabile nelle condizioni sperimentali;

— non esercitano effetti inibitori sui batteri;

— sono assorbite soltanto in misura limitata nel sistema sperimentale;

— non vanno perdute per effetto della formazione di schiume nella soluzione in esame.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del materiale da esaminare sarà utile per interpretare i risultati, particolarmente nei casi in cui i risultati sono bassi o trascurabili.

Per poter interpretare i risultati più bassi e per poter scegliere le opportune concentrazioni sperimentali sarà altresì utile disporre di dati sulla tossicità della sostanza nei confronti dei microorganismi.

([1]) I termini «ultima» e «primaria», riferiti alla biodegradazione, sono traduzioni dei termini inglesi «ultimate» e «primary», rispettivamente.

▼B

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Il livello di degradazione raggiunto alla fine dell'esperimento, denominato «biodegradabilità nel Zahn-Wellens Test», è dato dall'espressione:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

D_T = biodegradazione (%) al tempo T

C_A = valori del DOC (o del COD) della miscela in esame, espressi in mg/l e misurati tre ore dopo l'inizio della prova (DOC = carbonio organico disciolto, COD = domanda chimica di ossigeno)

C_T = valori del DOC o del COD nella miscela in esame al momento del prelievo (mg/l)

C_B = valori del DOC o del COD relativi al «bianco» al momento del prelievo (mg/l)

C_{BA} = valori del DOC o del COD del «bianco», misurati tre ore dopo l'inizio della prova (mg/l)

L'entità della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale.

La degradazione percentuale si esprime come eliminazione percentuale del DOC (o del COD) della sostanza sperimentata.

La differenza tra il valore misurato dopo tre ore e il valore calcolato, o preferibilmente misurato inizialmente, può fornire informazioni utili in merito all'eliminazione della sostanza (vedi punto 3.2: «Interpretazione dei risultati»).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

In taluni casi, quando vengono studiate sostanze nuove, può essere utile l'impiego di sostanze di riferimento. Tuttavia, non possono ancora essere raccomandate specifiche sostanze di riferimento.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

In un recipiente di vetro da 1 a 4 litri, provvisto di agitatore e aereatore, vengono introdotti contemporaneamente il fango attivo, le sostanze nutritive minerali e il materiale da esaminare, quale unica fonte di carbonio, in soluzione acquosa. La miscela viene agitata ed aereata alla temperatura di 20-25 °C, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura, per la durata massima di 28 giorni. Il processo di degradazione viene seguito mediante determinazione dei valori del COD o del DOC nella soluzione filtrata, eseguita giornalmente o comunque ad intervalli appropriati e regolari. Il rapporto fra il DOC (o il COD) eliminato dopo ciascun intervallo ed il valore a tre ore dall'inizio viene espresso come biodegradazione percentuale e serve per misurare l'entità della degradazione in quel momento. Diagrammando tale valore in funzione del tempo si costruisce la curva di biodegradazione.

Impiegando un metodo analitico specifico è possibile misurare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

▼B

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Prove d'intercalibrazione tra laboratori hanno dimostrato che la riproducibilità di questo metodo è soddisfacente.

La sensibilità del metodo è determinata principalmente dalla variabilità del «bianco» e, in misura minore, dalla precisione con cui è possibile determinare il carbonio organico disciolto e la quantità del composto da esaminare contenuto nel mezzo.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Preparazioni*

1.6.1.1. Reattivi

Acqua per il saggio: acqua potabile a contenuto di carbonio organico inferiore a 5 mg/l. La concentrazione globale degli ioni calcio e magnesio non deve superare 2,7 mmol/l; in caso contrario sarà necessaria un'opportuna diluizione con acqua deionizzata o distillata

Acido solforico, p.a.,	50 g/l
Soluzione di idrossido di sodio, p.a.,	40 g/l
Soluzione nutritiva minerale: sciogliere in 1 litro d'acqua deionizzata:	
cloruroammonico, NH_4Cl, p.a.	38,5 g
ortofosfato monosodico diidrato $NaH_3PO4.2H_2O$, p.a.	33,4 g,
ortofosfato monopotassico, KH_2PO_4, p.a.	8,5 g,
ortofosfato dipotassico, K_2HPO_4. p.a.	21,75 g.

La miscela serve contemporaneamente da sostanza nutritiva e da tampone.

1.6.1.2. Apparecchiatura

Recipienti cilindrici di vetro, del volume da 1 a 4 litri

Dispositivo di agitazione. L'agitatore vero e proprio, di vetro o metallo, dev'essere sostenuto da un albero adatto e deve girare a 5-10 cm circa dal fondo del recipiente. Si può anche impiegare un agitatore magnetico, con barretta da 7 a 10 cm di lunghezza

Tubo di vetro, del diametro interno di 2-4 mm, per l'introduzione dell'aria. L'apertura del tubo deve trovarsi a 1 cm circa sopra il fondo del recipiente

Centrifuga (3 550 giri circa)

pH-metro

Misuratore dell'ossigeno disciolto

Filtri di carta

▼B

Apparecchiatura per filtrazione su membrana

Filtri a membrana, porosità 0,45 μm. I filtri a membrana sono adatti solo a condizione che non cedano carbonio organico e non assorbano la sostanza durante la filtrazione

Apparecchiatura analitica per la determinazione del contenuto in carbonio organico e della domanda chimica di ossigeno

1.6.1.3. Preparazione dell'inoculo

Lavare il fango attivo proveniente da un impianto di trattamento biologico centrifugando o lasciando sedimentare ripetutamente con l'acqua per il saggio (vedi sopra).

I! fango attivo deve trovarsi in idonee condizioni. Esso può essere prelevato da un impianto di trattamento di acque di scarico in buone condizioni di funzionamento. Per ottenere il maggior numero possibile di specie o ceppi differenti di batteri è preferibile mescolare gli inoculi provenienti da varie fonti (per esempio: vari impianti di trattamento, estratti di suoli, acque di fiume, ecc). La miscela deve essere trattata come descritto sopra.

Per controllare l'attività del fango attivo vedi oltre il paragrafo «Controllo funzionale».

1.6.1.4. Preparazione delle soluzioni da esaminare

Nel recipiente per il saggio, introdurre 500 ml dell'acqua per il saggio, insieme alla soluzione nutritiva minerale in quantità pari a 2,5 ml/l e al fango attivo in quantità corrisponderne a 0,2-1,0 g/l di materiale secco nella miscela finale. Aggiungere la soluzione madre della sostanza da esaminare in quantità tale da ottenere un DOC da 50 a 400 mg/l nella miscela finale. I corrispondenti valori del COD saranno da 100 a 1 000 mg/l. Portare con l'acqua di cui sopra al volume totale da 1 a 4 litri. Il volume totale da scegliere dipende dal numero dei campioni da prelevare per le determinazioni del DOC o del COD, nonché dai volumi necessari per il procedimento analitico.

Normalmente, un volume di 2 litri può essere considerato soddisfacente. Per ciascuna serie di saggi va preparato almeno un recipiente di controllo (bianco): esso deve contenere soltanto il fango attivo e la soluzione nutritiva minerale portata allo stesso volume totale dei recipienti per il saggio.

1.6.2. *Esecuzione del saggio*

Si agita il contenuto dei recipienti per il saggio con agitatori magnetici od a spirale, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura e alla temperatura di 20-25 ºC. L'aerazione dev'essere ottenuta insufflando aria compressa purificata facendola passare attraverso un tampone di cotone e, se necessario, una bottiglia di lavaggio. Si farà in modo che il fango non si depositi e che la concentrazione dell'ossigeno non scenda al di sotto di 2 mg/l.

Il valore del pH deve essere controllato ad intervalli regolari (ad esempio quotidianamente) e regolato se necessario sul valore di 7-8.

▼B

Le perdite dovute all'evaporazione andranno compensate immediatamente prima di ogni prelievo aggiungendo acqua deionizzata o distillata nelle quantità richieste. Sarà particolarmente utile segnare il livello del liquido sul recipiente prima di avviare la prova. Dopo ogni campionamento (in assenza di aerazione e agitazione} si apporranno nuovi contrassegni. I primi campioni dovranno sempre essere prelevati tre ore dopo l'inizio della prova per verificare se ha luogo un assorbimento del materiale in esame da parte del fango attivo.

L'eliminazione della sostanza in esame dev'essere seguita mediante determinazioni del DOC e del COD, effettuate quotidianamente o ad intervalli comunque regolari. I campioni prelevati dal recipiente di saggio e dal «bianco» devono essere filtrati su carta accuratamente lavata. I primi 5 ml del filtrato della soluzione devono essere scartati. I fanghi difficilmente filtrabili possono essere eliminati in precedenza centrifugando per 10 minuti. Le determinazioni del COD e del DOC devono essere effettuate almeno in doppio. L'esperimento deve proseguire per la durata di 28 giorni.

Nota: I campioni che rimangono torbidi devono essere filtrati attraverso filtri a membrana, Questi ultimi non devono cedere od assorbire materiale organico.

Controllo funzionale del fango attivo

In parallelo a ciascuna serie di esperimenti, deve essere saggiata una sostanza nota, destinata a controllare la capacità funzionale del fango attivo. A questo scopo si è mostrato utile il glicoldietilenico.

Adattamento

Qualora si eseguano analisi ad intervalli relativamente brevi (ad esempio quotidianamente}, l'adattamento può essere chiaramente controllato dalla curva di degradazione (vedi figura 2). Il saggio, pertanto, non deve essere avviato immediatamente prima dell'interruzione di fine settimana.

Qualora l'adattamento si verifichi verso la fine del periodo di saggio, il saggio stesso può essere prolungato fino al momento in cui la degradazione è terminata.

Nota: Se è necessaria una conoscenza più vasta del comportamento dei fanghi adattati, lo stesso fango attivo deve essere posto nuovamente a contatto con lo stesso materiale di prova, procedendo come segue:

arrestare l'agitatore e l'aeratore e lasciar sedimentare il fango attivo; eliminare il surnatante, riempire fino a 2 litri con acqua per il saggio, agitare per 15 minuti e lasciare nuovamente sedimentare; eliminare nuovamente il surnatante e impiegare il fango rimanente per ripetere il saggio con gli stessi materiali conformemente a quanto indicato ai precedenti punti 1.6.1.4 e 1.6.2. Il fango attivo può essere isolato anche per centrifugazione anziché per sedimentazione.

Il fango adattato può essere mescolato con fango fresco, fino ad una quantità totale di 0,2-1 g di sostanza secca per litro.

▼B

Mezzi analitici

Normalmente i campioni vengono filtrati attraverso un filtro di carta accuratamente lavato (per il lavaggio, impiegare acqua deionizzata).

I campioni che restano torbidi devono essere filtrati con filtri a membrana (0,45 μm).

La concentrazione del DOC dev'essere determinata in doppio sul campione filtrato (scartando i primi 5 ml) con apparecchiatura per la determinazione del TOC. Se il filtrato non può essere analizzato lo stesso giorno, esso va conservato in frigorifero fino al giorno successivo. Una conservazione più lunga non è da raccomandarsi:

La concentrazione del COD va determinata sul campione filtrato con il procedimento analitico descritto nel riferimento bibliografico (2).

2. **DATI E VALUTAZIONE**

Le concentrazioni del DOC e del COD devono essere determinate almeno in doppio in ogni campione secondo quanto indicato al punto 1.6.2. La degradazione al momento T viene calcolata mediante la formula riportata (insieme alle definizioni) al punto 1.2.

La misura della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale. L'entità della degradazione raggiunta alla fine dell'esperimento viene definita come «biodegradabilità secondo Zahn-Wellens»

Nota: Qualora la degradazione completa venga raggiunta prima che il tempo necessario per il saggio sia terminato e questo risultato sia confermato da una seconda analisi effettuata il giorno successivo, il saggio può essere considerato concluso.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— la concentrazione iniziale della sostanza,

— tutte le altre informazioni e risultati sperimentali concernenti la sostanza esaminata, la sostanza di riferimento (se impiegata) e il «bianco»,

— la concentrazione dopo tre ore,

— la curva di biodegradazione con la relativa descrizione,

— la data e la località di prelievo dei microorganismi usati per l'esperimento, lo stato di adattamento, la concentrazione impiegata, ecc.

— le giustificazioni scientifiche per qualsiasi modifica apportata al procedimento sperimentale.

3.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La rimozione del DOC (o del COD) che si verifica gradualmente entro giorni o settimane indica che la sostanza in esame sta subendo biodegradazione.

▼B

In taluni casi può comunque entrare in gioco l'assorbimento chimico-fisico, denotato dal fatto che la scomparsa si verifica in modo completo o parziale fin dall'inizio, entro le prime tre ore e che la differenza di risposta tra i surnatanti del controllo e del saggio rimane a livelli inaspettatamente bassi.

Se si vuole distinguere fra la biodegradazione (o biodegradazione parziale) e l'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi.

Ciò può essere fatto in numerosi modi, ma il metodo più convincente consiste nell'impiegare il surnatante quale inoculo in una prova del dossier di base (preferibilmente un saggio respirometrico).

Le sostanze che, nel corso di questo saggio, mostrano un'elevata eliminazione del DOC (o del COD) non dovuta ad assorbimento devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Una rimozione parziale, non dovuta ad assorbimento indica che il prodotto chimico è soggetto almeno in parte alla biodegradazione. Una rimozione bassa o nulla del DOC (o del COD) può essere dovuta all'inibizione dei microorganismi da parte delle sostanze in esame: ciò può anche essere rivelato dalla lisi e dalla perdita di fango, accompagnata dalla formazione di surnatanti torbidi. In questo caso il saggio deve essere ripetuto impiegando la sostanza in esame a concentrazione minore.

L'impiego di un metodo di analisi specifico per la sostanza in esame o della sostanza marcata con ^{14}C può consentire una maggiore sensibilità. Nel caso di composto marcato al ^{14}C, il recupero di $^{14}CO_2$ confermerà che la biodegradazione è avvenuta.

Quando i risultati sono espressi in termini di biodegradazione primaria, dovrà essere fornita, possibilmente, una spiegazione della modifica di struttura chimica che conduce alla diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e fornire la risposta ottenuta sul «bianco».

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 B,* decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Allegato V C.9 Degradazione: Domanda chimica di ossigeno; direttiva 84/449/CEE della Commissione, Gazzetta ufficiale delle Comunità europee L 251 del 19.9.1984.

▼B

Appendice

ESEMPIO DI VALUTAZ1ONE

Composto organico:	acido 4-etossibenzoico
Conccntrazione teorica della sostanza:	600 mg/l
DOC teorico:	390 mg/l
Inoculo	Impianto di trattamento delle acque fognarie di
Concentrazione	1 g di sostanza secca
Stato di adattamento	non adattato
Analisi:	determinazione DOC
Quantità del campione	3 ml
Sostanza di controllo	glicoldietilenico
Tossicità del composto	nessun effetto tossico al di sotto di 1 000 mg/l (metodo utilizzato: saggio in tubi di fermentazione)

Tempi di analisi	Sostanza di riferimento				Sostanza in esame		
	Bianco DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC netto mg/1	Degradazione %	DOC (1) mg/l	DOC netto mg/l	Degradazione %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ore	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 giorno	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 giorni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 giorni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 giorni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 giorni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 giorni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 giorni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 giorni	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valore medio di tre determinazioni.

▼B

Figura 1

Esempio di curve di biodegradazione

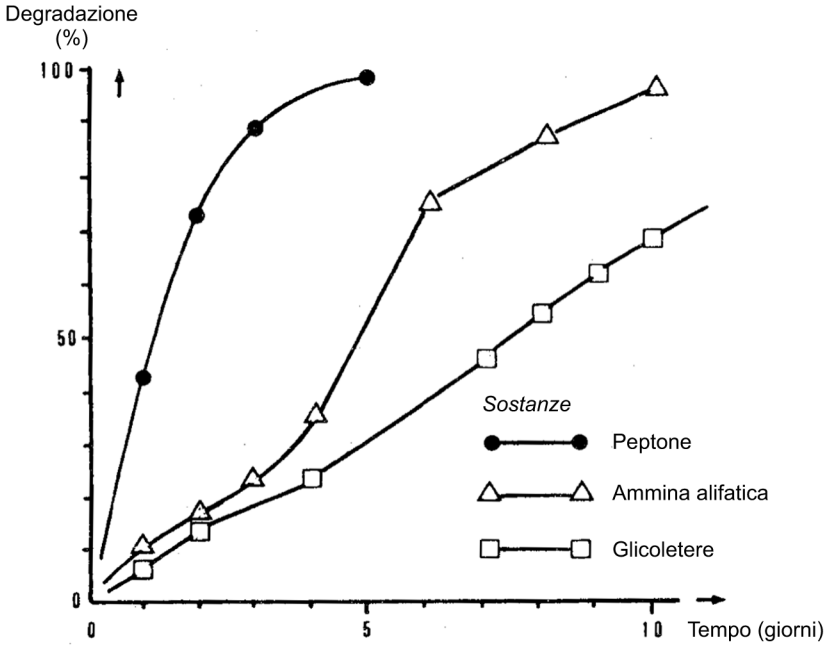
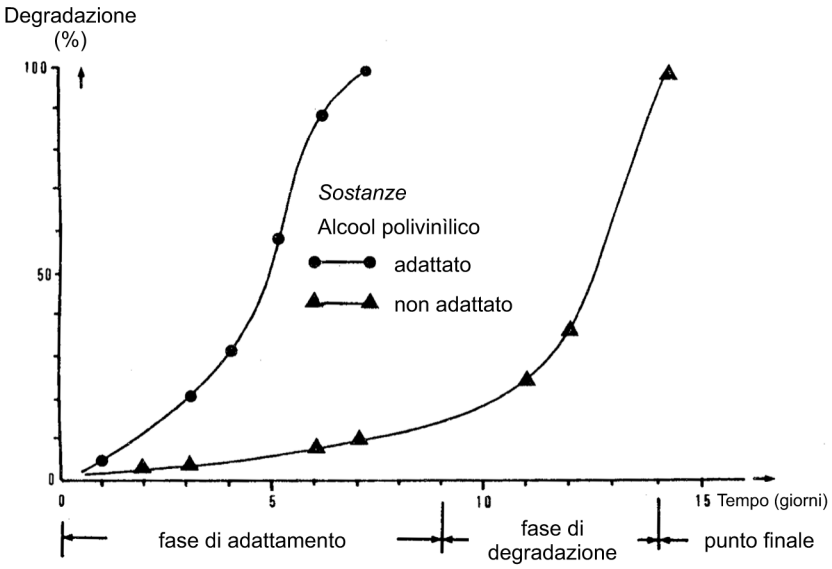


Figura2

Esempio di adattamento dei fanghi



▼M4

C.10. **PROVA DI SIMULAZIONE SUI SISTEMI DI TRATTAMENTO AEROBICO DEI LIQUAMI: C.10-A: UNITÀ CON FANGHI ATTIVI — C.10-B: BIOFILM**

C.10-A: unità con fanghi attivi

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 303 (2001). Negli anni Cinquanta si è capito che i tensioattivi, da poco introdotti, provocavano una formazione di schiuma eccessiva negli impianti di trattamento delle acque reflue e nei fiumi. Si trattava di sostanze che non venivano completamente eliminate nel trattamento aerobico e in alcuni casi limitavano l'eliminazione di altra materia organica. Queste constatazioni hanno stimolato molte ricerche scientifiche incentrate sull'eliminazione dei tensioattivi dalle acque reflue e sulla possibilità di utilizzare nuove sostanze chimiche prodotte industrialmente per il trattamento di questo tipo di acque. Sono state utilizzate unità modello rappresentative dei due principali tipi di trattamento biologico aerobico delle acque reflue: fanghi attivi e filtri percolatori (detti anche filtri biologici). Sarebbe stato poco pratico, ed estremamente costoso, distribuire le singole nuove sostanze chimiche e monitorare i grandi impianti per il trattamento delle acque, anche solo su base locale.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Unità con fanghi attivi

2. Sono state descritte unità modello con fanghi attivi di dimensioni variabili: da 300 ml fino a circa 2 000 ml. Alcune riproducevano da vicino il funzionamento degli impianti di scala normale, con vasche di sedimentazione dalle quali i fanghi sedimentati venivano ripompati verso il serbatoio di aerazione, mentre altre unità non prevedevano vasche di sedimentazione, cfr. Swisher (1). La dimensione dell'apparecchio rappresenta un compromesso; da un lato dev'essere sufficientemente grande da consentire un buon funzionamento meccanico e da fornire un volume adeguato di campioni senza che ciò incida sull'operatività, mentre dall'altro deve essere di dimensione sufficientemente contenuta da evitare sprechi di materiali e spazio.

3. Due tipi di apparecchiature sono stati utilizzati su larga scala e in modo soddisfacente: le unità Husmann (2) e le unità a vaso poroso (3) e (4), impiegate inizialmente per lo studio dei tensioattivi; entrambe queste apparecchiature vengono descritte nel presente metodo di prova. Anche altri apparecchi hanno dato esito soddisfacente, cfr. ad esempio Eckenfelder (5). Dato il costo e gli sforzi relativamente onerosi legati all'applicazione di questa prova di simulazione, sono state analizzate in parallelo anche altre prove di screening, più semplici e meno costose, che sono ora incluse nel capitolo C.4, lettere da A a F, del presente allegato (6). L'esperienza acquisita in merito a molti tensioattivi e ad altre sostanze chimiche ha dimostrato che quelli che superano le prove di screening (sono cioè prontamente biodegradabili) si degradano anche nella prova di simulazione. Alcuni tra quelli che non superano le prove di screening superano però le prove di biodegradabilità intrinseca [capitoli C.12 (7) e C.19 (8) del presente allegato], ma solo alcuni di questi ultimi si degradano nella prova di simulazione, mentre le sostanze chimiche che non superano le prove di biodegradabilità intrinseca non si degradano nelle prove di simulazione (9), (10), (11).

4. In alcuni casi, sono sufficienti le prove di simulazione svolte in un singolo insieme di condizioni di funzionamento specifiche. I risultati sono espressi sotto forma di eliminazione percentuale della sostanza chimica in esame o del carbonio organico disciolto (DOC). La descrizione della prova in questione è fornita nel presente metodo. Tuttavia, a differenza della precedente

▼M4

versione del presente capitolo che descriveva solo un tipo di apparecchio per il trattamento dei liquami artificiali a unità abbinate, utilizzando un metodo relativamente approssimativo per i fanghi esausti, il presente testo offre una serie di alternative, riguardo il tipo di apparecchio, la modalità di funzionamento, la rimozione dei liquami e dei fanghi esausti. Il testo segue da vicino quello della norma ISO 11733 (12), che è stato passato attentamente al setaccio in fase di preparazione, sebbene il metodo non sia stato sottoposto a prove interlaboratorio (*ring-test*).

5. In altri casi, sono necessari dati più precisi riguardo alla concentrazione della sostanza chimica in esame negli effluenti ed è quindi inevitabile ricorrere a un metodo più completo. Ad esempio, il tasso di eliminazione dei fanghi esausti va controllato con più precisione nel corso di ogni singola giornata e per tutto il periodo di prova, per cui le unità devono funzionare secondo diversi tassi di eliminazione. Un metodo veramente completo dovrebbe inoltre includere prove eseguite a due o tre temperature diverse: un metodo simile è descritto da Birch (13) (14) e riassunto nell'appendice 6. Tuttavia, le conoscenze attualmente a disposizione sono insufficienti per poter decidere quale dei modelli cinetici siano applicabili alla biodegradazione delle sostanze chimiche negli impianti per il trattamento delle acque reflue e, in generale, negli ambienti acquatici. L'applicazione della cinetica di Monod, cfr. appendice 6 a titolo d'esempio, si limita alle sostanze chimiche presenti in quantità pari a 1 mg/l e oltre, ma alcuni ritengono che anche questo sia da dimostrare. Le prove condotte su concentrazioni che meglio riflettono quelle riscontrabili nelle acque reflue sono riportate nell'appendice 7; queste prove sono state inserite in appendice, analogamente a quelle nell'appendice 6, e non pubblicate come metodi di prova a sé stanti.

Filtri

6. Si è prestata meno attenzione ai modelli pilota a filtri percolatori (detti anche letti percolatori), forse perché sono più complessi e meno compatti rispetto agli impianti pilota a fanghi attivi. Gerike *et al.* hanno sviluppato unità a filtri percolatori, facendole funzionare in modalità abbinata (15). Si tratta di filtri relativamente grandi (altezza: 2 m; volume: 60 l) che richiedono ciascuno fino a 2 l/h di liquami. Bauman *et al.* (16) hanno simulato dei filtri percolatori inserendo delle strisce di «fibra pile» di poliestere in tubi lunghi 1 m (diametro interno: 14 mm) dopo averle immerse in fanghi attivi concentrati per 30 min. La sostanza chimica in esame, quale unica fonte di carbonio in una soluzione minerale salina, è stata introdotta nel tubo verticale, valutando in seguito la biodegradazione attraverso la misurazione del DOC negli effluenti e del CO_2 nel gas emesso.

7. I biofiltri sono stati simulati seguendo una procedura diversa (15); le superfici interne di alcuni tubi rotanti, leggermente inclinati rispetto all'asse orizzontale, sono state irrorate con acque reflue (circa 250 ml/h) con e senza la sostanza chimica in esame, e gli effluenti risultanti sono stati analizzati per determinare la presenza di DOC e/o della sostanza.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il metodo intende determinare l'eliminazione e la biodegradazione primaria e/o completa di sostanze chimiche organiche idrosolubili attraverso microrganismi aerobici, in un sistema di prova a funzionamento continuo che simula il processo a fanghi attivi. Le fonti di carbonio e di energia per i microrganismi sono costituite da un mezzo organico facilmente biodegradabile e dalla sostanza chimica organica in esame.

9. Due unità di prova a funzionamento continuo (impianti a fanghi attivi o vasi porosi) vengono fatte operare in parallelo in condizioni identiche, scelte in quanto adatte ai fini della prova. Normalmente, il tempo medio di ritenzione idraulica è di 6 h e l'età media dei fanghi (tempo di ritenzione dei fanghi) varia da 6 a 10 giorni. I fanghi sono eliminati mediante uno dei metodi; la sostanza chimica in esame viene aggiunta agli affluenti (mezzo organico) di una sola delle due unità, con una concentrazione di carbonio organico disciolto (DOC) tra 10 mg/l e 20 mg/l. La seconda unità viene utilizzata come unità di controllo per determinare la biodegradazione del mezzo organico.

▼M4

10. A intervalli frequenti vengono saggiati campioni degli effluenti, nei quali vengono determinati il DOC, preferibilmente, oppure la COD (domanda chimica di ossigeno), insieme alla concentrazione della sostanza chimica in esame (se richiesto) attraverso analisi specifiche sugli effluenti provenienti dall'unità che riceve la sostanza. Quando si effettuano le misurazioni del DOC o della COD, si assume che la differenza fra le concentrazioni medie degli effluenti nelle due unità (di prova e di controllo) sia dovuta alla sostanza in esame o ai suoi metaboliti organici. Tale differenza viene confrontata con la concentrazione di DOC o COD negli affluenti dovuta all'immissione della sostanza chimica in esame, al fine di determinare l'eliminazione di quest'ultima.

11. È generalmente possibile distinguere tra biodegradazione e bioassorbimento attraverso un attento esame della curva eliminazione-tempo e la biodegradazione può normalmente essere confermata attraverso una prova di biodegradazione rapida utilizzando un inoculo acclimatato proveniente dall'unità che ha ricevuto la sostanza in esame.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

12. È necessario disporre delle caratteristiche di purezza, idrosolubilità, volatilità e adsorbimento della sostanza in esame, in modo da permettere la corretta interpretazione dei risultati. Le sostanze chimiche volatili e insolubili non possono normalmente essere sottoposte a prova, se non dopo aver preso particolari precauzioni (cfr. appendice 5). Per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD (domanda teorica di ossigeno), DOC e COD, è necessario conoscere la struttura chimica o la formula bruta.

13. Per una scelta mirata delle concentrazioni da sottoporre a prova e per interpretare correttamente dei valori di biodegradazione bassi, possono essere utili informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (cfr. appendice 4).

SOGLIE MINIME

14. La biodegradabilità primaria dei tensioattivi è l'applicazione originaria della presente prova di simulazione (di conferma), e l'immissione sul mercato di un tensioattivo è subordinata all'eliminazione di più dell'80 % della sostanza specifica. Se il tasso dell'80 % non è raggiunto, si può applicare la prova di simulazione (di conferma) e il tensioattivo è immesso sul mercato solo se viene eliminato più del 90 % della sostanza chimica specifica. Per le sostanze chimiche in generale, il problema di ottenere un risultato positivo o negativo (*pass/fail*) non si pone e la percentuale di eliminazione ottenuta può servire per un calcolo approssimativo della probabile concentrazione nell'ambiente, da utilizzare nella valutazione dei rischi dovuti alle sostanze chimiche. I risultati tendono ad essere del tipo «tutto o niente». La percentuale di eliminazione del DOC ottenuta in diversi studi su sostanze chimiche pure era superiore al 90 % in oltre tre quarti dei prodotti chimici che presentavano un grado di biodegradabilità significativo e superiore all'80 % nel novanta per cento degli stessi.

15. Un numero relativamente contenuto di sostanze chimiche (ad esempio tensioattivi) è presente nei liquami alle stesse concentrazioni utilizzate nel presente metodo di prova (circa 10 mg C/l). A simili concentrazioni alcune sostanze chimiche possono essere inibitrici, mentre la cinetica di eliminazione di altre sostanze può differire a basse concentrazioni. È possibile valutare la degradazione con più precisione ricorrendo a metodi modificati e scegliendo delle concentrazioni realisticamente basse della sostanza chimica in esame; i risultati ottenuti potrebbero servire a calcolare le costanti cinetiche. Tuttavia, le tecniche sperimentali necessarie non sono state ancora completamente convalidate, né sono stati definiti i modelli cinetici che descrivono le reazioni di biodegradazione (cfr. appendice 7).

▼M4

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

16. A volte, per assicurare il corretto svolgimento della procedura sperimentale, è utile sottoporre a prova, parallelamente alle sostanze chimiche in esame, anche delle sostanze chimiche il cui comportamento è conosciuto, ad esempio: acido adipico, 2-fenilfenolo, 1-naftolo, acido difenico, 1-acido naftoico ecc. (9) (10) (11).

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

17. Il numero di relazioni sulle prove di simulazione è molto inferiore rispetto a quello delle relazioni sulle prove di biodegradabilità immediata. Per le sostanze chimiche in esame degradate all'80 % od oltre la riproducibilità tra le prove condotte simultaneamente è buona (dal 10 al 15 %), ma la variabilità aumenta per le sostanze meno efficacemente degradate. Inoltre, alcune sostanze limite hanno fornito risultati molto eterogenei (ad esempio 10 %, 90 %) a diverse riprese nel corso delle nove settimane della prova.

18. I risultati ottenuti con i due tipi di apparecchi non si differenziano di molto, ma alcune sostanze chimiche hanno subito una degradazione più estesa e costante con liquami domestici invece che con liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Apparecchiatura

Sistema di prova

19. Il sistema di prova per una singola sostanza chimica comprende un'unità di prova e un'unità di controllo; se vengono svolte solo analisi specifiche (biodegradazione primaria) è sufficiente la sola unità di prova. Una sola unità di controllo può essere utilizzata per diverse unità di prova che ricevono le stesse o diverse sostanze chimiche sperimentali. In caso di abbinamento (appendice 3), a ciascuna unità di prova deve corrispondere un'unità di controllo. Il sistema di prova può consistere in un modello di impianto a fanghi attivi — unità di Husmann (appendice 1, figura 1) — o in un vaso poroso (appendice 1, figura 2). In entrambi i casi è necessario utilizzare serbatoi di capacità sufficiente a ricevere affluenti ed effluenti, insieme a pompe per il dosaggio degli affluenti, mischiati o non mischiati alla soluzione contenente la sostanza chimica in esame.

20. Ciascuna unità a fanghi attivi consiste in un recipiente di aerazione con una capacità nota di circa 3 litri di fanghi attivi e di un sedimentatore (chiarificatore secondario) contenente circa 1,5 litri; è possibile modificare parzialmente i volumi regolando l'altezza del sedimentatore. È consentito l'utilizzo di recipienti di dimensioni diverse, se sottoposti a carichi idraulici paragonabili. In caso non sia possibile mantenere la temperatura della sala prova nell'intervallo desiderato, si raccomanda l'uso di recipienti a camicia termostatica ad acqua. I fanghi attivi sono riciclati dal sedimentatore al recipiente di aerazione attraverso una pompa ad aria compressa o una pompa dosatrice, in continuo o a intervalli regolari.

21. Il sistema a vaso poroso consiste in un cilindro poroso a fondo conico, contenuto all'interno di un recipiente leggermente più grande, di forma identica ma in materia plastica impermeabile. Per il vaso poroso, un materiale adatto è il polietilene, spesso 2 mm e con pori di dimensione non superiore a 90 μm. La separazione dei fanghi e del mezzo organico trattato avviene mediante passaggio differenziale attraverso la parete porosa. Gli effluenti fluiscono nello spazio anulare dal quale traboccano nel recipiente di raccolta. Non avviene alcuna decantazione e di conseguenza non vi è ricircolo di fanghi. L'intero sistema può essere montato in un bagnomaria

▼M4

controllato termostaticamente. I vasi porosi si ostruiscono e rischiano di traboccare nelle fasi iniziali. Se ciò avviene, occorre sostituire il rivestimento poroso con un rivestimento pulito, cominciando per prima cosa a sifonare i fanghi dal vaso a un secchio pulito per poi rimuovere il rivestimento ostruito. Dopo aver asciugato il cilindro impermeabile esterno, occorre collocare un rivestimento pulito e rimettere i fanghi nel vaso. È anche necessario raschiare e trasferire con cura eventuali fanghi aderenti ai lati del rivestimento ostruito. La pulizia dei vasi ostruiti si effettua ricorrendo inizialmente a un leggero getto d'acqua per rimuovere i fanghi residui, in seguito mettendo a bagno i vasi prima in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio poi in acqua, infine sciacquando accuratamente con acqua.

22. Occorre applicare tecniche appropriate all'aerazione dei fanghi nei recipienti di aerazione di entrambi i sistemi, utilizzando, ad esempio, aeratori oppure aria compressa. Se occorre, l'aria viene purificata (passando attraverso un filtro idoneo) e lavata. È necessario insufflare nel sistema una quantità d'aria sufficiente per mantenere le condizioni aerobiche e tenere perennemente in sospensione i fiocchi di fango nel corso della prova.

Apparecchio di filtrazione o centrifuga

23. I campioni vengono filtrati attraverso filtri a membrana di porosità idonea (diametro d'apertura nominale di 0,45 μm) che adsorbono le sostanze chimiche organiche solubili e rilasciano la minima quantità possibile di carbonio organico. Se i filtri utilizzati rilasciano carbonio organico, occorre lavarli accuratamente con acqua calda per rimuovere il carbonio organico lisciviato. In alternativa si può usare una centrifuga in grado di girare a 40 000 m/s^2.

Apparecchiatura di analisi

24. Apparecchiatura richiesta per determinare:

— DOC (carbonio organico disciolto) e TOC (carbonio organico totale) o COD (domanda chimica di ossigeno),

— sostanze chimiche specifiche, se richiesto,

— solidi sospesi, pH, concentrazione di ossigeno nell'acqua,

— temperatura, acidità e alcalinità,

— ammonio, nitriti e nitrati, se la prova è svolta in condizioni nitrificanti.

Acqua

25. Acqua di rubinetto, contenente meno di 3 mg/l di DOC. Determinare l'alcalinità se non già nota.

26. Acqua deionizzata, contenente meno di 2 mg/l di DOC.

Mezzo organico

27. Sono accettati, quali mezzo organico, i liquami artificiali, quelli domestici o una miscela di entrambi. È stato dimostrato (11) (14) che, spesso, l'uso di soli liquami domestici genera un maggior tasso di eliminazione del DOC e consente addirittura l'eliminazione e la biodegradazione di alcune sostanze chimiche che non sono invece biodegradate se si usano liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE. Inoltre, l'aggiunta costante o intermittente di liquami domestici spesso stabilizza i fanghi attivi e li rende capaci, crucialmente, di decantare in modo ottimale. Si raccomanda, quindi, l'uso di liquami domestici. Occorre misurare la concentrazione di DOC o COD in ciascun nuovo lotto di mezzo organico e determinarne l'acidità o alcalinità. Se il mezzo organico presenta una bassa acidità o alcalinità potrebbe essere necessario aggiungere un tampone idoneo (idrogenocarbonato di sodio o diidrogenofosfato di potassio), per mantenere un pH di circa 7,5 ± 0,5 nel recipiente di aerazione nel corso della prova. La quantità del tampone da aggiungere, e quando aggiungerla, vanno decise caso per caso. Quando le miscele vengono utilizzate in continuo o a intermittenza, occorre mantenere il DOC (o la COD) della miscela stessa a un valore pressoché costante, ad esempio diluendola con acqua.

▼M4

Liquami artificiali

28. Sciogliere per ogni litro di acqua di rubinetto i seguenti composti: 160 mg di peptone; 110 mg di estratto di carne; 30 mg di urea; 28 mg di idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4); 7 mg di cloruro di sodio (NaCl); 4 mg di cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg di solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4.7H_20$); questi liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE rappresentano un esempio dove la concentrazione media di DOC negli affluenti è di circa 100 mg/l. In alternativa, utilizzare altre composizioni, con la stessa concentrazione di DOC, più prossime ai liquami reali. Se occorrono affluenti meno concentrati, diluire i liquami artificiali con acqua di rubinetto, ad esempio 1:1, per ottenere una concentrazione di circa 50 mg/l. Gli affluenti meno concentrati consentono una migliore crescita di organismi nitrificanti: occorrerà ricorrere a una concentrazione inferiore se è necessario svolgere uno studio sulla simulazione di impianti di depurazione delle acque reflue dove sia presente nitrificazione. Questi liquami artificiali, a base di acqua distillata, possono essere preparati in forma concentrata e conservati a circa 1 °C per una settimana al massimo. Se occorre, diluire con acqua di rubinetto. (Questo mezzo non è del tutto soddisfacente perché, in particolare, la concentrazione di azoto è molto elevata e il tenore di carbonio è relativamente basso, ma non è stata suggerita un'alternativa migliore, se non attraverso l'aggiunta di un tampone fosfato e di peptone).

Liquami domestici

29. Utilizzare liquami freschi decantati raccolti giornalmente in un impianto di trattamento delle acque reflue che riceve principalmente liquami domestici. Occorre prelevare i liquami prima che avvenga la sedimentazione primaria, dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria oppure dall'alimentazione dell'impianto a fanghi attivi; i liquami devono essere il più possibile privi delle particelle più grosse. È possibile utilizzarli dopo averli stoccati anche per diversi giorni (in generale, però, non più di sette) a 4 °C, se è provato che il DOC (o la COD) non sono diminuiti in modo significativo (vale a dire di più del 20 %) in fase di stoccaggio. Al fine di limitare eventuali perturbazioni al sistema, occorre correggere il DOC (o la COD) di ogni nuovo lotto per ottenere un valore adeguato costante prima dell'uso, ad esempio diluendolo con acqua.

Fanghi attivi

30. Raccogliere un campione di fanghi attivi per l'inoculazione dal serbatoio di aerazione di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente acque di origine domestica.

Soluzioni madre della sostanza in esame

31. Per le sostanze che presentano una solubilità adeguata, preparare delle soluzioni madre a concentrazioni idonee (es.: da 1 a 5 g/l) in acqua deionizzata o nella frazione minerale dei liquami artificiali (per le sostanze insolubili o volatili, cfr. appendice 5). Determinare il DOC e il carbonio organico totale (TOC) della soluzione madre e ripetere le misure per ciascun nuovo lotto. Se la differenza tra il DOC e il TOC supera il 20 %, verificare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame. Confrontare il DOC o la concentrazione della sostanza in esame, misurata attraverso un'analisi specifica della soluzione madre, con il valore nominale, per assicurarsi che il tasso di recupero sia sufficiente (solitamente deve superare il 90 %). Verificare, in particolare per le dispersioni, se il DOC può essere utilizzato come parametro analitico o se invece si possa applicare solo una tecnica d'analisi specifica per la sostanza in esame. Le dispersioni impongono il ricorso alla centrifuga dei campioni. Per ciascun nuovo lotto, misurare DOC, COD o la sostanza in esame attraverso un'analisi specifica.

▼M4

32. Determinare il pH della soluzione madre. I valori estremi indicano che l'aggiunta della sostanza chimica può influenzare il pH dei fanghi attivi nel sistema di prova. In tal caso, neutralizzare la soluzione madre per ottenere un pH di 7 ± 0,5 ricorrendo a piccole quantità di acido o di base inorganici, evitando però la precipitazione della sostanza in esame.

PROCEDURA

33. La procedura descritta si applica alle unità a fanghi attivi; è necessario modificarla leggermente per il sistema a vaso poroso.

Preparazione dell'inoculo

34. Per cominciare, inoculare il sistema sottoposto a prova con fanghi attivi o con un inoculo contenente una bassa concentrazione di microrganismi. Conservare l'inoculo in luogo aerato a temperatura ambiente ed utilizzarlo entro le 24 ore. Nel primo caso, raccogliere un campione di fanghi attivi dalla vasca di aerazione di un impianto di trattamento biologico delle acque reflue che funzioni efficientemente o da un'unità pilota sperimentale che riceva prevalentemente liquami domestici. Se è necessario simulare condizioni nitrificanti, raccogliere i fanghi attivi da un impianto di trattamento delle acque reflue in presenza di nitrificazione. Determinare la concentrazione di solidi in sospensione e, se necessario, concentrare i fanghi per sedimentazione in modo che il volume aggiunto al sistema sia minimo. Verificare che la concentrazione di partenza di materia secca sia intorno a 2,5 g/l.

35. Nel secondo caso, utilizzare come inoculo da 2 ml/l a 10 ml/l di effluenti provenienti da un impianto di trattamento biologico dei liquami domestici. Per ottenere il maggior numero possibile di specie o ceppi differenti di batteri può essere utile mescolare degli inoculi provenienti da varie fonti, ad esempio acque di superficie. In tal caso, i fanghi attivi si formeranno e svilupperanno nel sistema di prova.

Dosaggio del mezzo organico

36. Pulire accuratamente, all'inizio e durante la prova, tutti i recipienti destinati ad affluenti ed effluenti e i tubi che li collegano, per eliminare la proliferazione microbica. Riunire i sistemi di prova in un ambiente a temperatura controllata (normalmente tra i 20 e i 25 °C) oppure utilizzare unità di prova a camicia termostatica ad acqua. Preparare un volume sufficiente del mezzo organico richiesto (cfr. paragrafi da 27 a 29). Cominciare a riempire il recipiente di aerazione e il sedimentatore con il mezzo organico e aggiungere l'inoculo (paragrafi 34, 35). Mettere in azione il dispositivo di aerazione in modo che i fanghi siano mantenuti in sospensione e in condizioni aerobiche, cominciando a dosare gli affluenti e a riciclare i fanghi sedimentati. Dosare il mezzo organico dai recipienti di stoccaggio trasferendolo nei recipienti di aerazione (paragrafi 20, 21) delle unità di prova e di controllo e raccogliere i rispettivi effluenti in recipienti di stoccaggio simili. Per ottenere il normale tempo di ritenzione idraulica di 6 h, occorre pompare il mezzo organico a 0,5 l/h. Per confermare questa velocità di flusso, misurare la quantità quotidiana di mezzo organico dosato registrando la riduzione dei volumi del mezzo nei recipienti di stoccaggio. È necessario ricorrere ad altre modalità di dosaggio per determinare gli effetti dello scarico intermittente di una sostanza chimica oppure dell'aggiunta di «dosi shock».

37. Se il mezzo organico viene preparato in vista di un'utilizzazione la cui durata supera le 24 ore, è possibile refrigerarlo a circa 4 °C o conservarlo utilizzando un metodo adeguato, in modo da prevenire la crescita microbica e la biodegradazione al di fuori delle unità di prova (paragrafo 29). Se si utilizzano i liquami artificiali, è possibile preparare e stoccare a circa 4 °C una soluzione madre concentrata (es.: dieci volte superiore a quella normale, cfr. paragrafo 28). La soluzione madre può essere mischiata con il volume adeguato di acqua di rubinetto prima dell'uso; oppure, può essere pompata direttamente, mentre il volume adeguato di acqua di rubinetto viene pompato separatamente.

▼M4

Dosaggio della sostanza chimica in esame

38. Aggiungere un volume adeguato della soluzione madre della sostanza chimica (paragrafo 31) al recipiente di stoccaggio degli affluenti, oppure dosarla direttamente nel recipiente di aerazione, ricorrendo a un'altra pompa. La concentrazione di prova media normale negli affluenti dovrebbe situarsi tra 10 mg/l e 20 mg/l di DOC, e la concentrazione massima è di 50 mg/l. Se l'idrosolubilità della sostanza in esame è bassa, o se è possibile che si producano effetti tossici, occorre ridurre la concentrazione a 5 mg/l di DOC o addirittura meno, ma solo se è possibile applicare un metodo di analisi specifico (le sostanze di prova disperse e scarsamente solubili in acqua possono essere aggiunte attraverso tecniche di dosaggio speciali, cfr. appendice 5).

39. Quando il sistema è stabilizzato ed elimina il DOC dal mezzo organico in modo efficiente (all'80 % circa), cominciare ad aggiungere la sostanza. È importante verificare che tutte le unità operino allo stesso grado di efficienza prima di aggiungere la sostanza in esame; se così non fosse, spesso è utile mischiare i singoli fanghi e ridistribuirli in quantità uguali alle diverse unità. Se si utilizza un inoculo di circa 2,5 g/l (peso secco) di fanghi attivi, la sostanza chimica in esame può essere aggiunta sin dall'inizio della prova, in quando aggiungere direttamente e fin dall'inizio dei quantitativi crescenti presenta il vantaggio di rendere i fanghi attivi più adattabili alla sostanza in esame. A prescindere dal modo in cui viene aggiunta la sostanza in esame, si raccomanda di misurare ad intervalli regolari la velocità di flusso e/o i volumi nel o nei recipienti di stoccaggio.

Manipolazione dei fanghi attivi

40. Indipendentemente dall'inoculo utilizzato, di norma la concentrazione dei solidi nei fanghi attivi si stabilizza nel corso della prova tra 1 e 3 g/l (peso secco), a seconda della qualità e della concentrazione del mezzo organico, delle condizioni di funzionamento, della natura dei microrganismi presenti e dell'influenza della sostanza in esame.

41. Determinare i solidi in sospensione nel recipiente di aerazione almeno una volta la settimana, eliminando il surplus di fanghi per mantenere la concentrazione da 1 g/l a 3 g/l (peso secco), oppure controllare che l'età media dei fanghi si mantenga a un valore costante tra i 6 e i 10 giorni. Ad esempio, se viene scelto un tempo di ritenzione medio dei fanghi di 8 giorni, occorre rimuovere giornalmente 1/8 del volume di fanghi attivi dal recipiente di aerazione ed eliminarlo. Questa operazione va effettuata quotidianamente o, preferibilmente, attraverso una pompa automatica intermittente. Il mantenimento della concentrazione dei solidi in sospensione a un valore costante, o entro limiti ristretti, non rende però costante il tempo di ritenzione dei fanghi, e cioè la variabile che permette di determinare la concentrazione della sostanza in esame negli effluenti.

42. Per tutta la durata della prova, rimuovere, almeno una volta al giorno, eventuali fanghi che aderiscono alle pareti del recipiente di aerazione e al sedimentatore e rimetterli in sospensione. Controllare e pulire regolarmente tutti i tubi e le tubature per evitare la crescita di biofilm. Riciclare i fanghi sedimentati, rinviandoli dal sedimentatore al recipiente di aerazione, preferibilmente attraverso una pompa a intermittenza. Il sistema a vasi porosi non comporta alcun riciclo, ma occorre fare attenzione e inserire vasi interni puliti prima che il volume all'interno del recipiente raggiunga un livello troppo alto (paragrafo 21).

43. Nelle unità di Husmann si possono verificare cattiva sedimentazione e perdita di fanghi. È possibile rimediarvi effettuando in parallelo, nelle unità di prova e di controllo, una o più delle operazioni elencate di seguito:

— aggiungendo a intervalli regolari, ad esempio settimanalmente, dei fanghi freschi o un flocculante (es.: 2 ml per recipiente di una soluzione di $FeCl_3$ a 50 g/l), facendo attenzione a che il $FeCl_3$ non reagisca con la sostanza chimica in esame e non la faccia precipitare,

▼M4

— sostituendo la pompa ad aria compressa con una pompa peristaltica, al fine di creare un flusso di ricircolo dei fanghi pressappoco uguale al flusso degli affluenti in entrata da utilizzare e consentire lo sviluppo di una zona anaerobica nei fanghi sedimentati (la geometria della pompa ad aria compressa limita il flusso minimo di ritorno dei fanghi a circa dodici volte quello degli affluenti da trattare),

— pompando i fanghi in modo intermittente dal sedimentatore verso il recipiente di aerazione (es.: per 5 minuti ogni 2,5 h per riciclare da 1 l/h a 1,5 l/h),

— utilizzando un agente antischiuma atossico a concentrazione minima, che prevenga perdite dovute alla formazione di schiuma (es.: olio di silicone),

— insufflando aria nei fanghi del sedimentatore, in soffi brevi e intensi (es.: 10 secondi ogni ora),

— dosando il mezzo organico a intervalli regolari nel recipiente di aerazione (es.: dai 3 ai 10 minuti l'ora).

Campionamento e analisi

44. A intervalli regolari, misurare la concentrazione dell'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH dei fanghi attivi nei recipienti di aerazione. Assicurarsi che sia sempre disponibile sufficiente ossigeno (> 2 mg/l) e che la temperatura si situi nell'intervallo richiesto (normalmente tra i 20 e i 25 °C). Mantenere il pH a 7,5 ± 0,5 dosando piccole quantità di una base o di un acido inorganici nel recipiente d'aerazione o negli affluenti, oppure aumentando la capacità tampone del mezzo organico (cfr. paragrafo 27). Se si verifica nitrificazione viene prodotto acido: l'ossidazione di 1 mg di azoto produce l'equivalente di circa 7 mg di CO_3^-. La frequenza delle misurazioni dipende dal parametro da misurare e dalla stabilità del sistema e può variare in funzione della cadenza giornaliera o settimanale.

45. Occorre misurare il DOC o la COD negli affluenti dei recipienti di controllo e di prova. La concentrazione della sostanza in esame negli affluenti di prova va determinata attraverso analisi specifiche od occorre stimarla a partire dalla concentrazione nella soluzione madre (paragrafo 31), dal volume utilizzato e dalla quantità di liquami dosati nell'unità di prova. Si raccomanda di calcolare la concentrazione della sostanza in esame in modo da ridurre la variabilità dei dati sulla concentrazione.

46. Prelevare dei campioni adatti dagli effluenti raccolti (es. campioni compositi sulle 24 h) e filtrarli attraverso una membrana con pori di 0,45 μm oppure centrifugarli a circa 40 000 m/s^2 per circa 15 min. Ricorrere alla centrifugazione se il filtraggio risulta difficile. Determinare il DOC o la COD almeno due volte, in modo da misurare la biodegradazione completa e, se richiesto, quella primaria, attraverso un'analisi specifica per la sostanza in esame.

47. L'utilizzo della COD può far sorgere problemi analitici a basse concentrazioni ed è raccomandato solo se la concentrazione di prova è sufficientemente alta (circa 30 mg/l). Inoltre, in caso di sostanze chimiche fortemente adsorbenti, si raccomanda di misurare la quantità di sostanza chimica adsorbita nei fanghi attraverso una tecnica di analisi specifica per la sostanza in esame.

48. La frequenza di campionamento dipende dalla durata prevista della prova. Si raccomandano tre campionamenti la settimana. Quando le unità iniziano a funzionare efficacemente, occorre lasciar trascorrere un periodo di adattamento da una a sei settimane a partire dall'introduzione della sostanza in esame, in modo da consentire il raggiungimento di uno stato stazionario. Per valutare i risultati della prova è necessario ottenere, preferibilmente, un minimo di 15 valori validi nel corso della fase di plateau (paragrafo 59), che dura normalmente tre settimane. È possibile interrompere la prova una volta raggiunto un grado di eliminazione sufficiente (es. > 90 %) e se si hanno a disposizione i 15 valori sopracitati a seguito di analisi svolte quotidianamente (giorni feriali) per tre settimane. La prova non deve generalmente estendersi al di là delle 12 settimane a partire dalla prima aggiunta della sostanza in esame.

▼M4

49. Se i fanghi subiscono un processo di nitrificazione ed occorre studiare gli effetti della sostanza in esame su tale processo, è opportuno analizzare campioni degli effluenti delle unità di prova e di controllo almeno una volta la settimana per rilevare ammonio e/o nitriti e nitrati.

50. Le analisi vanno svolte il più rapidamente possibile, in particolare quelle che riguardano l'azoto. In caso fosse necessario rimandare le analisi, conservare i campioni a circa 4 °C al buio, in bottiglie piene ed ermeticamente chiuse. Se è necessario stoccare i campioni per più di 48 h, la conservazione può avvenire tramite congelazione, acidificazione (es. 10 ml/l di un soluzione di acido solforico a 400 g/l) o aggiunta di una sostanza tossica idonea [es. 20 ml/l di una soluzione di cloruro di mercurio (II) a 10 g/l]. Assicurarsi che la tecnica di conservazione non incida sui risultati dell'analisi.

Abbinamento delle unità di prova

51. Se è necessario abbinare le unità (appendice 3), occorre scambiare quotidianamente la stessa quantità di fanghi attivi (da 150 ml a 1 500 ml per i recipienti di aerazione contenenti tre litri di liquido) tra i recipienti di aerazione dell'unità di prova e dell'unità di controllo. Se la sostanza in esame si adsorbe fortemente sui fanghi, cambiare solo il surnatante dei sedimentatori. In entrambi i casi, introdurre un fattore di correzione per calcolare i risultati della prova (paragrafo 55).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

52. Per ogni valutazione programmata, calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC o di COD ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

dove:

D_t = percentuale di eliminazione del DOC o della COD al tempo t

C_s = valori del DOC o della COD negli affluenti, dovuti alla sostanza chimica in esame, preferibilmente stimati a partire dalla soluzione madre (mg/l)

E = valori del DOC o della COD misurati negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

E_o = valori del DOC o della COD misurati negli effluenti di controllo al tempo t (mg/l)

53. Il grado di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo è utile per valutare l'attività di biodegradazione dei fanghi attivi nel corso della prova. Calcolare la percentuale di eliminazione ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

dove:

D_B = percentuale di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo al tempo t

C_M = DOC o COD del mezzo organico negli affluenti di controllo (mg/l)

▼M4

Calcolare, in via facoltativa, la percentuale di eliminazione del DOC o della COD generati dal mezzo organico e dalla sostanza in esame nell'unità di prova, ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

dove:

D_T = percentuale di eliminazione del DOC o della COD nella totalità degli affluenti di prova

C_T = DOC o COD della totalità degli affluenti di prova o calcolati a partire dalle soluzioni madri (mg/l)

54. Per ogni rilevazione calcolare l'eliminazione della sostanza in esame, se è stata misurata con un metodo di analisi specifico, ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

dove:

D_{ST} = percentuale di eliminazione primaria della sostanza chimica in esame al tempo t

S_i = concentrazione misurata o stimata della sostanza chimica in esame negli affluenti di prova (mg/l)

S_e = concentrazione misurata della sostanza chimica in esame negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

55. In modalità abbinata, compensare la diluizione della sostanza in esame nel recipiente di aerazione dovuta allo scambio di fanghi utilizzando un fattore di correzione (cfr. appendice 3). Se è stato applicato un tempo medio di ritenzione idraulica pari a 6 h ed è stata scambiata la metà del volume dei fanghi attivi contenuti nel recipiente di aerazione, occorre correggere i valori determinati dell'eliminazione quotidiana (D_t, paragrafo 52) in modo da ottenere il grado reale di eliminazione, D_{tc}, della sostanza in esame, a partire dalla seguente equazione:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Espressione dei risultati della prova

56. Tracciare su un grafico le curve dell'eliminazione D_t (o D_{tc}) e D_{st}, se disponibile, in funzione del tempo (cfr. appendice 2). È possibile trarre alcune conclusioni sul processo di eliminazione della sostanza in esame (*per se* o attraverso il DOC) a partire dall'andamento della curva.

Adsorbimento

57. Se già dall'inizio della prova si osserva una forte eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC, la sostanza è stata probabilmente eliminata per adsorbimento sui solidi dei fanghi attivi. È possibile provare il fenomeno misurando l'adsorbimento della sostanza in esame mediante un'analisi specifica. È raro che l'eliminazione del DOC delle sostanze adsorbibili si mantenga elevata nel corso di tutta la prova; normalmente, il grado di eliminazione è elevato all'inizio per poi declinare progressivamente fino a raggiungere un valore di equilibrio. Tuttavia, se la sostanza chimica adsorbibile in esame fosse tale da causare, in un modo o nell'altro, un'acclimatazione della popolazione microbica, l'eliminazione del DOC della sostanza chimica aumenterebbe fino a raggiungere un elevato valore di plateau.

▼M4

Fase di latenza

58. Molte delle sostanze chimiche in esame, analogamente a quanto avviene nelle prove di screening statiche, attraversano una fase di latenza prima che avvenga una biodegradazione a pieno regime. Nel corso della fase di latenza, l'acclimatazione o l'adattamento dei batteri degradanti avviene senza che si produca, o quasi, l'eliminazione della sostanza in esame; in seguito, inizia la proliferazione dei batteri. Al termine di questa fase, quando circa il 10 per cento della quantità iniziale della sostanza in esame viene eliminata (compreso anche per adsorbimento, se del caso) si suppone che inizi la fase di degradazione. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Fase di plateau

59. La fase di plateau di una curva di eliminazione in un test in continuo è definita come la fase nella quale si raggiunge il massimo livello di degradazione. La fase di plateau dovrebbe protrarsi per almeno 3 settimane ed essere determinata attraverso la misurazione di 15 valori validi.

Grado medio di eliminazione della sostanza chimica in esame

60. Calcolare il valore medio a partire dai valori di eliminazione (D_t) della sostanza in esame durante la fase di plateau. Arrotondata all'unità più vicina (1 %), tale media rappresenta il grado di eliminazione della sostanza in esame. Si raccomanda inoltre di calcolare l'intervallo di confidenza (95 %) del valore medio.

Eliminazione del mezzo organico

61. Tracciare su un grafico la percentuale di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo (D_B) in funzione del tempo. Indicare il grado medio di eliminazione come per la sostanza in esame (paragrafo 60).

Indicazione della biodegradazione

62. Se la sostanza in esame non viene adsorbita in modo significativo sui fanghi attivi e se la curva di eliminazione presenta il profilo tipico di una curva di biodegradazione con fasi di latenza, degradazione e plateau (cfr. paragrafi 58 e 59), l'eliminazione misurata può essere attribuita con certezza alla biodegradazione. Se il livello di eliminazione è alto in fase iniziale, la prova di simulazione non consente di distinguere tra i processi di eliminazione biologici e non biologici. In questi casi, come nei casi in cui la biodegradazione suscita dubbi (ad esempio, quando si osserva un fenomeno di stripping), occorre analizzare le sostanze in esame adsorbite oppure effettuare prove di biodegradazione statiche supplementari basate su parametri che indicano chiaramente i processi biologici. Si tratta di prove che si basano sul consumo di ossigeno [capitolo C.4, lettere D, E e F del presente allegato (6)] o sulla misurazione della produzione di diossido di carbonio [capitolo C.4-C del presente allegato (6)] oppure sul metodo ISO per la prova del CO_2 nello spazio di testa (18) che utilizza un inoculo pre-esposto proveniente dal test di simulazione. Se sono state misurate sia l'eliminazione del DOC sia l'eliminazione della sostanza chimica specifica, la presenza di differenze significative (essendo la prima inferiore alla seconda) tra le percentuali indica che gli effluenti contengono dei prodotti organici intermedi probabilmente più difficili da degradare rispetto al composto progenitore.

Validità dei risultati della prova

63. L'ottenimento di informazioni sulla normale attività di biodegradazione dell'inoculo è subordinata alla determinazione del grado di eliminazione del mezzo organico (paragrafo 53) nell'unità di controllo. Il test è da considerare valido se il grado di eliminazione del DOC e della COD nella o nelle unità di controllo è superiore all'80 % dopo due settimane e se non si osserva alcun fenomeno insolito.

▼M4

64. Se è stata utilizzata una sostanza chimica di riferimento prontamente biodegradabile, il grado di biodegradazione (Dt, paragrafo 52) deve essere superiore al 90 %.

65. Se la prova viene svolta in condizioni nitrificanti, la concentrazione media negli effluenti deve essere < 1 mg/l di azoto ammoniacale e < 2 mg/l di azoto sotto forma di nitriti.

66. Se non vengono soddisfatti questi criteri, ripetere la prova utilizzando un inoculo proveniente da una fonte diversa, sottoporre a prova una sostanza di riferimento e riesaminare tutte le procedure sperimentali.

Relazione sulla prova

67. La relazione deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— dati identificativi,

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche.

Condizioni sperimentali:

— descrizione del sistema di prova utilizzato; qualsiasi modifica introdotta nella prova per testare le sostanze chimiche insolubili o volatili,

— tipo di mezzo organico,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nelle acque di scarico, se note,

— inoculo: natura e località del campionamento, concentrazione ed eventuale pretrattamento,

— soluzioni madre della sostanza chimica in esame: tenore di DOC e di TOC; modalità di preparazione, se si tratta di una sospensione; concentrazione utilizzata per la prova; giustificare, eventualmente, valori che si discostano dall'intervallo 10-20 mg/l di DOC; modalità di aggiunta; data della prima aggiunta; eventuali modifiche,

— età media dei fanghi attivi e tempo medio di ritenzione idraulica; metodo di rimozione dei fanghi attivi esausti; metodi per affrontare il rigonfiamento (bulking), la perdita di fanghi attivi ecc.,

— tecniche di analisi utilizzate,

— temperatura di prova,

— qualità del rigonfiamento dei fanghi; indice di volume dei fanghi (SVI, *sludge volume index*); solidi sospesi nella miscela liquida (MLSS, *mixed liquor suspended solids*),

— ogni eventuale scarto dalla normale modalità operativa e ogni eventuale circostanza suscettibile di aver inciso sui risultati.

Risultati della prova:

— tutti i dati derivanti dalle misurazioni (DOC, COD, analisi specifiche, pH, temperatura, concentrazione di ossigeno, solidi sospesi, sostanze azotate, se del caso),

— tutti i valori calcolati per D_t (o D_{tc}) D_B e D_{St}, presentati sotto forma di tabella e di curve di eliminazione,

— informazioni sulle fasi di latenza e di plateau, la durata della prova, il grado di eliminazione della sostanza in esame e del mezzo organico nell'unità di controllo, insieme alle informazioni statistiche e conclusioni sulla biodegradabilità e sulla validità della prova,

— discussione dei risultati.

▼**M4**

BIBLIOGRAFIA

(1) Swisher RD (1987). «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

(7) Capitolo C.12 del presente allegato, Biodegradazione — saggio SCAS modificato.

(8) Capitolo C.19 del presente allegato, Stima del coefficiente di adsorbimento (K_{OC}) sul terreno e sui fanghi di acque da scarico mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pagg. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

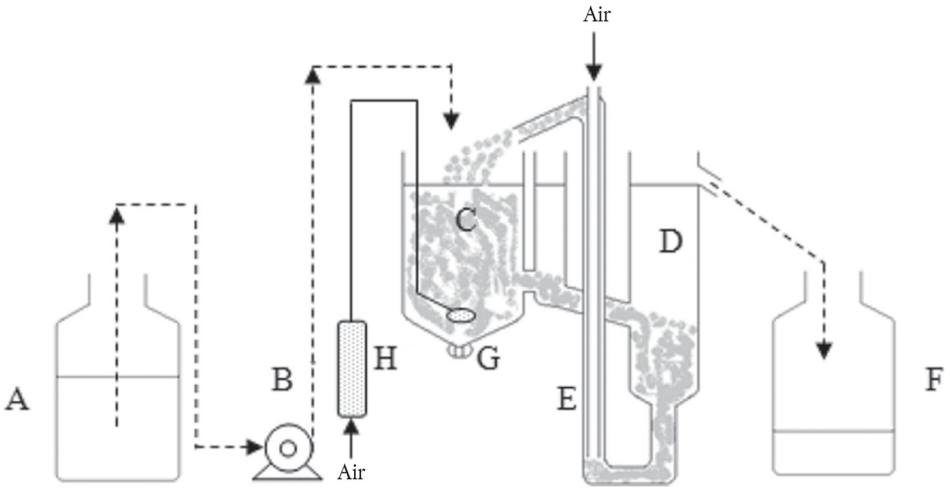
▼M4

Appendice 1

Figura 1

Attrezzatura per valutare la biodegradabilità

Unità di Husmann

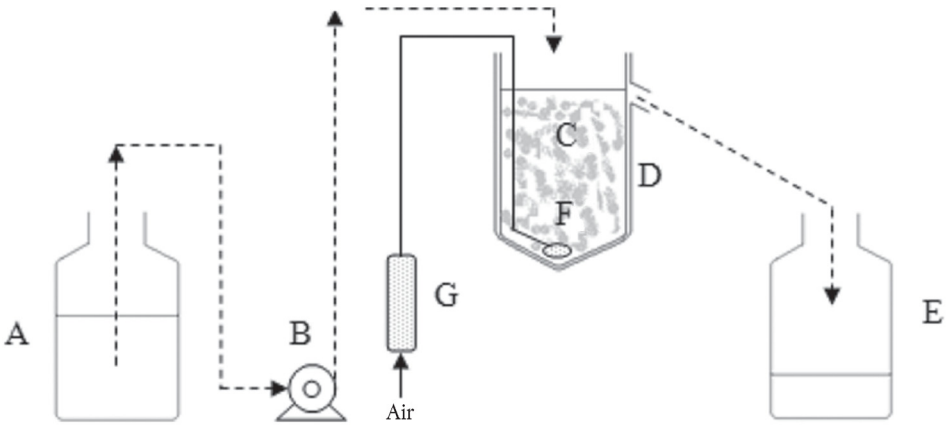


A. recipiente di stoccaggio
B. pompa dosatrice
C. recipiente di aerazione (capacità 3 litri)
D. decantatore
E. pompa ad aria compressa
F. recipiente di raccolta
G. aeratore
H. flussimetro

Figura 2

Attrezzatura per valutare la biodegradabilità

Vaso poroso

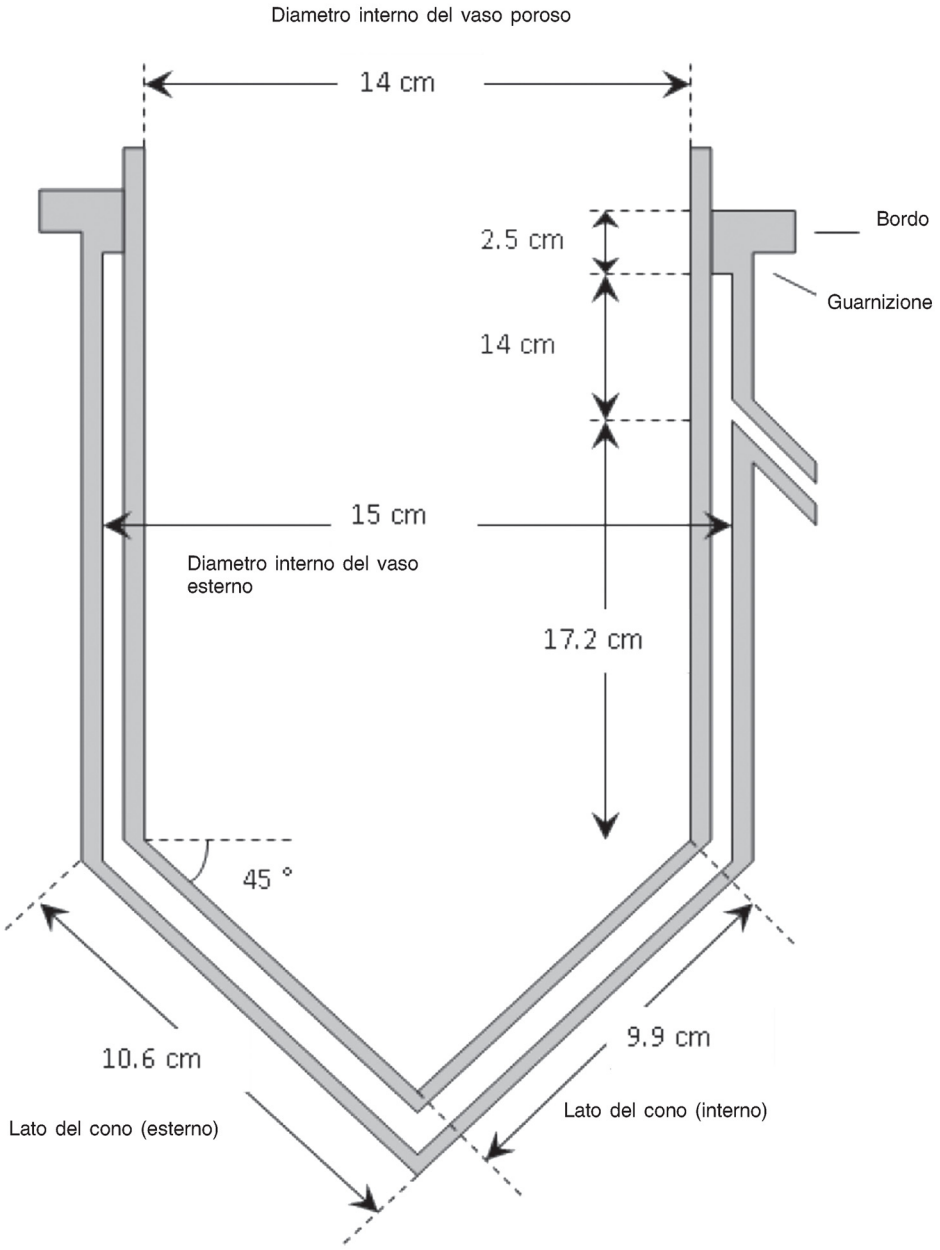


A. recipiente di stoccaggio
B. pompa dosatrice
C. recipiente poroso di aerazione
D. recipiente esterno impermeabile
E. recipiente di raccolta
F. diffusore
G. flussimetro

▼M4

Figura 3

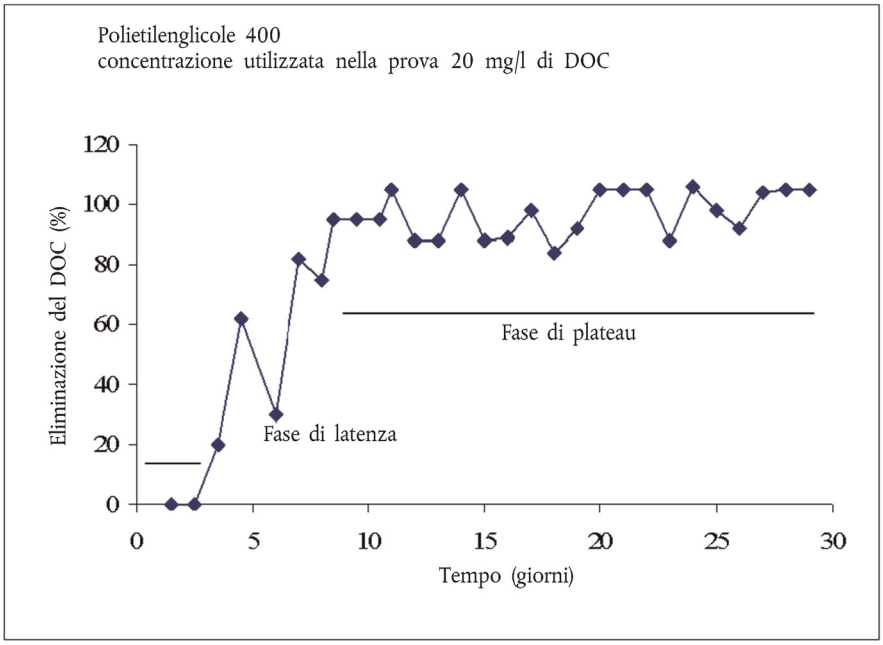
Dettagli del recipiente di aerazione a vaso poroso da 3 litri



▼**M4**

Appendice 2

Esempio di curva di eliminazione



▼M4

Appendice 3

[INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI]

ABBINAMENTO DELLE UNITÀ DI PROVA

Nel tentativo di livellare le popolazioni microbiche nei fanghi attivi dell'unità di prova (dove confluiscono i liquami più la sostanza in esame) e dell'unità di controllo (dove confluiscono solo i liquami) è stato introdotto uno scambio giornaliero di fanghi tra le due unità (1). La procedura, detta «abbinamento», ha dato origine al «processo ad unità abbinate». L'abbinamento, inizialmente realizzato su unità di Husmann a fanghi attivi, è stato applicato anche a unità a vasi porosi (2) (3). I risultati ottenuti con unità abbinate e con unità non abbinate, sia nel caso di unità di Husmann sia in quello di unità a vasi porosi, non presentano differenze significative e non c'è quindi alcun vantaggio ad investire tempo ed energia nell'abbinamento.

Lo scambio dei fanghi può far credere che avvenga un'eliminazione piuttosto importante, dato che una parte della sostanza chimica in esame viene trasferita e che lo scarto tra la concentrazione di tale sostanza negli effluenti di prova e negli effluenti di controllo diviene pressoché nullo. È quindi necessario applicare dei fattori di correzione che dipendono dalla frazione oggetto dello scambio e dal tempo medio di ritenzione idraulica. È stato pubblicato un metodo di calcolo più dettagliato (1).

Calcolare il grado d'eliminazione corretto del DOC o della COD utilizzando la formula generale:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

dove:

D_{tc} = percentuale di eliminazione, corretta, del DOC o della COD

D_t = percentuale di eliminazione, determinata, del DOC o della COD

a = frazione volumetrica scambiata tra le unità a fanghi attivi

r = tempo medio di ritenzione idraulica (h)

Se, per esempio, viene scambiata la metà del volume del recipiente di aerazione (a = 0,5) e il tempo medio di ritenzione idraulica è di 6 h, la formula di correzione diventa:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFIA

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pagg. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendice 4

VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DEI FANGHI ATTIVI

Processo a mezzo delle sostanze chimiche in esame

1. Può succedere che una sostanza chimica (o dei liquami) non vengano né degradati né eliminati nella prova di simulazione e che possano addirittura avere un effetto inibitorio sui microrganismi dei fanghi. Alcune sostanze chimiche vengono biodegradate a basse concentrazioni ma svolgono un'azione inibitoria a concentrazioni superiori (ormesi). Gli effetti inibitori possono essere rivelati a uno stadio precedente oppure essere determinati attraverso una prova di tossicità, utilizzando un inoculo simile o identico a quello usato nella prova di simulazione (1). Si tratta di metodi di prova inibitori del consumo di ossigeno [capitolo C.11 del presente allegato (2) e norma ISO 8192 (3)] oppure inibitori della crescita degli organismi dei fanghi attivi [norma ISO 15522 (4)]

2. L'inibizione che avviene nel corso della prova di simulazione si manifesta attraverso la differenza del DOC e della COD degli effluenti del recipiente di prova e di quelli del recipiente di controllo, che è superiore al DOC aggiunto attraverso la sostanza chimica in esame. Altrimenti espresso, la presenza della sostanza chimica in esame riduce la percentuale di eliminazione della COD (nonché del BOD e della COD, e/o di NH^{+}_{4}) del mezzo organico trattato. Se ciò avviene, occorrerà ricominciare la prova riportando la concentrazione della sostanza in esame a un livello al quale non abbia effetti inibitori ed eventualmente anche diminuendone ulteriormente la concentrazione fino a un valore che la renda biodegradata. Tuttavia, se la sostanza in esame (o i liquami) alterano il processo a tutte le concentrazioni testate, si tratta verosimilmente di una sostanza difficile, se non impossibile, da trattare biologicamente, ma potrebbe valere la pena di ripetere la prova con fanghi attivi provenienti da una fonte diversa e/o sottoporli a un'acclimatazione più progressiva.

3. Al contrario, se nella simulazione di prova la sostanza in esame viene eliminata biologicamente al primo tentativo, la sua concentrazione va aumentata nel caso in cui si cerchi di stabilire se tale sostanza possa svolgere azione inibitoria.

4. Quando si tenta di determinare il grado di inibizione, occorre ricordare che la popolazione dei fanghi attivi può evolvere e questo fa sì che, nel tempo, i microrganismi possano sviluppare una tolleranza nei confronti della sostanza chimica inibitrice.

5. Calcolo del grado di inibizione:

   È possibile calcolare le percentuali globali di eliminazione, R_o, di BOD, DOC, COD ecc. nelle unità di prova e di controllo utilizzando la seguente formula:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   dove:

   I = concentrazione di BOD, DOC, COD ecc. negli affluenti dei recipienti di prova o di controllo (mg/l)

   E = concentrazioni rispettive negli effluenti (mg/l)

   I ed E devono essere corrette per tenere conto del DOC proveniente dalla sostanza in esame nelle unità di prova, altrimenti la percentuale di inibizione risulterà imprecisa.

▼**M4**

Il grado di inibizione prodotto dalla presenza della sostanza in esame può essere calcolato secondo la formula seguente:

$$\%\text{diinibizione} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

dove:

R_c = percentuale di eliminazione nei recipienti di controllo

R_t = percentuale di eliminazione dei recipienit di prova

BIBLIOGRAFIA

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Capitolo C.11 del presente allegato, Biodegradazione — Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Appendice 5

Sostanze chimiche in esame scarsamente solubili in acqua — sostanze volatili

Sostanze chimiche scarsamente solubili in acqua

Sono stati pubblicati apparentemente pochi studi incentrati su prove di simulazione del trattamento delle acque reflue condotte su sostanze chimiche scarsamente solubili in acqua e insolubili (1) (2) (3).

Non esiste un metodo universale di dispersione di una sostanza chimica applicabile a tutte le sostanze chimiche insolubili. Dei quattro tipi di metodi descritti nella norma ISO 10634 (4), i due che sembrerebbero essere adatti alla dispersione delle sostanze destinate a una prova di simulazione fanno ricorso ad agenti emulsionanti e/o energia ultrasonica. È opportuno determinare la stabilità della dispersione ottenuta su un periodo di almeno 24 ore. Le dispersioni convenientemente stabilizzate, contenute in recipienti costantemente sottoposti ad agitazione (paragrafo 38), sono in seguito introdotte nei recipienti di aerazione, separatamente dai liquami domestici (o artificiali).

Se le dispersioni sono stabili, è necessario esaminare in che modo è possibile determinare la sostanza in esame nella sua forma dispersa. È improbabile che il DOC sia stato determinato in maniera adeguata, e va quindi messo a punto un metodo analitico specifico per la sostanza in esame da applicare agli effluenti, ai solidi degli effluenti e ai fanghi attivi. Il destino della sostanza chimica in esame nella simulazione del trattamento a fanghi attivi sarà in tal caso determinato nelle fasi solide e liquide. È quindi necessario calcolare un «bilancio di massa» per stabilire se la sostanza in esame è stata biodegradata. Tale bilancio, tuttavia, segnala solo la biodegradazione primaria. Sarà necessario dimostrare la biodegradazione completa attraverso un test respirometrico di pronta biodegradabilità [capitolo C.4 del presente allegato (5), lettere C, F o D] utilizzando come inoculo dei fanghi esposti alla sostanza in esame nella prova di simulazione.

Sostanze chimiche volatili

La simulazione del trattamento delle acque reflue con le sostanze chimiche volatili è discutibile e problematica. Come già rilevato per le sostanze poco solubili in acqua, sono apparentemente rari gli studi che descrivono le prove di simulazione con sostanze volatili. Occorre adattare uno strumento classico per la miscelatura integrale turando ermeticamente i recipienti di aerazione e decantazione, misurando e controllando il flusso d'aria con flussimetri, e facendo passare il gas in uscita attraverso trappole che consentono di raccogliere materia organica volatile. In alcuni casi, il gas in uscita viene convogliato verso una trappola fredda tramite una pompa a vuoto, oppure viene estratto mediante la tecnica «*purge and trap*» in una trappola contenente Tenax e gel di silice per analisi gascromatografiche. La sostanza in esame presente nella trappola può essere determinata analiticamente.

La prova viene svolta in due fasi. Le unità vengono messe in funzione inizialmente senza fanghi, pompando i liquami artificiali addizionati della sostanza in esame nel recipiente di aerazione. Per alcuni giorni i campioni di affluenti, effluenti e gas in uscita vengono raccolti e analizzati per determinare la presenza della sostanza in esame. A partire dai dati raccolti, è possibile calcolare la percentuale (R_{vs}) della sostanza in esame estratta dal sistema tramite stripping.

Si conduce in seguito la normale prova biologica (con fanghi attivi), in condizioni sperimentali identiche a quelle utilizzate per lo studio basato sullo stripping, misurando anche il DOC e la COD, per verificare che le unità operino efficacemente. È inoltre opportuno eseguire analisi occasionali per misurare la presenza della sostanza in esame negli affluenti, negli effluenti e nei gas in uscita nel corso della prima parte della prova; dopo l'acclimatazione, le analisi vanno condotte con più frequenza. I dati raccolti allo stato stazionario permettono, di nuovo, di calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame nella fase liquida attraverso i processi fisici e biologici (R_T), nonché la proporzione estratta dal sistema (R_V) tramite stripping.

▼M4

Calcolo:

a) nella prova non biologica, la percentuale (R_{VP}) della sostanza in esame estratta dal sistema (tramite stripping) può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

dove:

R_{VP} = eliminazione della sostanza in esame per volatilizzazione (%),

S_{VP} = sostanza in esame raccolta nella trappola espressa come concentrazione equivalente nella fase liquida (mg/l),

S_{IP} = concentrazione della sostanza in esame negli effluenti (mg/l);

b) nella prova biologica, la percentuale (R_V) della sostanza in esame estratta dal sistema (tramite stripping) può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

dove:

R_V = eliminazione della sostanza in esame per volatilizzazione nella prova biologica (%),

S_V = sostanza in esame raccolta nella trappola, nella prova biologica, espressa come concentrazione equivalente negli affluenti liquidi (mg/l),

S_I = concentrazione della sostanza in esame negli affluenti (mg/l);

c) nella prova biologica, la percentuale (R_T) della sostanza in esame eliminata attraverso tutti i diversi processi può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

dove:

S_E = concentrazione della sostanza chimica in esame negli effluenti (liquidi) (mg/l);

d) quindi, la percentuale (R_{BA}) rimossa per biodegradazione e per adsorbimento può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

È consigliabile svolgere altre prove per determinare se la sostanza in esame è adsorbita; in tal caso, si potrebbe procedere ad un'ulteriore correzione;

e) un confronto tra la proporzione di sostanza in esame estratta durante la prova biologica (R_v) e durante quella non-biologica (R_{vp}) mostra l'effetto complessivo del trattamento biologico sull'emissione della sostanza in esame nell'atmosfera.

Esempio: Benzene

Tempo di ritenzione dei fanghi = 4 giorni

Tempo di ritenzione del liquame artificiale = 8 h

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Pertanto,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % e R_{BA} = 85 %.

Si è ipotizzato che il benzene non venga adsorbito sui fanghi attivi.

BIBLIOGRAFIA

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

▼M4

Appendice 6

Effetti del tempo di ritenzione dei fanghi sulla trattabilità delle sostanze chimiche

INTRODUZIONE

1. Il metodo qui descritto è stato concepito per verificare se le sostanze chimiche in esame (in generale quelle riconosciute come biodegradabili intrinsecamente ma non prontamente) possono venire biodegradate nei limiti imposti dagli impianti di trattamento delle acque reflue. I risultati sono espressi in termini di percentuali di eliminazione e di biodegradazione. Le condizioni di funzionamento delle unità a fanghi attivi e la scelta degli affluenti da trattare portano a oscillazioni piuttosto marcate della concentrazione della sostanza in esame negli effluenti. Le prove vengono svolte su una sola concentrazione nominale di solidi dei fanghi attivi o su un solo tempo di ritenzione nominale dei fanghi e i regimi di eliminazione dei fanghi esausti descritti possono far variare notevolmente il tempo di ritenzione nel corso della prova, sia da un giorno all'altro che all'interno di una sola giornata.

2. In questa variante (1) (2), il tempo di ritenzione dei fanghi è mantenuto all'interno di limiti molto più stretti nel corso di ciascun periodo di 24 ore (come avviene su vasta scala) e quindi la concentrazione negli effluenti risulta più costante. Si raccomanda l'uso di liquami domestici in quanto generano un tasso più elevato e consistente di eliminazione. Occorre inoltre esaminare gli effetti di un certo numero di valori attinenti ai tempi di ritenzione dei fanghi ed è necessario uno studio più dettagliato per determinare l'incidenza di una gamma di temperature diverse sulla concentrazione degli effluenti.

3. Non esiste ancora un consenso generale sui modelli cinetici che riproducono la biodegradazione delle sostanze chimiche nelle condizioni riscontrabili in un impianto per il trattamento delle acque reflue. Si è scelto di applicare ai dati raccolti il modello di Monod per la crescita batterica e per l'utilizzo del substrato (1) (2), in quanto trattasi di metodo destinato ad essere applicato solo a sostanze chimiche prodotte in grandi quantità e quindi presenti nelle acque reflue in concentrazioni superiori a 1 mg/l. La validità del modello semplificato e delle ipotesi formulate è stata stabilita utilizzando una serie di alcoli etossilati con vari gradi di biodegradabilità primaria (2) (3).

Nota: Questa variante segue da vicino il metodo di prova qui descritto (C.10-A), discostandosene solo nei dettagli illustrati di seguito.

PRINCIPIO DELLA PROVA

4. Si utilizzano delle unità a vaso poroso con fanghi attivi — concepite per facilitare l'eliminazione (quasi) continua di liquami misti grazie a una regolazione molto precisa dei tempi di ritenzione dei fanghi (SRT, o θ_S) — in modo non abbinato, con diversi tempi di ritenzione e, facoltativamente, diverse temperature. Il tempo di ritenzione si situa generalmente tra 2 e 10 giorni e la temperatura tra 5 e 20 °C. Si dosano, separatamente, nelle unità i liquami di preferenza domestici e una soluzione della sostanza in esame, agli intervalli più idonei ad ottenere il tempo di ritenzione richiesto per i liquami (da 3 a 6 ore) e la concentrazione desiderata della sostanza in esame nei liquami da trattare. Le unità di controllo che non ricevono la sostanza in esame funzionano in parallelo, a fini di comparazione.

5. È possibile utilizzare altri tipi di apparecchiature, ma occorre prestare estrema attenzione per assicurare un controllo ottimale dei tempi di ritenzione. Ad esempio, se si utilizzano impianti che comprendono un decantatore, potrebbe essere necessario tener conto della perdita di solidi attraverso gli effluenti. Inoltre, è necessario prendere precauzioni particolari per evitare errori dovuti a variazioni della quantità dei fanghi nei decantatori.

▼M4

6. Le unità sono fatte funzionare nelle varie combinazioni di condizioni scelte e, dopo aver raggiunto l'equilibrio, si misurano le concentrazioni medie della sostanza in esame negli effluenti nello stato stazionario e, facoltativamente, la COD, su un periodo di circa tre settimane. La valutazione della percentuale di eliminazione della sostanza in esame e, facoltativamente, della COD, è espressa da una rappresentazione grafica della relazione tra le condizioni di funzionamento dell'impianto e la concentrazione negli effluenti. A partire da qui è possibile calcolare le costanti cinetiche sperimentali e prevedere le condizioni nelle quali la sostanza in esame può essere trattata.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

7. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 12 e 13.

SOGLIE MINIME

8. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 14 e 15.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

9. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 16.

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

10. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 17 e 18.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

11. Per questo metodo, l'unità adatta è una versione modificata del sistema a vaso poroso (appendice 6.1). Si tratta di un recipiente interno (o rivestimento) in polipropilene poroso di 3,2 mm di spessore, con pori da circa 90 μm e con giunti saldati di testa, che rendono questa unità più robusta rispetto a quella descritta al paragrafo 21 del presente capitolo, C.10-A. Il rivestimento è inserito in un recipiente esterno in polietilene impermeabile composto da due elementi: una base circolare forata (per permettere il passaggio di due tubi di aerazione e di un tubo per lo scarico dei fanghi) e un cilindro superiore avvitato sulla base e provvisto di un'uscita posizionata in modo tale da versare un volume noto (3 l) nel vaso poroso. Uno dei tubi di aerazione è dotato di un diffusore e l'altro è aperto alle estremità e disposto ad angolo retto rispetto al diffusore posto nel recipiente. Questo sistema crea turbolenze sufficienti ad assicurare che i contenuti del recipiente siano mescolati integralmente e a generare concentrazioni dell'ossigeno disciolto superiori a 2 mg/l.

12. Sistemare le unità, in numero adeguato, in un bagnomaria o in ambienti a temperatura costante e termostatizzata tra 5 e 20 °C (± 1 °C). Sono necessarie due pompe per dosare la soluzione della sostanza in esame e dei liquami decantati nei recipienti di aerazione alla portata richiesta (rispettivamente 0-1,0 ml/min e 0-25 ml/min) e una terza pompa per l'eliminazione dei fanghi esausti dai recipienti di aerazione. Il flusso dei fanghi esausti deve essere molto lento ed è ottenuto attraverso una pompa regolata a velocità superiore che funziona a intermittenza grazie a un timer settato, ad esempio, su 10 secondi al minuto, che risulta in un flusso di 3 ml/min e in una portata di fanghi eliminati pari a 0,5 ml/min.

Apparecchio di filtrazione o centrifuga

13. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 23.

Apparecchiatura di analisi

14. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 24.

Acqua

▼M4

15. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 25 e 26.

Mezzo organico

16. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 27.

Liquami artificiali

17. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 28.

Liquami domestici

18. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 29.

Fanghi attivi

19. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 30.

Soluzioni madre della sostanza in esame

20. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 31 e 32.

PROCEDURA

Preparazione dell'inoculo

21. Si applica il capitolo C.10-A solo il paragrafo 34 — utilizzare fanghi attivi (circa 2,5 g/l).

Numero di unità di prova

22. Nel caso di una prova semplice, ad esempio per misurare unicamente la percentuale di eliminazione, è sufficiente un solo valore di tempo di ritenzione dei fanghi, ma se si vuole ricavare dati necessari a calcolare le costanti cinetiche sperimentali, occorreranno 4 o 5 valori del tempo di ritenzione. I valori scelti si situano generalmente tra 2 e 10 giorni. Risulta più pratico effettuare una prova applicando 4 o 5 diversi valori del tempo di ritenzione dei fanghi simultaneamente alla stessa temperatura; per studi più approfonditi, si utilizzano gli stessi tempi di ritenzione o eventualmente una serie di valori diversi, a temperature diverse situate nell'intervallo tra 5 e 20 °C. La biodegradazione primaria (utilizzo principale) richiede normalmente una sola unità per ciascuna combinazione di condizioni. Tuttavia, per la biodegradazione completa occorre aggiungere un'unità di controllo per ciascuna combinazione di condizioni, destinata ad accogliere i liquami ma non la sostanza in esame. Se si presume che nei liquami utilizzati sia presente la sostanza in esame, è possibile incorporare delle unità di controllo al momento di valutare la biodegradazione primaria e apportare le correzioni necessarie ai calcoli.

Dosaggio del mezzo organico e della sostanza chimica in esame

23. Si applicano i paragrafi da 36 a 39 del capitolo C.10-A, facendo però attenzione a dosare separatamente la soluzione della sostanza in esame e a utilizzare diversi tassi di eliminazione dei fanghi. Occorre inoltre monitorare frequentemente, ad esempio due volte al giorno, e se necessario aggiustare entro ± 10 %, la portata degli affluenti, degli effluenti e dei fanghi esausti. Se i metodi di analisi comportano delle difficoltà per i liquami domestici, si possono utilizzare al loro posto dei liquami artificiali, assicurandosi che i diversi mezzi forniscano dati cinetici paragonabili.

Manipolazione delle unità a fanghi attivi

24. Si applicano i paragrafi da 40 a 43 del capitolo C.10-A, facendo però attenzione a controllare il tempo di ritenzione dei fanghi solo attraverso un'eliminazione a flusso «costante» dei fanghi esausti.

Campionamento e analisi

25. Si applicano i paragrafi da 44 a 50 del capitolo C.10-A, determinando, inoltre, la concentrazione della sostanza in esame ed eventualmente il DOC; la COD non va utilizzata.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

26. Si applica il capitolo C.10 lettera A, paragrafi da 52 a 54.

Espressione dei risultati della prova

27. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi da 56 a 62.

Calcolo delle costanti cinetiche

28. È più realistico esprimere la concentrazione media della sostanza in analisi allo stato stazionario negli effluenti e descrivere come essa vari in funzione delle condizioni di funzionamento dell'impianto, invece che citare la percentuale di biodegradazione primaria. A tal fine è possibile utilizzare l'equazione [6] dell'appendice 6.2, che può fornire i valori dei parametri K_S, μ_m e θ_{SC}, tempo critico di ritenzione dei fanghi.

[Alternativamente, è possibile ottenere i valori di K_S e μm utilizzando un programma informatico semplice che adatta la curva teorica calcolata a partire dall'equazione [2] (appendice 6.2) ai valori sperimentali ottenuti. Anche se la soluzione ottenuta non rappresenterà una risposta assoluta, si può ottenere una ragionevole approssimazione dei valori K_S e μ_m].

Variabilità dei risultati

29. Capita frequentemente di ottenere parametri cinetici variabili per una medesima sostanza. Si ritiene che le condizioni di crescita dei fanghi e le condizioni nella quali si svolge la prova (come al paragrafo 5 e in altre prove) incidano fortemente sui risultati. Un aspetto di tale variabilità è stato esaminato da Grady *et al* (4), che hanno suggerito di applicare i termini «effettiva» e «intrinseca» a due condizioni estreme che rappresentano i limiti dello stato fisiologico raggiungibile da una coltura nel corso di una prova cinetica. Se lo stato si mantiene inalterato nel corso della prova, i valori dei parametri cinetici riflettono le condizioni dell'ambiente dal quale provengono i microrganismi; tali valori vengono detti «effettivi» ovvero attualmente esistenti. All'estremo opposto, se le condizioni della prova sono tali da permettere il pieno sviluppo del sistema di sintesi proteica e quindi il massimo tasso di crescita, i parametri cinetici risultanti vengono detti «intrinseci» e dipendono unicamente dalla natura del substrato e dal tipo di batteri che compongono la coltura. A titolo orientativo, si otterranno valori effettivi mantenendo il rapporto tra concentrazione del substrato e microrganismi degradanti (S_o/X_o) a livelli bassi (ad esempio 0,025), mentre si otterranno valori intrinseci mantenendolo a livelli alti (ad esempio, 20 o oltre). In entrambi i casi, S_o deve essere pari o superiore al valore applicabile di Ks, la costante di semisaturazione.

30. La variabilità e altri aspetti della cinetica di biodegradazione sono stati discussi nel corso di una recente riunione del SETAC (5). Gli studi discussi, sia quelli già pubblicati sia quelli in fase progettuale, dovrebbero presto consentirci di avere un'immagine più chiara della cinetica alla base del trattamento delle acque reflue negli impianti e permetterci quindi una migliore interpretazione dei dati esistenti e di impostare in futuro delle linee guida più pertinenti per i metodi di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

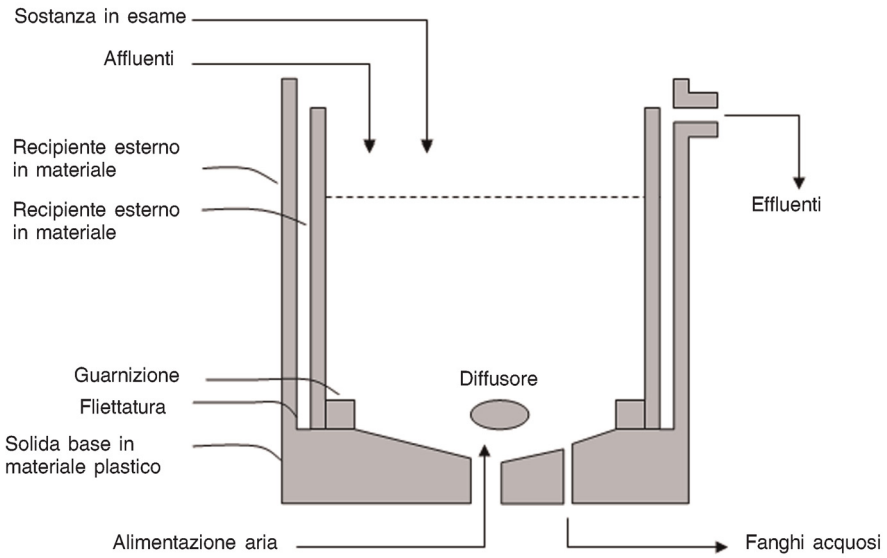
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

Appendice 6.1

Vaso poroso con regolazione del tempo di ritenzione dei fanghi



▼M4

Appendice 6.2

Calcolo delle costanti cinetiche

1. Supponendo che si applichi la cinetica di Monod e tenendo conto di un bilancio di massa dei solidi attivi e del substrato nel sistema a fanghi attivi (1), le seguenti espressioni descrivono lo stato stazionario:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ovvero

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

dove:

S_1 = concentrazione del substrato negli effluenti (mg/l)

K_S = costante di semisaturazione, concentrazione alla quale $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = tasso di crescita specifico (d^{-1})

μ_m = valore massimo di μ_m (d^{-1})

K_d = velocità di degradazione specifica dei solidi attivi (d^{-1})

θ_S = tempo medio di ritenzione dei fanghi (d)

Lo studio dell'equazione conduce alle seguenti conclusioni:

i) la concentrazione negli effluenti è indipendente da quella negli affluenti (S_0); di conseguenza, la percentuale di biodegradazione varia in funzione della concentrazione negli affluenti, S_0;

ii) l'unico parametro di controllo dell'impianto che incide su S_1 è il tempo di ritenzione dei fanghi θ_S;

iii) a una data concentrazione negli affluenti, S_0, corrisponderà un tempo critico di ritenzione dei fanghi, secondo la seguente formula:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

dove:

θ_{SC} = tempo critico di ritenzione dei fanghi al di sotto del quale i microrganismi competenti vengono eliminati dall'impianto;

iv) dato che gli altri parametri dell'equazione [2] sono associati alla cinetica di crescita, è probabile che la temperatura incida sul livello del substrato degli effluenti e sull'età critica dei fanghi, ovvero, il tempo di ritenzione dei fanghi necessario ad ottenere un certo grado di trattamento aumenta in funzione della diminuzione della temperatura.

2. A partire da un bilancio di massa dei solidi nel sistema a vaso poroso, e supponendo che la concentrazione dei solidi negli effluenti dell'impianto, X_2, sia bassa rispetto a quella nel recipiente di aerazione, X_1, il tempo di ritenzione dei fanghi è dato da:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

e

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

dove:

V = volume del recipiente di aerazione (l)

X_1 = concentrazione dei solidi nel recipiente di aerazione (mg/l)

X_2 = concentrazione dei solidi negli effluenti (mg/l)

Q_0 = velocità di flusso degli affluenti (l/d)

Q_1 = velocità di flusso dei fanghi esausti (l/d)

Regolando la velocità di flusso dei fanghi esausti, Q_1, è quindi possibile regolare il tempo di ritenzione dei fanghi al determinato valore prescelto.

Conclusioni:

3. Scopo principale della prova è consentire di prevedere la concentrazione della sostanza in esame negli effluenti e, di conseguenza, i livelli di tale sostanza nelle acque che li ricevono.

4. Tracciando S_1 in funzione di θ_S è a volte possibile valutare con facilità il tempo critico di ritenzione dei fanghi, come ad esempio nella curva 3 della figura 1. Se non è possibile farlo, il valore θ_{SC} può essere calcolato, insieme ai valori approssimativi di μ_m e K_S, tracciando S_1, in funzione di $S_1 \bullet \theta_S$.

Riarrangiando l'equazione, si ottiene:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

se il valore di K_d è basso, si ottiene $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ e [5] diventa:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Di conseguenza la curva dovrebbe diventare una retta (cfr. la figura 2) con inclinazione $1/\mu_m$ che interseca K_S/μ_m; inoltre: $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Tre temperature; cinque tempi di ritenzione dei fanghi

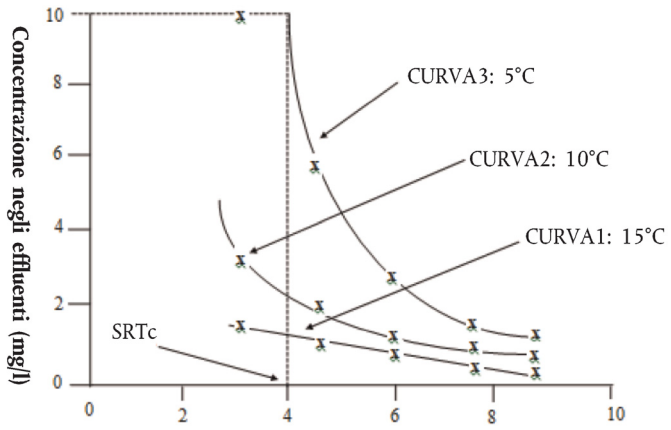
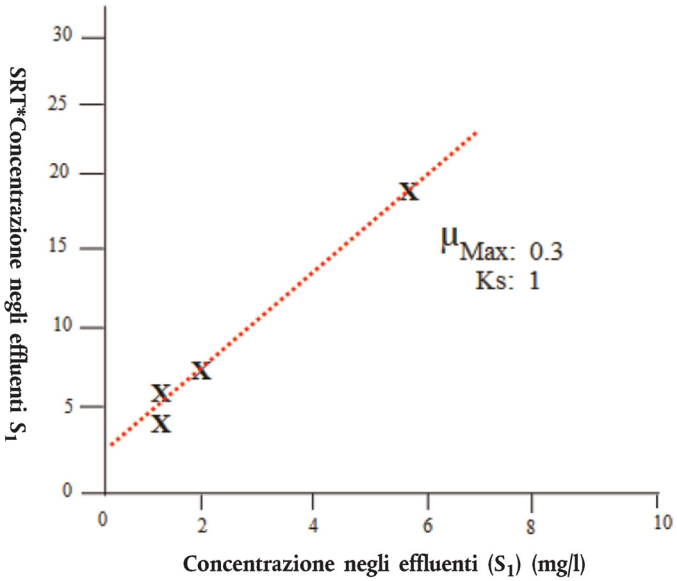


Figura 2

Retta di regressione SRT · S_1 in funzione di S_1 a T = 5 °C



Legenda

Concentrazione negli effluenti

Curva

▼M4

Appendice 7

PROVE SVOLTE A BASSE CONCENTRAZIONI (µg/l)

1. Negli ambienti acquatici, che includono le acque reflue, diverse sostanze chimiche sono spesso presenti a concentrazioni molto basse (µg/l). In tal caso, le sostanze non servono da substrati primari per la crescita ed è invece più verosimile che subiscano una degradazione in quanto substrati secondari che non intervengono nella crescita, parallelamente a una serie di composti a base di carbonio presenti in natura. Di conseguenza, la degradazione di questo tipo di composti non risponde al modello descritto all'appendice 6. Si possono però applicare diversi altri modelli e, date le condizioni prevalentemente presenti nei sistemi di trattamento delle acque reflue, è possibile utilizzare contemporaneamente molti modelli. Occorre svolgere studi molto più approfonditi per chiarire questo punto.

2. Nel frattempo, è possibile applicare la procedura descritta nel presente testo (capitolo C.10-A), ma solo per la biodegradabilità primaria, utilizzando basse concentrazioni idonee (< 100 µg/l) e una procedura di analisi convalidata. È possibile calcolare la percentuale di biodegradazione (cfr. paragrafo 54 del metodo di prova) a condizione che venga tenuto conto dei processi abiotici (adsorbimento, volatilità ecc.). Si può prendere ad esempio lo studio condotto da Nyholm e dai suoi collaboratori (1) (2), con un ciclo di 4 ore in un sistema a riempimento e scarico (*fill and draw*). Lo studio riporta costanti di pseudo primo ordine per le cinque sostanze chimiche addizionate a liquami artificiali, da 5 a 100 µg/l (per la biodegradabilità finale è possibile utilizzare sostanze di prova marcate con ^{14}C). La descrizione di questo processo si situa al di fuori dell'ambito del presente metodo di prova in quanto non si tratta di procedure sulle quali vi è consenso, sebbene un metodo proposto per la norma ISO 14592 (3) contenga delle indicazioni sull'uso delle sostanze chimiche marcate con ^{14}C.

Prova a mezzo di unità semicontinue per fanghi attivi (SCAS)

3. È stata in seguito proposta una prova più semplice, in due fasi (4) (5) (6); il metodo, che prevede il ricorso a unità semicontinue (SCAS), è seguito da prove cinetiche brevi condotte su campioni prelevati dalle unità SCAS. Il sistema SCAS funziona con flussi di fanghi esausti conosciuti (a differenza del metodo originale C.12) e viene alimentato con liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE modificata o con liquami domestici. La formula dei liquami artificiali è stata modificata (a causa di un diverso valore di pH e scarsa capacità di sedimentazione dei fanghi) con l'aggiunta di un tampone fosfato, di estratto di lievito, cloruro di ferro (III) e tracce di oligoelementi, inoltre la COD è stata aumentata a circa 750 mg/l incrementando la concentrazione di peptone ed estratti di carne. Le unità hanno funzionato in cicli continui di 24 ore: 23 ore di aerazione, eliminazione dei fanghi esausti, sedimentazione, estrazione del liquido sopranatante (effluenti) seguite dall'aggiunta di liquami artificiali e sostanza in esame, fino a 100 µg/l (vale a dire circa la stessa concentrazione applicata nella prova breve). Una volta la settimana il 10 % della totalità dei fanghi è stata sostituita con fanghi freschi in modo da mantenere l'equilibrio della popolazione microbica.

4. Le concentrazioni della sostanza in esame vengono misurate inizialmente e alla fine della fase di aerazione e la prova viene condotta finché si raggiunge un'eliminazione costante della sostanza: possono essere necessari da una settimana a diversi mesi.

Prova breve

5. Viene svolta una prova breve (es. 8 ore) per determinare la costante di velocità cinetica di pseudo primo ordine per la degradazione della sostanza chimica in esame nei fanghi attivi le cui origini e modalità di sviluppo sono conosciute ma diverse. In particolare, vengono presi campioni di fanghi dai reattori SCAS — alla fine di un periodo di aerazione, quando la concentrazione del substrato è bassa — durante un test di acclimatazione (paragrafi 3 e 4). A scopo di confronto, i fanghi possono essere presi anche da

▼M4

un'unità SCAS operante in parallelo ma non esposta alla sostanza in esame. Aerare le miscele di fanghi e della sostanza in esame aggiunta a due o più concentrazioni nell'intervallo da 1 a 50 μg/l, senza aggiungere liquami artificiali o altro substrato organico. La sostanza in esame rimasta in soluzione viene misurata a intervalli regolari, ad esempio ogni ora, a seconda della sua degradabilità, per non più di 24 ore. Centrifugare i campioni prima di sottoporli ad adeguata analisi.

Calcoli

6. I dati provenienti dalle unità SCAS vengono utilizzati per calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame (paragrafo 54). È inoltre possibile calcolare la costante di velocità media, K_1 (corretta, per tenere conto della concentrazione dei solidi in sospensione), ricorrendo alla formula seguente:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

dove:

t = tempo di aerazione (23 ore)

C_e = concentrazione alla fine del periodo di aerazione (μg/l)

C_i = concentrazione all'inizio del periodo di aerazione (μg/l)

SS = concentrazione dei solidi dei fanghi attivi (g/l)

7. Nella prova breve, tracciare il logaritmo della concentrazione percentuale restante in funzione del tempo; la curva della parte iniziale (degradazione 10-50 %) del grafico è equivalente a K_1, la costante di (pseudo) primo ordine. Correggere la costante in funzione della concentrazione dei solidi nei fanghi, dividendo la curva per la concentrazione di tali solidi. Il risultato deve precisare anche le concentrazioni iniziali della sostanza in esame e dei solidi in sospensione, il tempo di ritenzione dei fanghi, il carico e la fonte dei fanghi e indicare, se del caso, un'eventuale pre-esposizione alla sostanza in esame.

Variabilità dei risultati

8. La variabilità e altri aspetti della cinetica di biodegradazione sono stati discussi nel corso di una recente riunione del SETAC (7). Gli studi discussi, sia quelli già pubblicati sia quelli in fase progettuale, dovrebbero presto consentirci di avere un'immagine più chiara della cinetica alla base del trattamento delle acque reflue negli impianti e permetterci quindi una migliore interpretazione dei dati esistenti e di impostare in futuro delle linee guida più pertinenti per i metodi di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilm

INTRODUZIONE

1. Generalmente le prove di simulazione vengono svolte sulle sostanze che non superano la prova di screening per la pronta biodegradabilità [capitolo C.4, lettere da A a F, del presente allegato (9)] ma superano invece quella per la biodegradabilità intrinseca. In casi eccezionali, le prove di simulazione vengono applicate anche a sostanze chimiche sulle quali è necessario ottenere maggiori informazioni, specialmente le sostanze prodotte in grandi quantità; normalmente, viene applicata la prova a fanghi attivi (C.10-A). In alcuni casi, tuttavia, sono necessarie informazioni specifiche relative al comportamento di una determinata sostanza quando viene sottoposta a metodi di trattamento delle acque reflue che comportano il ricorso a biofilm, in particolare attraverso l'uso di filtri percolatori, biodischi (*rotating biological contactors*) o letti fluidi; per venire incontro a tale necessità, sono state sviluppate diverse soluzioni.

2. Gerike *et al.* (1) hanno sviluppato delle unità pilota costituite da filtri percolatori di grandi dimensioni, facendole funzionare in modalità abbinata. I filtri occupavano però troppo spazio e richiedevano quantità relativamente elevate di liquami o liquami artificiali. Truesdale *et al.* (2) hanno utilizzato filtri percolatori più piccoli (1,83 m × 0,15 m di diametro) alimentati con liquami naturali privi di tensioattivi, ma che richiedevano comunque quantità significative di liquami. Erano necessarie fino a 14 settimane per sviluppare un biofilm «maturo» e bisognava attendere altre 4-8 settimane, dopo la prima introduzione del tensioattivo in esame, perché avvenisse l'acclimatazione.

3. Baumann *et al.* (3) sono ricorsi a un filtro molto più piccolo che usava «fibra pile» di poliestere precedentemente immersa in fanghi attivi come mezzo inerte di supporto per il biofilm. La sostanza in esame costituiva l'unica fonte di carbonio e la biodegradabilità veniva valutata a partire dalle misure del DOC nell'affluente e nell'effluente e dalla quantità di CO_2 nel gas emesso.

4. Gloyna *et al.* (4) hanno adottato un approccio completamente diverso e a loro si deve l'invenzione del reattore tubolare rotante. Sulla superficie interna del tubo rotante (sull'area della superficie conosciuta) è stato coltivato un biofilm introducendo gli affluenti dall'estremità superiore del tubo (leggermente inclinato rispetto all'asse orizzontale). Il reattore è stato utilizzato per studiare la biodegradabilità dei tensioattivi (5), lo spessore ottimale del biofilm e la diffusione attraverso il film (6). Gloyna *et al.* hanno poi perfezionato e modificato il reattore in modo da poter determinare il CO_2 nel gas emesso.

5. Il reattore tubolare rotante è stato adottato dallo Standing Committee of Analysts del Regno Unito come metodo standard per valutare la biodegradabilità delle sostanze chimiche (7) nonché la trattabilità e tossicità delle acque reflue (8). Il metodo qui descritto presenta il vantaggio di essere semplice, compatto e riproducibile e di richiedere quantità relativamente contenute di mezzo organico.

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Si applicano sulla superficie interna del tubo inclinato, facendolo ruotare lentamente, i liquami (artificiali o domestici) e la sostanza in esame, introdotta separatamente o miscelata. Sulla superficie interna si sviluppa uno strato di microrganismi, simili a quelli presenti sui biofiltri. Il funzionamento del reattore è calibrato in modo da ottenere un'eliminazione adeguata della materia organica e, se necessario, l'ossidazione dell'ammonio.

▼M4

7. Si raccolgono gli effluenti dal tubo e li si fa decantare e/o filtrare prima di analizzarli per verificare la presenza del DOC e/o della sostanza chimica in esame, scegliendo un metodo specifico. Si fanno funzionare in parallelo le unità di controllo che non ricevono la sostanza in esame, a fini di comparazione. Quando si effettuano le misurazioni del DOC negli effluenti, si presume che la differenza fra le concentrazioni medie delle due unità (di prova e di controllo) sia dovuta alla sostanza in esame o ai suoi metaboliti organici. Tale differenza è confrontata con la concentrazione della sostanza chimica in esame (in termini di DOC) negli affluenti, al fine di determinarne l'eliminazione.

8. È generalmente possibile distinguere tra biodegradazione e bioassorbimento osservando con attenzione la curva eliminazione-tempo; normalmente, la biodegradazione può essere confermata da una prova di pronta biodegradazione (consumo di ossigeno e produzione di diossido di carbonio) utilizzando un inoculo acclimatato estratto alla fine della prova dai reattori che hanno ricevuto la sostanza in esame.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

9. È necessario disporre delle caratteristiche di purezza, idrosolubilità, volatilità e adsorbimento della sostanza in esame, in modo da permettere la corretta interpretazione dei risultati.

10. Le sostanze chimiche volatili e scarsamente solubili non possono normalmente essere testate se non dopo aver preso particolari precauzioni (cfr. capitolo C.10-A, appendice 5). È necessario conoscerne la struttura chimica o la formula bruta per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD (domanda teorica di ossigeno) e DOC.

11. Le informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (cfr. capitolo C.10-A, appendice 4) possono essere utili per una scelta mirata delle concentrazioni da sottoporre a prova e per interpretare correttamente valori di biodegradazione bassi.

SOGLIE MINIME

12. Originariamente, l'immissione sul mercato dei tensioattivi era subordinata al raggiungimento di un tasso minimo di biodegradazione primaria pari almeno all'80 %. Se il tasso dell'80 % non viene raggiunto, si può applicare la presente prova di simulazione (di conferma) e il tensioattivo è immesso sul mercato solo se viene eliminato più del 90 % della sostanza chimica specifica. In generale, per le sostanze chimiche, il problema di ottenere un risultato positivo o negativo (*pass/fail*) non si pone e la percentuale di eliminazione ottenuta può servire per un calcolo approssimativo della probabile concentrazione nell'ambiente, da utilizzare nella valutazione dei rischi dovuti alle sostanze chimiche. La percentuale di eliminazione del DOC ottenuta in diversi studi su sostanze chimiche pure era superiore al 90 % in oltre tre quarti dei prodotti chimici che presentavano un grado di biodegradabilità significativo ed era superiore all'80 % nel novanta per cento degli stessi.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

13. Per assicurare il corretto svolgimento della procedura sperimentale è utile, a volte, testare in parallelo delle sostanze chimiche il cui comportamento è conosciuto. Si può, ad esempio, ricorrere ad acido adipico, 2-fenilfenolo, 1-naftolo, acido difenico e 1-acido naftoico.

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

14. Un laboratorio situato nel Regno Unito ha calcolato una deviazione standard relativa del 3,5 % all'interno delle prove e del 5 % tra le prove (7).

▼M4

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Reattori tubolari rotanti

15. L'apparecchiatura (cfr. appendice 8, figure 1 e 2) consiste in una serie di tubi acrilici, lunghi 30,5 cm con diametro interno di 5 cm, applicati su ruote con corone in gomma all'interno di una struttura di supporto in metallo. I tubi, la cui superficie interna viene resa ruvida con lana abrasiva, hanno un bordo esterno alto circa 0,5 cm che ne permette il fissaggio sulle ruote; all'estremità superiore (estremità di carico) si trova un bordo interno di 0,5 cm, per la ritenzione dei liquidi. Occorre inclinare i tubi a un angolo di circa un grado rispetto al piano orizzontale, per consentire che il mezzo di prova applicato ai tubi puliti resti in contatto con la loro superficie per il tempo richiesto. Fare girare lentamente le ruote gommate attraverso un motore a velocità variabile. Controllare la temperatura dei tubi collocandoli in una camera a temperatura costante.

16. Porre ciascun reattore tubolare in un tubo leggermente più grande e chiuso da un tappo, assicurandosi che le giunzioni siano a tenuta stagna, in modo da raccogliere in una soluzione alcalina il CO_2 del gas emesso, per poi misurarlo (6).

17. Alimentare ogni tubo con mezzo organico contenente, se del caso, la sostanza in esame; prevedere per ciascun tubo un recipiente della capacità di 20 l per lo stoccaggio di sufficiente mezzo organico per 24 ore (A) (cfr. figura 2). Se richiesto, la sostanza chimica in esame può essere dosata separatamente. Sul fondo di ciascun recipiente di stoccaggio c'è un foro d'uscita collegato attraverso un tubicino idoneo, ad esempio in gomma siliconata, via una pompa peristaltica (B) a un tubicino di alimentazione acrilico o in vetro che entra per 2-4 cm nell'estremità superiore (di carico) del tubo inclinato (C). L'effluente sgocciola quindi dalla parte inferiore del tubo inclinato verso un altro recipiente di stoccaggio (D). Far decantare l'effluente, o filtrarlo, prima di analizzarlo.

Apparecchio di filtrazione — centrifuga

18. I campioni vengono filtrati attraverso filtri a membrana di porosità idonea (diametro d'apertura nominale di 0,45 μm) che adsorbono le sostanze chimiche organiche solubili o rilasciano la minima quantità possibile di carbonio organico. Se i filtri utilizzati rilasciano carbonio organico, occorre lavarli accuratamente con acqua calda per rimuovere il carbonio organico lisciviato. In alternativa si può usare una centrifuga in grado di girare a 40 000 m/s^2.

19. Apparecchiatura di analisi che permette di determinare:

— DOC/carbonio organico totale (TOC) o domanda chimica di ossigeno (COD),

— sostanze chimiche specifiche (HPLC, GC ecc.) se richiesto,

— pH, temperatura, acidità, alcalinità,

— ammonio, nitrito e nitrato, se la prova è svolta in condizioni nitrificanti.

Acqua

20. Acqua di rubinetto, contenente meno di 3 mg/l di DOC.

21. Acqua distillata o deionizzata, contenente meno di 2 mg/l di DOC.

▼M4

Mezzo organico

22. Sono accettati quali mezzo organico i liquami artificiali, quelli domestici o una miscela di entrambi. È stato dimostrato che l'uso di soli liquami domestici genera spesso un maggior tasso di eliminazione del DOC (nelle unità a fanghi attivi) e consente addirittura la biodegradazione di alcune sostanze chimiche che non sono invece biodegradate se si usano liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE. Si raccomanda quindi l'uso di liquami domestici. Occorre misurare la concentrazione di DOC (o COD) in ciascun nuovo lotto di mezzo organico e occorre conoscerne l'acidità o l'alcalinità. Se il mezzo organico presenta una bassa acidità o alcalinità potrebbe essere necessario aggiungere un tampone idoneo (idrogenocarbonato di sodio o idrogenofosfato di potassio) per mantenere un pH di circa 7,5 ± 0,5 nel reattore nel corso della prova. La quantità del tampone da aggiungere, e quando aggiungerla, vanno decise caso per caso.

Liquami artificiali

23. Sciogliere per ogni litro di acqua di rubinetto i seguenti composti: 160 mg di peptone; 110 mg di estratto di carne; 30 mg di urea; 28 mg di idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4); 7 mg di cloruro di sodio (NaCl); 4 mg di cloruro di calcio diidrato ($C_aCl_2.2H_2O$); 2 mg di solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4.7H_20$). Questi liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE costituiscono un esempio dove la concentrazione media di DOC negli affluenti è di circa 100 mg/l. In alternativa, utilizzare altre composizioni con la stessa concentrazione di DOC, più prossime ai liquami reali. I liquami artificiali, a base di acqua distillata, possono essere preparati in forma concentrata e conservati a circa 1 °C per una settimana al massimo. Se occorre, diluire con acqua di rubinetto (si tratta, peraltro, di un mezzo organico insoddisfacente in particolare perché la concentrazione di azoto è molto elevata e il tenore di carbonio è relativamente basso, ma non è stata suggerita un'alternativa migliore, se non attraverso l'aggiunta di un tampone fosfato e di peptone).

Liquami domestici

24. Utilizzare liquami freschi decantati raccolti giornalmente in un impianto di trattamento delle acque reflue che riceve principalmente liquami domestici. Occorre prelevare i liquami dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria oppure dall'alimentazione dell'impianto a fanghi attivi; i liquami devono essere il più possibile privi delle particelle più grosse. I liquami possono essere utilizzati dopo averli stoccati anche per diversi giorni a 4 °C, se è provato che il DOC (o la COD) non sono diminuiti in modo significativo (vale a dire di più del 20 %) in fase di stoccaggio. Al fine di limitare eventuali perturbazioni al sistema, occorre correggere il DOC (o la COD) di ogni nuovo lotto a un valore adeguato costante prima dell'uso, ad esempio diluendolo con acqua.

Lubrificante

25. Per lubrificare i rulli della pompa peristaltica, utilizzare glicerolo od olio d'oliva: entrambi sono adatti per i tubi in gomma siliconata.

Soluzioni madre della sostanza in esame

26. Per le sostanze che presentano una solubilità adeguata, preparare delle soluzioni madre a concentrazioni idonee (es.: da 1 a 5 g/l) in acqua deionizzata o nella frazione minerale dei liquami artificiali. Per le sostanze insolubili, cfr. capitolo C.10-A, appendice 5; non applicare il metodo alle sostanze chimiche volatili senza prima modificare i reattori tubolari (paragrafo 16). Determinare il DOC e il TOC della soluzione madre e ripetere le misure per ciascun nuovo lotto. Se la differenza tra il DOC e il TOC supera il 20 %, verificare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame. Confrontare il DOC o la concentrazione della sostanza in esame misurata attraverso

▼M4

un'analisi specifica della soluzione madre a valore nominale, per assicurarsi che il tasso di recupero sia sufficiente (solitamente deve superare il 90 %). Verificare, in particolare per le dispersioni, se il DOC può essere utilizzato come parametro analitico, o se invece si possa applicare solo una tecnica d'analisi specifica per la sostanza in esame. Le dispersioni impongono il ricorso alla centrifuga dei campioni. Per ciascun nuovo lotto, misurare DOC, COD o la sostanza in esame attraverso un'analisi specifica.

27. Determinare il pH della soluzione madre. I valori estremi indicano che l'aggiunta della sostanza chimica può influenzare il pH dei fanghi attivi nel sistema di prova. In tal caso, neutralizzare la soluzione madre per ottenere un pH di 7 ± 0,5 ricorrendo a piccole quantità di acido o di base inorganica, evitando però la precipitazione della sostanza in esame.

PROCEDURA

Preparazione del mezzo organico da dosare

28. Pulire accuratamente, all'inizio e durante la prova, tutti i recipienti destinati ad affluenti ed effluenti e i tubi che li collegano, per eliminare la proliferazione microbica.

29. Preparare giornalmente liquami artificiali freschi (paragrafo 23) a partire dai solidi o dalla soluzione madre concentrata, diluendo con acqua di rubinetto. Misurare la quantità richiesta in un cilindro e aggiungerla in un recipiente per gli affluenti, pulito. Inoltre, se necessario, aggiungere la quantità richiesta della soluzione madre della sostanza in esame o della sostanza di riferimento ai liquami artificiali prima della diluzione. Per praticità o per evitare eventuali perdite della sostanza, prepararne a parte una soluzione diluita, in un recipiente separato, e caricarla nei tubi inclinati attraverso una diversa pompa dosatrice.

30. In alternativa (e preferibilmente), usare liquami domestici decantati freschi (paragrafo 24), se possibile raccolti giornalmente.

Funzionamento dei reattori tubolari rotanti

31. Per valutare una singola sostanza chimica sono necessari due identici reattori tubolari, installati in un ambiente a temperatura costante, normalmente a 22 ± 2 °C.

32. Regolare la pompa peristaltica in modo da caricare 250 ± 25 ml/h del mezzo organico (senza sostanza chimica) nei tubi inclinati, che dovranno ruotare a 18 ± 2 rpm. Applicare il lubrificante (paragrafo 25) ai tubicini della pompa, all'inizio e a intervalli regolari durante la prova, per assicurare un funzionamento corretto e prolungare la durata dei tubicini.

33. Regolare l'angolo di inclinazione dei tubi rispetto al piano orizzontale, in modo da produrre un tempo di residenza di 125 ± 12,5 sec per il carico nel tubo pulito. Fare una stima del tempo di ritenzione aggiungendo al liquido erogato un marcatore non biologico (es.: NaCl, colorante inerte): il tempo necessario a raggiungere la massima concentrazione negli effluenti viene considerato tempo medio di ritenzione (nel momento di massimo sviluppo del film, il tempo di ritenzione può aumentare fino a 30 minuti circa).

34. È stato confermato che i tassi, le velocità e i tempi indicati producono percentuali di eliminazione adeguate (> 80 %) del DOC (o COD) ed effluenti nitrificati. La portata del flusso va modificata se l'eliminazione è insufficiente o se va simulato il funzionamento di un particolare impianto di depurazione. In quest'ultimo caso, occorre continuare a regolare il dosaggio del mezzo organico fino a ottenere una prestazione del reattore identica a quella dell'impianto di depurazione.

▼M4

Inoculazione

35. In caso si faccia uso di liquami artificiali, l'inoculazione per via aerea può essere sufficiente ad avviare la proliferazione dei microrganismi; altrimenti aggiungere al liquido erogato 1 ml/l di liquami decantati, per 3 giorni.

Misurazioni

36. Verificare, ad intervalli regolari, che i dosaggi e le velocità di rotazione rientrino nei limiti richiesti. Inoltre, misurare il pH degli effluenti, specialmente se si prevede che si verifichi nitrificazione.

Campionamento e analisi

37. Il metodo, la modalità e la frequenza del campionamento vengono scelti in funzione dello scopo prefisso della prova. Ad esempio, è possibile prelevare campioni di affluenti o effluenti con un campionamento istantaneo oppure su un periodo più lungo (es.: 3-6 ore). Nel corso del primo periodo, e quindi senza sostanza chimica in esame, prelevare dei campioni due volte la settimana. Filtrare i campioni tramite membrane o centrifugarli a circa 40 000 m/sec^2 per più o meno 15 minuti (paragrafo 18). Potrebbe essere necessario far decantare e/o passare i campioni da un filtro grossolano prima di filtrarli tramite membrane. Determinare il DOC o la COD almeno due volte e, se richiesto, il BOD, l'ammonio e i nitriti/nitrati.

38. Dopo la raccolta e la preparazione dei campioni, occorre svolgere le analisi il più rapidamente possibile. In caso fosse necessario rimandare le analisi, conservare i campioni a circa 4 °C al buio, in bottiglie piene ed ermeticamente chiuse. Se è necessario stoccare i campioni per più di 48 h, la conservazione può avvenire tramite congelazione, acidificazione o aggiunta di una sostanza tossica idonea [es. 20 ml/l di una soluzione di cloruro di mercurio (II) a 10 g/l]. Assicurarsi che la tecnica di conservazione non incida sui risultati dell'analisi.

Periodo di attivazione

39. Si tratta del periodo nel quale il biofilm cresce fino ad ottenere lo spessore ottimale: generalmente due settimane e comunque non più di sei. L'eliminazione (paragrafo 44) del DOC (o della COD) aumenta e raggiunge un valore di plateau: una volta raggiunto un valore di plateau simile in entrambi i tubi, sceglierne uno che diventerà l'unità di controllo per il resto della prova, durante la quale le loro prestazioni devono rimanere coerenti.

Addizione della sostanza chimica in esame

40. A questo punto, aggiungere all'altro tubo reattore la sostanza chimica in esame nella concentrazione richiesta, di solito 10-20 mg C/l, mentre nel reattore di controllo viene aggiunto solo il mezzo organico.

Periodo di acclimatazione

41. Continuare a svolgere analisi con cadenza bisettimanale per il DOC (o la COD) e, se è necessario valutare la biodegradabilità, misurare anche la concentrazione della sostanza in esame attraverso analisi specifiche. Lasciare acclimatare per un periodo da una a sei settimane (o più a lungo se sussistono condizioni particolari) dopo la prima addizione della sostanza in esame. Quando la percentuale di eliminazione (paragrafi 43-45) raggiunge il valore massimo, ottenere 12-15 valori validi nella fase di plateau nel corso di 3 settimane per calcolare la percentuale media di eliminazione. La prova è considerata conclusa se si è raggiunta una percentuale di eliminazione sufficientemente alta. La prova non deve generalmente estendersi al di là delle 12 settimane a partire dalla prima addizione della sostanza in esame.

▼M4

Distacco del biofilm

42. Dalle pareti dei tubi si distaccano, ad intervalli piuttosto regolari, delle grandi quantità di biofilm. Per assicurare che ciò non incida sulla confrontabilità dei risultati, fare in modo che le prove coprano un periodo equivalente ad almeno due cicli completi di crescita e distacco.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

43. Per ogni valutazione programmata, calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC (o di COD) ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

dove:

D_t = percentuale di eliminazione del DOC o della COD al tempo t;

C_s = concentrazione del DOC (o della COD) negli affluenti dovuta alla sostanza chimica in esame, preferibilmente stimata a partire dalla concentrazione della soluzione madre immessa (mg/l) e dal suo volume;

E = valore del DOC (o della COD) misurato negli effluenti di prova al tempo t (mg/l);

E_o = valore del DOC (o della COD) misurato negli effluenti di controllo al tempo t (mg/l).

Ripetere il calcolo per la sostanza chimica di riferimento, se sottoposta a prova.

Prestazioni del reattore di controllo

44. Il grado di eliminazione del DOC o della COD (D_B) dal mezzo organico dell'unità di controllo è utile per valutare l'attività di biodegradazione del biofilm nel corso della prova. Calcolare la percentuale di eliminazione ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

dove:

C_m = DOC (o COD) del mezzo organico negli affluenti di controllo (mg/l).

45. Calcolare l'eliminazione (D_{ST}) della sostanza in esame, se misurata, ricorrendo a un metodo di analisi specifico ad ogni misurazione, con la seguente equazione:

$$DST = 100(1 - Se/Si\ \%$$

dove:

Si = concentrazione misurata o, preferibilmente, stimata della sostanza chimica in esame negli affluenti di prova (mg/l)

Se = concentrazione misurata della sostanza chimica in esame negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

▼M4

Se il metodo di analisi produce un valore positivo nei liquami non arricchiti equivalente a Sc mg/l, calcolare la percentuale di eliminazione (D_{SC}) ricorrendo alla seguente equazione:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Espressione dei risultati della prova

46. Tracciare su un grafico le curve dell'eliminazione D_t e D_{ST} (o D_{SC}), se del caso, in funzione del tempo (cfr. capitolo C.10-A, appendice 2). Utilizzare la media (arrotondata all'unità più vicina) e la deviazione standard dei 12-15 valori ottenuti per D_T (e per D_{ST}, se disponibile) durante la fase di plateau, come percentuale di eliminazione della sostanza in esame. A partire dall'andamento della curva di eliminazione si possono trarre alcune conclusioni sui processi di eliminazione.

Adsorbimento

47. Se già dall'inizio della prova si osserva una forte eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC, la sostanza è stata probabilmente eliminata tramite adsorbimento sul biofilm. Dovrebbe essere possibile confermare tale ipotesi determinando la quantità della sostanza in esame adsorbita sui solidi distaccati dal film. È raro che l'eliminazione del DOC delle sostanze adsorbibili si mantenga elevata nel corso di tutta la prova; normalmente, il grado di eliminazione è elevato all'inizio per poi declinare progressivamente fino a raggiungere un valore di equilibrio. Tuttavia, se la sostanza chimica adsorbibile in esame fosse tale da causare, in un modo o nell'altro, un'acclimatazione della popolazione microbica, l'eliminazione del DOC della sostanza chimica aumenterebbe fino a raggiungere un elevato valore di plateau.

Fase di latenza

48. Molte delle sostanze chimiche in esame, analogamente a quanto avviene nelle prove di screening statiche, attraversano una fase di latenza prima che avvenga una biodegradazione a pieno regime. Nel corso della fase di latenza, l'acclimatazione o l'adattamento dei batteri degradanti avviene senza che si produca, o quasi, l'eliminazione della sostanza in esame; in seguito i batteri cominciano a proliferare. Al termine di questa fase, quando circa il 10 per cento della quantità iniziale della sostanza in esame viene eliminata (compreso anche per adsorbimento, se del caso) si suppone, arbitrariamente, che inizi la fase di degradazione. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Fase di plateau

49. La fase di plateau di una curva di eliminazione in un test in continuo è definita come la fase nella quale si raggiunge il massimo livello di degradazione. La fase dovrebbe protrarsi per almeno 3 settimane ed essere determinata attraverso la misurazione di 12-15 valori validi.

Grado medio di eliminazione della sostanza chimica in esame

50. Calcolare il valore medio a partire dai valori di eliminazione D_t (e D_{st}, se disponibile) della sostanza in esame durante la fase di plateau. Arrotondata all'unità più vicina (1 %), tale media rappresenta il grado di eliminazione della sostanza in esame. Si raccomanda inoltre di calcolare l'intervallo di confidenza (95 %) del valore medio. Utilizzare lo stesso metodo per calcolare il valore medio (D_B) di eliminazione del mezzo organico nel recipiente di controllo.

▼M4

Indicazione della biodegradazione

51. Se la sostanza in esame non viene adsorbita in modo significativo sul biofilm e se la curva di eliminazione presenta il profilo tipico di una curva di biodegradazione con fasi di latenza, di degradazione e di plateau (cfr. paragrafi 48 e 49), l'eliminazione misurata può essere attribuita con certezza alla biodegradazione. Se il livello di eliminazione è alto in fase iniziale, la prova di simulazione non consente di distinguere tra i processi di eliminazione biologici e abiotici. In questi casi, come nei casi in cui la biodegradazione suscita dubbi (ad esempio, quando si osserva un fenomeno di stripping), occorre analizzare le sostanze in esame adsorbite su campioni del biofilm oppure effettuare prove di biodegradazione statiche supplementari basate su parametri che indicano chiaramente i processi biologici. Si tratta di prove che si basano sul consumo di ossigeno (capitolo C.4 del presente allegato, lettere D, E e F) o sulla produzione di CO_2 (capitolo C.4-C, del presente allegato, ovvero prova del CO_2 nello spazio di testa) (10); occorre usare come inoculo del biofilm pre-esposto proveniente dal reattore idoneo.

52. Se sono state misurate sia l'eliminazione del DOC sia l'eliminazione della sostanza chimica specifica, la presenza di differenze significative (essendo la prima inferiore alla seconda) tra le percentuali indica che gli effluenti contengono dei prodotti organici intermedi probabilmente più difficili da degradare rispetto al composto progenitore, che vanno sottoposti ad analisi.

Validità dei risultati della prova

53. Il test è da considerare valido se il grado di eliminazione del DOC (o della COD), D_B, nelle unità di controllo è superiore all'80 % dopo due settimane e se non si osserva alcun fenomeno insolito.

54. Se è stata testata una sostanza (di riferimento) prontamente biodegradabile, il grado di biodegradazione deve essere superiore al 90 % e la differenza tra i valori determinati nelle repliche non deve eccedere il 5 %. Se i due criteri non vengono soddisfatti, è necessario rivedere le procedure sperimentali e/o prelevare i liquami domestici da un'altra fonte.

55. Analogamente, i valori di biodegradazione ottenuti nelle unità replica dove è stata trattata la sostanza in esame (se ne sono state utilizzate), non devono presentare differenze superiori al 5 %. Se questo criterio non viene rispettato ma i tassi di eliminazione sono alti, occorre continuare le analisi per altre tre settimane. Se il tasso di eliminazione è basso, si devono studiare gli effetti inibitori della sostanza chimica, se non sono già conosciuti, e ripetere la prova con una concentrazione più bassa della sostanza, se possibile.

Relazione

56. La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— dati identificativi,

— natura fisica e, se del caso, proprietà chimico-fisiche.

Condizioni sperimentali:

— qualsiasi modifica al sistema di prova, specialmente se vengono utilizzate sostanze insolubili o volatili,

— tipo di mezzo organico,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nei liquami, se l'informazione è pertinente e conosciuta,

— modalità di inoculazione,

▼M4

— soluzione madre della sostanza in esame: tenore in DOC (carbonio organico disciolto) e TOC (carbonio organico totale); modalità di preparazione, se si tratta di una sospensione; concentrazione o concentrazioni usate per la prova; giustificare, eventualmente, i valori che si discostano dall'intervallo 10-20 mg/l di DOC; modalità di addizione; data della prima addizione; eventuali cambiamenti nella concentrazione,

— tempo medio di ritenzione idraulica (senza crescita); velocità di rotazione del tubo; angolo di inclinazione approssimativo, se possibile,

— dettagli sul distacco del biofilm; tempo e intensità,

— temperatura della prova e gamma di temperature,

— tecniche di analisi utilizzate.

Risultati della prova:

— tutti i dati derivanti dalle misurazioni: DOC, COD, analisi specifiche, pH, temperatura, sostanze azotate, se rilevante,

— tutti i valori calcolati per D_t (o D_{tc}) D_B e D_S, presentati sotto forma di tabella e di curve di eliminazione,

— informazioni sulle fasi di latenza e di plateau, la durata della prova, il grado di eliminazione della sostanza in esame, della sostanza di riferimento (se testata) e del mezzo organico (nell'unità di controllo), insieme ad informazioni statistiche e conclusioni sulla biodegradabilità e sulla validità della prova,

— discussione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità, lettere da A a F.

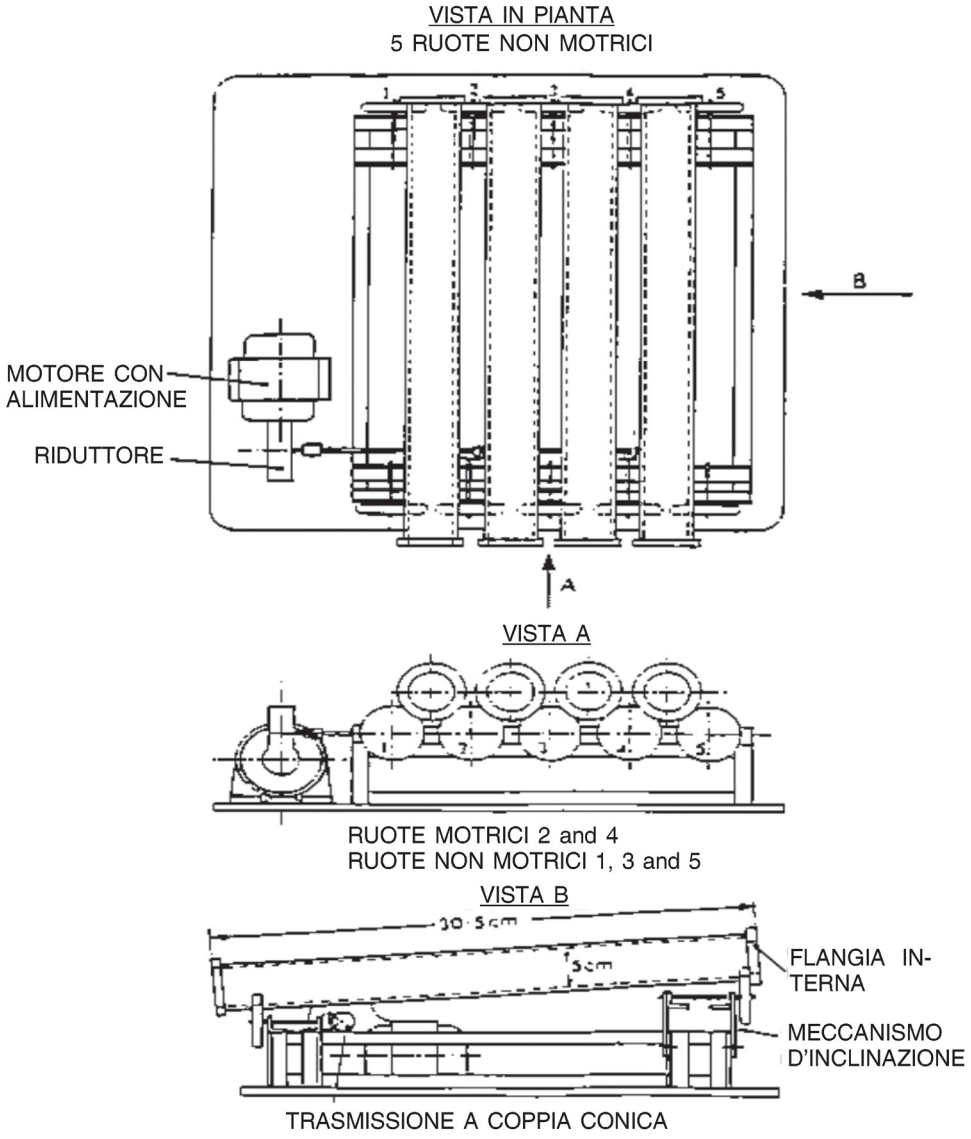
(10) ISO 14593 (1998) Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼M4

Appendice 8

Figura 1

Tubi rotanti



Legenda:

Vista in pianta

Vista A/B

Ruote motrici

Ruote non motrici

Motore con alimentazione

Riduttore

Flangia interna

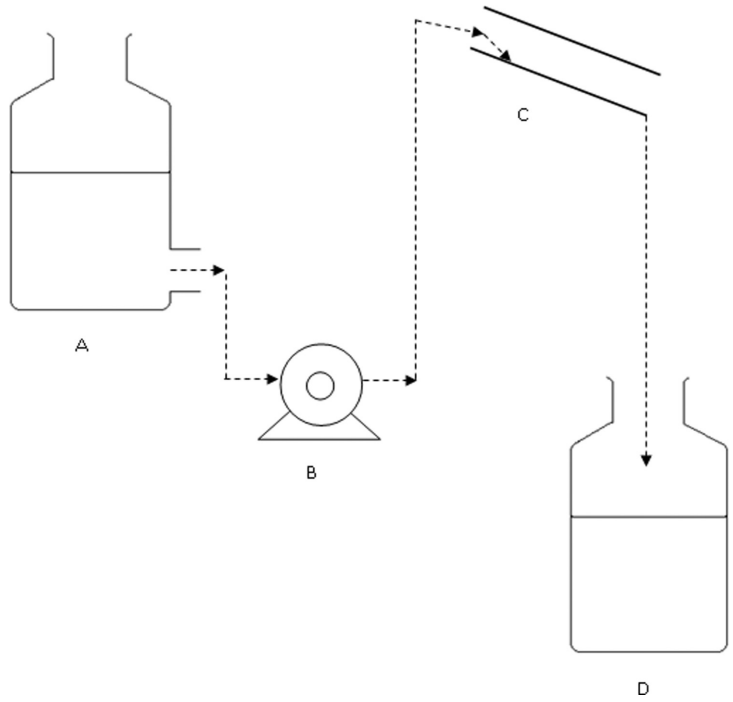
Meccanismo d'inclinazione

Trasmissione a coppia conica

▼**M4**

Figura 2

Schema di flusso



A: Recipiente di alimentazione

B: Pompa peristaltica

C: Tubo rotante

D: Recipiente di raccolta degli effluenti

DEFINIZIONI

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

Sostanza chimica (in inglese chemical): occorre notare che il termine «*chemical*» viene ampiamente utilizzato negli accordi UNCED e nei documenti posteriori e include sostanze, prodotti, miscele, preparazioni o qualsiasi altro termine utilizzato nei sistemi esistenti per descrivere i prodotti chimici in questione.

▼B

C.11. **BIODEGRADAZIONE**

FANGHI ATTIVI: SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA RESPIRAZIONE

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Con il metodo qui descritto si valuta l'effetto della sostanza in esame sui microorganismi misurando la velocità di respirazione in determinate condizioni alla presenza di diverse concentrazioni della sostanza stessa.

Il metodo ha lo scopo di fornire un procedimento rapido di «screening» per l'identificazione delle sostanze che possono avere effetti nocivi sugli impianti di trattamento batterico aerobio e per indicare le concentrazioni della sostanza in esame, che non provocano effetti inibitori, da usare nei saggi di biodegradabilità.

Si può fare precedere la prova definitiva da una prova orientativa che consenta di avere delle informazioni sull'intervallo di concentrazioni da usare nel saggio.

Nel programma del saggio vengono inclusi due controlli senza la sostanza da esaminare, da utilizzare uno all'inizio e l'altro alla fine della serie di saggi. Ciascun gruppo di fanghi attivi dovrebbe essere anche controllato con una sostanza di riferimento.

Il presente metodo si applica più facilmente a quelle sostanze che grazie alla loro idrosolubilità ed alla loro bassa volatilità, permangano prevalentemente in acqua.

Per le sostanze che hanno invece una limitata solubilità nei mezzi di trattamento, può non essere possibile determinare la EC_{50}.

Quando la sostanza in esame ha tendenza a disaccoppiare la fosforilazione ossidativa, i risultati basati sull'assunzione di ossigeno possono condurre ad errate conclusioni.

Per eseguire il saggio è utile disporre delle seguenti informazioni:

— idrosolubilità,

— tensione di vapore,

— formula di struttura,

— grado di purezza della sostanza in esame.

Raccomandazione

I fanghi attivi possono contenere organismi potenzialmente patogeni e dovrebbero perciò essere maneggiati con cautela.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

La velocità di respirazione è il consumo di ossigeno da parte di microrganismi del fango aerobio di acque reflue ed è espresso generalmente in mg di O_2 per mg di fango per ora.

▼B

Per calcolare l'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione, la velocità di respirazione si esprime come percentuale della media delle velocità di respirazione dei due controlli:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{percentuale di inhibizione}$$

dove:

R_s = velocità di consumo di ossigeno alla concentrazione saggiata della sostanza in esame

R_{c1} = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 1,

Rc_2 = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 2.

Ec_{50} è, in questo metodo, la concentrazione della sostanza in esame alla quale la velocità di respirazione risulta pari al 50 % di quella rilevata nel controllo nelle condizioni qui descritte.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per controllare che la sensibilità del fango sia normale si raccomanda di usare come sostanza di riferimento il 3,5-diclorofenolo, noto come inibitore della respirazione, e di sottoporlo a determinazione della EC_{50} in ciascun gruppo di fanghi attivi.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

La velocità di respirazione di un fango attivo, alimentato con una quantità standard di liquame sintetico, è misurato dopo un tempo di contatto di 30 minuti o/e di 3 ore. Si misura anche la velocità di respirazione dello stesso fango attivo in presenza di diverse concentrazioni della sostanza in esame in condizioni per il resto identiche. L'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione è espresso come percentuale delle velocità medie di respirazione dei due controlli. Dalle determinazioni a diverse concentrazioni si calcola un valore della Ec_{50}.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

I risultati del saggio sono validi se:

— le velocità di respirazione dei controlli differiscono entro il 15 %,

— la EC_{50} (30 minuti e/o 3 ore) del 3,5-diclorofenolo cade nell'intervallo accettato compreso fra 5 e 30 mg/l.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Reagenti*

1.6.1.1. Soluzioni della sostanza in esame

Le soluzioni della sostanza in esame vengono preparate all'inizio dello studio impiegando una soluzione madre. Se si segue il procedimento di cui sotto, è opportuno che la concentrazione della soluzione madre sia di 0,5 g/l.

▼B

1.6.1.2. Soluzione della sostanza di riferimento

Si può preparare ad esempio una soluzione di 5,5-diclorofenolo sciogliendo 0,5 g di 3,5 diclorofenolo in 10 ml di NaOH lM, diluendo quindi con acqua distillata sino a circa 30 ml, addizionando (mentre si agita) $H_2SO_4$0,5M sino al punto di precipitazione incipiente — occorreranno circa 8 ml di $H_2SO_4$0,5M — e diluendo infine la miscela con acqua distillata sino al volume di 1 litro. Il pH dovrebbe allora avere un valore compreso fra 7 e 8.

1.6.1.3. Liquame sintetico

Una alimentazione di liquame sintetico si ottiene sciogliendo in un litro di acqua le seguenti sostanze nelle quantità precisate:

— 16 g di peptone,

— 11 g di estratto di carne,

— 3 g di urea,

— 0,7 g di NaCl,

— 0,4 g di $CaCl_2$ $2H_2O$,

— 0,2 g di $MgSO_4$ $7H_2O$,

— 2,8 g di K_2HPO_4.

Nota 1: Questo liquame sintetico è 100 volte più concentrato di quello descritto in OECD Technical Report, «Metodo proposto per la determinazione della biodegradabilità dei tensioattivi impiegati nei detersivi sintetici» (11 giugno 1976), con l'aggiunta di fosfato acido di potassio.

Nota 2: La soluzione preparata, se non viene utilizzata subito, dovrà essere conservata ai buio a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C per non oltre una settimana, in condizioni tali da non subire alterazioni nella composizione. Inoltre, prima della conservazione la soluzione potrà essere sterilizzata oppure si potranno aggiungere il peptone e l'estratto di carne solo poco prima di effettuare l'analisi. Prima dell'uso la soluzione dovrà essere agitata ed il suo pH dovrà essere corretto.

1.6.2. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura di misurazione: non è importante che l'apparecchio abbia una forma precisa. Comunque, la bottiglia di misurazione dovrebbe essere completamente piena e la sonda dovrebbe aderire ermeticamente al collo.

È necessaria la normale dotazione di laboratorio ed in particolare:

— apparecchio di misurazione,

— sistema di aerazione,

— elettrodo per pH e relativa apparecchiatura di misurazione,

— elettrodo ad ossigeno.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Come inoculo batterico per il saggio si impiega fango attivo proveniente da un impianto di trattamento di liquami prevalentemente domestici.

Se necessario, al ritorno in laboratorio, si possono rimuovere le particelle grossolane mediante sedimentazione per un breve periodo ad esempio per 15 minuti, e, quindi, decantare, per l'uso, lo strato superficiale contenente le particelle solide più piccole, In alternativa il fango può essere miscelato per pochi secondi con un agitatore.

▼B

Inoltre, ove si presume la presenza di materiali inibenti, il fango dovrebbe essere lavato con acqua di rubinetto o con soluzione isotonica. Dopo centrifugazione si decanta il surnatante (questo procedimento si ripete per tre volte).

Una piccola quantità di fango umido viene pesata, essiccata e ripesata. In questo modo si può calcolare la quantità di fango umido da sospendere in acqua per ottenere un fango attivo con una quantità di solidi sospesi nel liquido chiarificato compresa tra 2 e 4 g/l. Questa quantità dà una concentrazione compresa tra 0,8 e 1,6 g/l nel mezzo utilizzato per il saggio, se si segue la procedura raccomandata più sotto.

Se il fango non può essere utilizzato il giorno stesso del prelievo, ad ogni litro del fango attivo preparato come sopra si aggiungono 50 ml di liquame sintetico; il fango viene quindi aerato per tutta la notte a 20 ºC ± 2 ºC). L'aerazione viene mantenuta anche durante la giornata in attesa dell'uso prima del quale si controlla e, se necessario, si tampona il pH fra 6 e 8. I solidi sospesi nel liquido chiarificato si dovrebbero determinare come descritto nel precedente paragrafo.

Se si deve impiegare lo stesso gruppo di fanghi nei giorni successivi (quattro giorni al massimo), alla fine di ogni giornata di lavoro occorrerà aggiungere altri 50 ml di liquame sintetico, per litro di fango.

1.6.4. *Esecuzione del saggio*

Durata/tempo di contatto:	30 minuti e/o 3 ore, sotto aerazione
Acqua:	acqua potabile (se necessario declorata)
Alimentazione di aria:	aria pulita, esente da oli; flusso da 0,5 a 1 l/min
Apparecchiatura di misurazione:	bottiglia a fondo piatto del tipo della bottiglia per la determinazione del BOD
Ossimetro:	idoneo elettrodo ad ossigeno con registratore
Soluzione nutritiva:	liquame sintetico (vedi sopra)
Sostanza in esame:	la soluzione in esame è preparata in concomitanza all'inizio del saggio
Sostanza di riferimento:	ad esempio 3,5-diclorofenolo (almeno tre concentrazioni)
Controlli:	campioni inoculati esenti dalla sostanza in esame
Temperatura:	20 ºC ± 2 ºC.

Si descrive in seguito un procedimento sperimentale che può essere seguito sia per la sostanza in esame che per quella di riferimento durante il periodo di contatto di tre ore.

Occorrono diversi recipienti (ad esempio becher da 1 litro).

Si dovrebbe impiegare una serie di almeno cinque concentrazioni che differiscano tra di loro di un fattore costante di preferenza non superiore a 3,2.

Al tempo «0», si portano 16 ml di liquame sintetico a 300 ml con acqua. Si aggiungono 200 ml di inoculo batterico e si versa la miscela totale (500 ml) in un primo recipiente (primo controllo C_1).

▼B

I recipienti in esame dovrebbero essere aerati continuativamente in modo da impedire che il livello di O_2 disciolto scenda al di sotto di 2,5 ml/l ed in modo che, subito prima di misurare la velocità di respirazione, la concentrazione di O_2 sia almeno uguale a 6,5 mg/l.

Al tempo «15 minuti» (15 minuti è un intervallo arbitrario ma adeguato) si ripete la stessa operazione salvo che 100 ml della soluzione madre della sostanza in esame vengono aggiunti ai 16 ml di liquame sintetico prima di addizionare l'acqua sino a 300 ml e l'inoculo batterico sino al volume di 500 ml. Questa miscela viene quindi versata in un secondo recipiente ed aerata come sopra. Si ripete questo procedimento ad intervalli di 15 minuti con differenti volumi della soluzione madre della sostanza in esame, in modo da disporre di una serie di recipienti contenenti diverse concentrazioni della sostanza in esame. Infine si prepara un secondo controllo (C_2).

Dopo tre ore si determina il pH e si versa un'aliquota ben miscelata del contenuto del primo recipiente nell'apparecchio di misurazione e si misura la velocità di respirazione per un tempo fino a 10 minuti.

Questa determinazione viene ripetuta sul contenuto di ciascun recipiente ad intervalli di 15 minuti, in modo che il tempo di contatto per ogni recipiente sia di tre ore.

La sostanza di riferimento viene saggiata nello stesso modo su ciascun gruppo di inoculi batterici.

Quando si devono effettuare misurazioni dopo 30 minuti di contatto, occorre un procedimento diverso (ad esempio con più di un ossimetro).

Se si richiede la misura del consumo di ossigeno, si preparano altre bottiglie contenenti la sostanza in esame, il liquame sintetico ed acqua ma non fango attivo. Il consumo di ossigeno si misura e registra dopo un periodo di aerazione di 30 minuti e/o 3 ore (tempo di contatto).

2. **DATI E VALUTAZIONE**

La velocità di respirazione si calcola dal tracciato del registratore nell'intervallo che va da circa 2,5 a 6,5 mg O_2/l, oppure, se la velocità di respirazione è bassa, per un periodo di 10 minuti. Il tratto di curva di respirazione in cui si misura la velocità di respirazione dovrebbe essere lineare.

Se le velocità di respirazione dei due controlli differiscono tra loro di più del 15 % o se la EC_{50} (30 minuti e/o 3 ore) della sostanza di riferimento non cade nell'intervallo ammesso (da 5 a 30 mg/l per il 3,5-diclorofenolo), la prova non è valida e deve essere ripetuta.

Per ogni concentrazione in esame si calcola la percentuale di inibizione (vedi paragrafo 1.2). Quest'ultima viene riportata in grafico, su carta log-normale (o log-probability), in funzione della concentrazione e si ricava un valore di EC_{50}.

Usando procedimenti standard si possono determinare i limiti di confidenza al 95 % per i valori della EC_{50}.

▼B

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— sostanza in esame: dati di identificazione chimica,

— sistema di saggio: origine, concentrazione ed eventuali trattamenti preliminari del fango attivo,

— condizioni del saggio:

  — pH della miscela in esame prima di determinare la respirazione,

  — temperatura,

  — durata,

  — sostanza di riferimento e relativa EC_{50} misurata,

  — eventuale assunzione abiotica di ossigeno,

— risultati:

  — tutti i dati misurati,

  — curva di inibizione e metodo per il calcolo della EC_{50},

  — EC_{50} e, se possibile, limiti di confidenza al 95 %, EC_{20} ed $EC_{10,}$

  — tutte le osservazioni e le eventuali deviazioni dal presente metodo che potrebbero aver condizionato il risultato.

3.2. INTERPRETAZIONE DEI DATI

Dal momento che le complesse interazioni che si hanno nell'ambiente non possono essere fedelmente riprodotte in un saggio di laboratorio, il valore della EC_{50} dovrebbe essere considerato semplicemente come una indicazione della probabile tossicità della sostanza in esame per il fango attivo usato nel trattamento dei liquami o per i microorganismi delle acque reflue. Inoltre, le sostanze in esame aventi effetto inibitorio sull'ossidazione dell'ammoniaca possono anche causare curve di inibizione atipiche. Di conseguenza cali curve dovranno essere interpretate con cautela.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) International Standard ISO/8192-1986.

(2) Broecker, B. e Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, pagina 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R. e Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, pagina 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method n. 103,* descritto anche in:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, pagina 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredelung* 6, 1977, pagina 247.

(7) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida* 209, decisione C(84) 30 def. del Consiglio.

▼B

C.12. **BIODEGRADAZIONE**

SAGGIO SCAS MODIFICATO

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Scopo del metodo è quello di valutare la potenziale biodegradabilità ultima di sostanze organiche solubili in acqua e non volatili, esposte per un lungo periodo a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi. La vitalità dei microorganismi viene mantenuta per tutto il periodo aggiungendo giornalmente liquami decantati. (Per l'intervallo di fine settimana, i liquami possono essere conservati a 4 ºC. In alternativa si può usare il liquame sintetico del saggio di conferma OCSE.)

Nell'interpretazione dei risultati occorre tenere conto dell'eventuale assorbimento fisico-chimico della sostanza in esame sui solidi in sospensione (cfr. paragrafo 3.2).

A causa del lungo periodo di ritenzione della fase liquida (36 ore) e dell'aggiunta intermittente di nutrienti, la prova non riproduce le stesse condizioni che si hanno in un impianto per il trattamento dei liquami. I risultati ottenuti con diverse sostanze indicano che il sistema ha un elevato potenziale di biodegradazione.

Le condizioni sperimentali sono estremamente favorevoli alla selezione e/o all'adattamento di microorganismi capaci di degradare il composto in esame (si può seguire questo procedimento anche per produrre inoculi acclimatati da utilizzare in altri saggi).

Nel presente metodo la biodegradabilità ultima delle sostanze in esame viene determinata attraverso la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto (DOC) (è preferibile determinare il DOC dopo acidificazione e depurazione anziché dalla differenza $C_{totale} — C_{inorganico}$).

L'impiego simultaneo di un metodo analitico specifico consente di determinare la degradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto alle sostanze organiche che alle concentrazioni impiegate per il saggio:

— sono solubili in acqua (almeno 20 mg/l di carbonio organico disciolto),

— hanno una tensione di vapore trascurabile,

— non esercitano effetti inibitori sui batteri,

— non vengono assorbite in modo significativo dal sistema sperimentale,

— non vengono sottratte alla soluzione in esame mediante formazione di schiume.

Occorre determinare il contenuto di carbonio organico della sostanza in esame.

▼B

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti, in particolare nei casi in cui i valori siano bassi o trascurabili, sarà utile disporre di informazioni sulle proporzioni relative dei principali componenti della sostanza in esame.

Per l'interpretazione di eventuali valori bassi e per la scelta di una concentrazione adeguata al saggio, può essere utile disporre di informazioni sulla tossicità della sostanza per i microorganismi.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

C_T = concentrazione della sostanza in esame espressa come carbonio organico presente o addizionato al liquame sedimentato all'inizio dei periodo di aerazione (mg/l)

C_t = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del saggio alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

C_c = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del controllo alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

Nel presente metodo la biodegradazione è definita come eliminazione del carbonio organico. La biodegradazione può essere espressa come:

1) la rimozione percentuale D_{Da} della sostanza aggiunta giornalmente:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

dove:

D_{da} = degradazione/aggiunta giornaliera.

2) la rimozione percentuale D_{ssd} di sostanza rispetto a quella presente all'inizio di ogni giorno:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

dove:

D_{ssd} = degradazione/sostanza iniziale giornaliera.

Gli indici i e (i + 1) si riferiscono al giorno in cui si effettua la misurazione.

L'equazione 2(a) è consigliata se il DOC dell'effluente varia giornalmente mentre l'equazione 2(b) può essere usata quando il DOC dell'effluente rimane relativamente costante da un giorno all'altro.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

In alcuni casi quando si esamina una nuova sostanza, possono essere utili delle sostanze di riferimento; ciò nonostante non si propogono qui sostanze di riferimento specifiche.

Nell'appendice I vengono forniti dati relativi a numerosi composti analizzati in un saggio interlaboratorio soprattutto per consentire di tanto in tanto la calibrazione del metodo e per rendere possibile il confronto dei risultati quando se ne adotta un altro.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

I fanghi arrivi provenienti da un impianto di trattamento dei liquami vengono posti in una unità semicontinua per fanghi attivi (SCAS). Si aggiungono il composto in esame e liquame domestico sedimentato; si effettua l'aerazione della miscela per 23 ore. Quindi si interrompe l'aerazione, si lasciano decantare i fanghi e si rimouve il surnatante.

I fanghi che rimangono nella camera di aerazione vengono quindi mescolati con un'altra aliquota del composto in esame e del liquame, e si ripete il ciclo.

La biodegradazione si ricava determinando la quantità di carbonio organico disciolto nel surnatante. Tale valore viene confrontato con quello trovato nel surnatante del controllo contenente soltanto liquame decantato.

Se si utilizza un metodo analitico specifico si possono determinare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La riproducibilità di questo metodo basato sulla rimozione di carbonio organico disciolto non è stata ancora dimostrata. (Se si prende in considerazione la biodegradazione primaria si ottengono dati molto precisi per sostanze che siano estesamente degradate.)

La sensibilità del metodo dipende soprattutto dalla variabilità del bianco ed in minor misura dalla precisione della determinazione del carbonio organico disciolto e dalla quantità del composto in esame presente nel liquido all'inizio di ogni ciclo.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Preparazioni*

Per ciascuna sostanza in esame e per i controlli si collega un numero sufficiente di unità di aerazione pulite (in alternativa si può usare l'unità originale per il saggio SCAS da 1,5 litri) con i tubi di presa dell'aria (figura 1). L'aria compressa inviata nelle unità di saggio, purificata con un filtro di cotone grezzo, deve essere esente da carbonio organico e satura di acqua per ridurre le perdite per evaporazione.

Da un impianto di trattamento a fanghi attivi adibito prevalentemente a liquami domestici si preleva un campione di liquido chiarificato, contenente da 1 a 4 g/l di solidi sospesi. Per ciascuna unità di aerazione occorrono circa 150 ml di liquido chiarificato.

▼B

Si preparano con acqua distillata le soluzioni madri della sostanza in esame; di solito è richiesta una concentrazione di 400 mg/l di carbonio organico che, se non ha luogo biodegradazione, corrisponde ad una concentrazione di sostanza in esame pari a 20 mg/l di carbonio all'inizio di ogni ciclo di aerazione.

Se la tossicità per i microorganismi lo consente si possono avere concentrazioni più elevate.

Si misura la concentrazione di carbonio organico nelle soluzioni madri.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

Il saggio va effettuato da 20 a 25 °C.

Si utilizza un'elevata concentrazione di microorganismi aerobici (da 1 a 4 g/l di solidi sospesi) ed il periodo di ritenzione effettivo è di 36 ore. In genere, otto ore dopo l'avvio di ciascun ciclo di aerazione, il carbonio organico contenuto nei liquami immessi è ampiamente ossidato. Dopo ha inizio la respirazione endogena del fango che si manterrà per tutto il rimanente periodo di aerazione, durante il quale il solo substrato disponibile è la sostanza in esame a meno che non venga anch'essa metabolizzata rapidamente. Questi fattori, unitamente alla reinoculazione giornaliera del sistema (cfr. paragrafo 1.4), nel caso in cui si usino come mezzo liquami domestici, crea condizioni estremamente favorevoli sia per l'acclimatazione, sia per ottenere elevati valori di biodegradazione.

1.6.3. *Esecuzione del saggio*

Si preleva un campione del liquido chiarificato da un idoneo impianto a fanghi attivi per il trattamento di liquami in prevalenza domestici oppure da un impianto di laboratorio e si mantiene in condizioni aerobiche sino all'impiego in laboratorio. Si riemie ciascuna unità di aerazione e l'unità di controllo con 150 ml (se si utilizza l'unità originale per il saggio SCAS, moltiplicare i volumi per 10) di liquido chiarificato e si avvia l'aerazione. Dopo 23 ore si interrompe l'aerazione e si lasciano decantare i fanghi per 45 minuti. Si apre, a turno, il rubinetto di ogni recipiente e si prelevano aliquote da 100 ml di surnatante. Si prepara, immediatamente prima dell'impiego, un campione di liquami domestici decantati e se ne aggiungono 100 ml al fango che rimane in ciascuna unità di aerazione. Si avvia nuovamente l'aerazione. A questo punto non si aggiunge la sostanza da esaminare e si alimentano giornalmente le unità con liquami domestici fino a quando si forma per decantazione un surnatante chiaro. In genere questa fase richiede al massimo due settimane e nel frattempo il carbonio organico disciolto nel surnatante raggiunge alla fine di ogni ciclo di aerazione un valore costante.

Terminata questa fase, i singoli fanghi sedimentati vengono mescolati tra loro e 50 ml di tale miscela vengono introdotti in ciascuna unità.

95 ml di liquame sedimentato e 5 ml di acqua vengono aggiunti all'unità di controllo, e 95 ml di liquame sedimentato più 5 ml della soluzione madre della sostanza in esame (400 mg/l) vengono aggiunti alle unità di saggio. Si riavvia l'aerazione e si protrae per 23 ore. Si lasciano quindi sedimentare i fanghi per 45 minuti, si preleva il surnatante e se ne analizza il contenuto di carbonio organico disciolto.

Le suddette operazioni di riempimento e di prelievo, vengono ripetute ogni giorno per tutta la durata del saggio.

▼B

Prima della sedimentazione può essere necessario pulire le pareti delle unità per evitare che si accumulino solidi al di sopra del livello del liquido. Per evitare contaminazioni incrociate si utilizza un raschiatore o una spazzola diversa per ciascuna unità.

Idealmente, il carbonio organico disciolto nei surnatanti dovrebbe essere determinato ogni giorno anche se si può consentire una minore frequenza delle analisi. Prima delle analisi i liquidi vengono filtrati mediante filtri a membrana con pori da 0,45 μm lavati oppure vengono centrifugati. Il filtri a membrana sono idonei se durante la filtrazione non liberano carbonio organico né assorbono la sostanza in esame. Nella centrifuga la temperatura del campione non deve superare i 40 gradi centrigradi.

La durata del saggio per i composti che mostrano una biodegradazione limitata o nulla non è fissata, ma l'esperienza suggerisce che la durata dovrebbe essere, in generale, di almeno 12 settimane, ma non più lunga di 26 settimane.

2. **DATI E VALUTAZIONE**

I valori del carbonio organico disciolto rilevati nei surnatanti delle unità di saggio e delle unità di controllo vengono riportati in grafico in funzione del tempo.

Con il procedere della biodegradazione i valori determinati nel saggio si avvicinano a quelli del controllo, Quando la differenza tra i due livelli si mantiene costante per oltre tre misurazioni consecutive, si esegue un numero di ulteriori misurazioni, tale da effettuare una elaborazione statistica dei dati e da calcolare la biodegradazione percentuale subita dalla sostanza in esame (D_{da} oppure D_{ssd}, cfr. paragrafo 1.2).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— tutte le informazioni sul tipo di liquame, sul tipo di unità usata e sui risultati sperimentali concernenti le sostanze esaminate, la sostanza di riferimento, se usata, ed il bianco,

— la temperatura,

— la curva di rimozione, nonché descrizione e metodo di calcolo relativi (cfr. paragrafo 1.2),

— date e luogo di prelievo dei fanghi attivi e del liquame, stato di adattamento, concentrazione, ecc.,

— motivazioni scientifiche di eventuali modifiche del procedimento,

— firma e data.

▼B

3.2. INTERPRETAZIONI DEI RISULTATI

Dato che le sostanze esaminate con il presente metodo non sono facilmente biodegradabili, qualsiasi rimozione del DOC imputabile esclusivamente alla biodegradazione avviene in genere gradualmente nel corso di giorni o settimane, ad eccezione di quei casi in cui avviene una improvvisa acclimatazione indicata da una brusca scomparsa che si verifica dopo alcune settimane.

In ogni caso l'assorbimento chimico-fisico può a volte giocare un ruolo importante; ciò si verifica quando all'inizio della prova si riscontra una parziale o completa rimozione del DOC aggiunto. Ciò che accade successivamente, dipende da fattori quali il grado di assorbimento e la concentrazione di solidi sospesi nell'effluente di scarico. Di solito la differenza tra concentrazione del DOC nel controllo e nei surnatanti del saggio aumenta gradualmente rispetto al basso valore iniziale e tale differenza si mantiene quindi al nuovo valore per il resto della prova a meno che non si verifichi l'acclimatazione.

Se si vuole distinguere nel grafico la biodegradazione (o la parziale biodegradazione) dall'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi. Questi possono essere effettuati in diversi modi: il più convincente è quello di usare il surnatante o i fanghi come inoculo in un saggio del dossier di base (preferibilmente il saggio respirometrico).

Le sostanze che in questo saggio mostrano un'elevata rimozione del DOC, non dovuta ad assorbimento, devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Un'eliminazione parziale non dovuta ad assorbimento indica che la sostanza è almeno in parte biodegradabile.

Valori bassi o nulli di rimozione del DOC possono essere dovuti ad un effetto inibente della sostanza in esame sui microorganismi, il che può anche essere evidenziato da lisi o da riduzione dei fanghi con formazione di surnatanti torbidi. Il saggio deve essere ripetuto a concentrazione più bassa della sostanza in esame.

Il ricorso a un metodo analitico specifico o alla marcatura della sostanza in esame con il ^{14}C può permettere una maggiore sensibilità. Nel caso di composti marcati con ^{14}C lo sviluppo di $^{14}CO_2$ confermerà che la biodegradazione ha avuto luogo.

Quando i risultati vengono presentati anche come biodegradazione primaria occorre dare, se possibile, una spiegazione del cambiamento di struttura chimica che causa la diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e riportare la risposta fornita dal bianco.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 A,* decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

▼B

Appendice 1

Saggio SCAS: Esempio di risultati

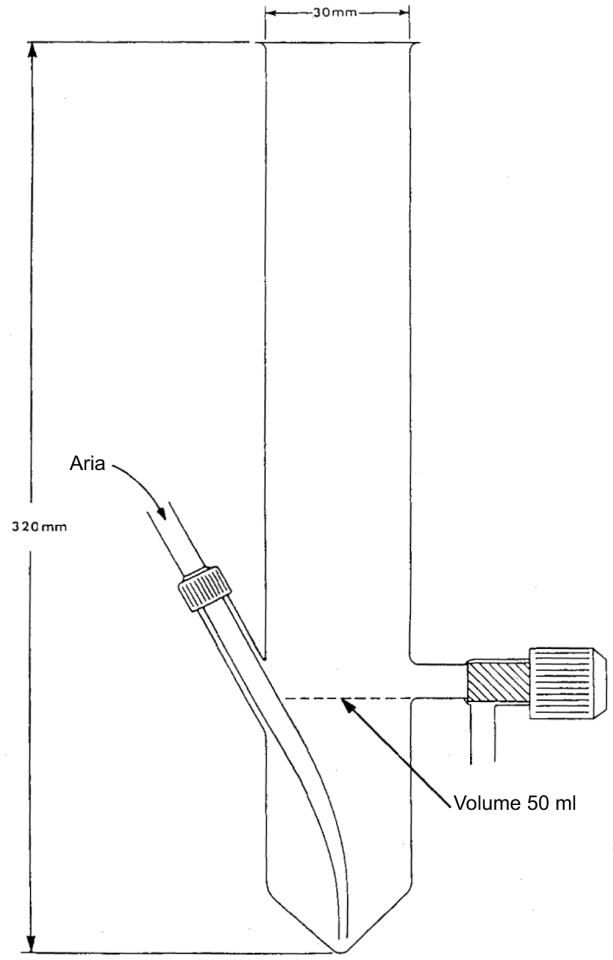
Sostanza	(mg/l)	C_t — C_c (mg/l)	Biodegradazion* percentuale D_{da}	Durata del saggio (giorni)
4-acetil aminobenzen sulfonato	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilene benzen sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolo	16,9	0,8	95,3	40
Glicol dietilenico	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Ciclopentano tetra carbossilato	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Appendice 2

Esempio di apparecchiatura per il saggio

Figura 2



▼B

C.13. BIOCONCENTRAZIONE: SAGGIO SUI PESCI, METODO A FLUSSO CONTINUO

1. METODO

Questo metodo di bioconcentrazione corrisponde al metodo OCSE TG 305 (1996).

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive una procedura per caratterizzare il potenziale di bioconcentrazione di una sostanza nei pesci in condizioni di flusso continuo. Benché i regimi di saggio a flusso continuo siano ampiamente preferibili, sono ammissibili regimi semistatici, purché soddisfatti i criteri di validità.

Il metodo fornisce dettagli sufficienti per eseguire il saggio concedendo una libertà adeguata per adattare l'impianto sperimentale alle particolari condizioni di laboratorio e alla variabilità delle caratteristiche delle sostanze analizzate. La sua validità è massima per composti chimici organici stabili con log P_{oa} compreso tra 1,5 e 6,0 (1), ma è applicabile anche a sostanze superlipofile (log P_{oa}> 6,0). La stima preliminare del fattore di bioconcentrazione (BCF), indicato talvolta con K_B, per tali sostanze superlipofile sarà presumibilmente più elevata del fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) prevedibilmente ottenuto da esperimenti di laboratorio. Stime preliminari del fattore di bioconcentrazione per composti chimici organici con valori di log P_{oa} fino a circa 9,0 si possono ricavare dall'equazione di Bintein at al (2). I parametri che caratterizzano il potenziale di bioconcentrazione includono la costante di velocità di assorbimento (k_1), la costante di velocità di depurazione (k_2) e il BCF_{SS}.

L'analisi dei campioni di acqua e di pesce può risultare più facile se le sostanze in esame sono radiomarcate; e queste possono venire utilizzate per determinare se sia il caso di procedere all'identificazione e alla qualificazione dei prodotti di degradazione. Se si misurano i residui radioattivi totali (per esempio per combustione o solubilizzazione dei tessuti), il BCF risulta basato sul composto progenitore, eventuali metaboliti trattenuti e anche sul carbonio assimilato. I BCF basati sui residui radioattivi totali non sono pertanto confrontabili direttamente con un BCF ottenuto mediante analisi chimica specifica del solo composto progenitore.

Negli studi con radiomarcante si possono impiegare procedure di bonifica per determinare il BCF sulla base del composto progenitore, e se ritenuto necessario si possono caratterizzare i principali metaboliti. È anche possibile combinare uno studio di metabolismo nei pesci con uno studio di bioconcentrazione mediante l'analisi e l'identificazione dei residui nei tessuti.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Bioconcentrazione/Bioaccumulo è l'aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo (suoi tessuti specificati) rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante.

Il *fattore di bioconcentrazione* (BCF o K_B) in qualsiasi momento durante la fase di assorbimento di questo saggio di accumulo è la concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce o suoi tessuti specificati [C_f in µg/g (ppm)] divisa per la concentrazione del composto chimico nell'ambiente circostante [C_a in µg/ml (ppm)].

▼B

Il *fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario* (BCF_{SS} o K_B) non cambia in modo significativo su un periodo di tempo prolungato, la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante essendo costante durante tale periodo di tempo.

Un *livello costante* o *stato stazionario* nel tracciato della sostanza in esame nei pesci (C_f) contro il tempo viene raggiunto quando la curva diventa parallela all' asse del tempo e tre analisi successive di C_f su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni differiscono di non oltre il ± 20 % una dall'altra, e non vi sono differenze significative tra i tre periodi di campionamento. Quando si analizzano campioni raggruppati, sono necessarie almeno quattro analisi successive. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente saranno più opportuni intervalli di sette giorni.

Fattori di bioconcentrazione calcolati direttamente dalle costanti di velocità cinetiche (k_1/k_2) sono definiti fattore di concentrazione cinetico, BCF_k.

Il *coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua* (P_{oa}) è il rapporto della solubilità di un composto chimico in n-ottanolo su quella in acqua all'equilibrio (metodo A.8), espresso anche come K_{oa}. Il logaritmo di P_{oa} viene usato come indicazione del potenziale di bioconcentrazione di un composto chimico da parte di organismi acquatici.

La *fase di esposizione o assorbimento* è il tempo durante il quale i pesci sono esposti al composto chimico in esame.

La *costante di velocità di assorbimento* (k_1) è il valore numerico che definisce la velocità di aumento della concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce di prova (o suoi tessuti specificati) quando il pesce viene esposto a tale composto chimico (k_1 è espresso in $giorni^{-1}$).

La *fase post-esposizione o di depurazione (perdita)* è il tempo, dopo il trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza, durante il quale viene studiata la depurazione (o perdita netta) della sostanza dal pesce di prova (o suo tessuto specificato).

La *costante di velocità di depurazione (perdita) (*k_2) è il valore numerico che definisce la velocità di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce di prova (o suoi tessuti specificati) dopo il trasferimento del pesce da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza (k_2 è espresso in $giorni^{-1}$).

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il saggio è costituito da due fasi: la fase di esposizione (assorbimento) e di post-esposizione (depurazione). Durante la fase di assorbimento, gruppi separati di pesci di una stessa specie vengono esposti ad almeno due concentrazioni della sostanza in esame. Essi vengono poi trasferiti in un ambiente esente dalla sostanza in esame per la fase di depurazione. È sempre necessaria una fase di depurazione, salvo che l'assorbimento della sostanza durante la fase di assorbimento sia risultato insignificante (per esempio BCF minore di 10). La concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce (o suo tessuto specificato) viene seguita in tutte e due le fasi della prova. In aggiunta alle due concentrazioni di prova, un gruppo di pesci di controllo viene mantenuto in condizioni identiche, salvo per l'assenza della sostanza in esame, per confrontare possibili effetti dannosi osservati nel saggio di bioconcentrazione con un gruppo di controllo corrispondente e per ottenere concentrazioni di fondo della sostanza in esame.

▼B

La fase di assorbimento viene eseguita per 28 giorni salvo dimostrazione che l'equilibrio è stato raggiunto prima. Per una previsione della durata della fase di assorbimento e del tempo necessario per arrivare allo stato stazionario ci si può basare sull'equazione fornita nell'allegato 3. Viene poi iniziato il periodo di depurazione trasferendo il pesce in un altro contenitore pulito con lo stesso ambiente ma senza la sostanza in esame. Se possibile, il fattore di bioconcentrazione viene calcolato preferibilmente sia come rapporto (BCF_{SS}) delle concentrazioni nel pesce (C_f) e nell'acqua (C_a) nello stato stazionario apparente che come fattore di bioconcentrazione cinetico, BCF_k, che è il rapporto fra le costanti di velocità di assorbimento (k_1) e di depurazione (k_2) assumendo una cinetica di primo ordine. Se appare ovvio che la cinetica seguita non è di primo ordine, impiegare modelli più complessi (allegato 5).

Se lo stato stazionario non viene raggiunto entro 28 giorni, la fase di assorbimento deve essere prolungata fino al raggiungimento dello stato stazionario, con un limite massimo di 60 giorni, dopo di che si incomincia la fase di depurazione.

La costante di velocità di assorbimento, la costante di velocità di depurazione (perdita) (o le costanti nel caso di modelli più complessi), il fattore di bioconcentrazione e, se possibile, i limiti di confidenza di ciascuno di questi parametri vengono calcolati sulla base del modello che meglio descrive le concentrazioni misurate di sostanza in esame nel pesce e nell'acqua.

Il BCF è espresso in funzione del peso umido totale del pesce. Tuttavia, per scopi speciali, se il pesce è sufficientemente grande o può venire diviso in parti commestibili (filetto) e non commestibili (viscere), si possono usare tessuti od organi specificati (per esempio muscolo, fegato). ►C1 Poiché per molte sostanze organiche esiste una chiara relazione tra il potenziale di bioconcentrazione e la lipofilia, esiste anche una relazione corrispondente tra il contenuto di lipidi nel pesce di prova e la bioconcentrazione osservata di tali sostanze ◄. Pertanto, allo scopo di ridurre questa fonte di variabilità nei risultati sperimentali per le sostanze di elevata lipofilia (cioè con log P_{oa}> 3), la bioconcentrazione dovrebbe essere espressa in relazione al contenuto di lipidi oltre che al peso corporeo totale.

Il contenuto di lipidi deve essere determinato possibilmente sullo stesso materiale biologico usato per determinare la concentrazione della sostanza in esame.

1.4. INFORMAZIONE SULLA SOSTANZA IN ESAME

Prima di eseguire la prova di bioconcentrazione si dovrebbero conoscere le seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

— solubilità in acqua;

— coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua P_{oa} (indicato anche con K_{oa}, determinato mediante HPLC in A.8)

— idrolisi

— fototrasformazione in acqua, determinata sotto irraggiamento solare o solare simulato e nelle condizioni di irraggiamento della prova di bioconcentrazione (3);

▼B

— tensione superficiale (per sostanze per le quali non è possibile determinare il log P_{oa});

— tensione di vapore;

— pronta biodegradabilità (se del caso).

Un'altra informazione richiesta è la tossicità nei confronti delle specie ittiche usate nel saggio, preferibilmente la CL_{50} asintotica (cioè indipendente dal tempo). Per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di saggio e nel materiale biologico, oltre ai dettagli relativi alla preparazione e conservazione del campione è necessario disporre di un metodo analitico appropriato, di accuratezza, precisione e sensibilità note. Dovrebbe essere noto anche il limite di rivelazione analitica in acqua e nei tessuti del pesce della sostanza in esame. Quando per l'esame si utilizza una sostanza marcata con ^{14}C è necessario conoscere la percentuale di radioattività associata ad impurezze.

1.5. VALIDITÀ DEL SAGGIO

Perché il saggio sia valido occorre rispettare le seguenti condizioni:

— le variazioni di temperatura devono essere minori di ± 2 °C,

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto non deve scendere al di sotto del 60 % della saturazione,

— la concentrazione della sostanza in esame nelle camere deve venire mantenuta entro ±20 % della media dei valori misurati durante la fase di assorbimento,

— la mortalità o altri effetti dannosi o malattie sia nei pesci di controllo che in quelli trattati devono essere minori del 10 % al termine della prova. Quando la prova viene prolungata a varie settimane o mesi, il tasso di mortalità o altri effetti dannosi in tutte e due le serie di pesci deve essere minore del 5 % al mese e non superare il 30 % in totale.

1.6. COMPOSTI DI RIFERIMENTO

Per verificare la procedura sperimentale, laddove richiesto, può servire l'uso di composti di riferimento di potenziale di bioconcentrazione noto. Tuttavia per ora non è possibile raccomandare sostanze specifiche.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.7.1. *Apparecchiatura*

Per tutte le parti dell'apparecchiatura, evitare accuratamente l'uso di materiali soggetti a dissoluzione, assorbimento o lisciviatura e che possano avere un effetto dannoso sul pesce. Si possono usare vasche rettangolari o cilindriche normali di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico. Minimizzare l'uso di tubature in materia plastica flessibile. Usare di preferenza tubature di Teflon (R), acciaio inossidabile e/o vetro. L'esperienza ha dimostrato che per sostanze con elevati coefficienti di assorbimento come i piretroidi sintetici può essere necessario il vetro silanizzato. In queste situazioni le apparecchiature non possono venire riutilizzate.

▼B

1.7.2. *Acqua*

Nel saggio si usa in genere acqua naturale che dovrebbe essere prelevata da una fonte non contaminata e di qualità uniforme. L'acqua di diluizione deve essere di una qualità che permetta la sopravvivenza delle specie ittiche scelte per la durata del periodo di acclimatazione e del periodo di prova senza che mostrino alcun aspetto o comportamento anomalo. L'ideale sarebbe dimostrare che la specie in esame è in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi nell'acqua di diluizione (per esempio in una coltura di laboratorio o in un saggio di tossicità su tutto il ciclo di vita). L'acqua deve essere caratterizzata almeno con il pH, la durezza, i solidi totali, il carbonio organico totale e di preferenza anche ammonio, nitriti e alcalinità nonché, per le specie marine, la salinità. I parametri importanti per il benessere ottimale dei pesci sono perfettamente noti, ma l'allegato 1 fornisce concentrazioni massima raccomandate per un certo numero di parametri per le acque dolci e marine usate nel saggio.

L'acqua dovrebbe essere di qualità costante per tutta la durata di un saggio. Il pH dovrebbe essere compreso tra 6,0 e 8,5, ma durante un dato saggio deve restare entro ± 0,5 unità di pH. Per assicurarsi che l'acqua di diluizione non abbia influenze indesiderate sul risultato sperimentale (per esempio per complessazione della sostanza in esame) o influisca dannosamente sul pesce, prelevare di quando in quando dei campioni per l'analisi. La determinazione dei metalli pesanti (per esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (per esempio Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), dei pesticidi (per esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata per esempio ogni 3 mesi, ove si sappia che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Se la qualità dell'acqua si è dimostrata costante per almeno un anno, le determinazioni possono essere effettuate con minore frequenza, a intervalli più lunghi (per esempio ogni sei mesi).

Il contenuto naturale di particelle in sospensione nonché il carbonio organico totale (TOC) nell'acqua di diluizione devono essere i più bassi possibili per evitare un assorbimento della sostanza in esame su materia organica che ne può ridurre la biodisponibilità (4). Il valore massimo accettabile è di 5 mg/l per i solidi sospesi (materia secca che non passa attraverso un filtro da 0,45 μm) e di 2 mg/l per il carbonio organico totale (vedi allegato 1). Se necessario, filtrare l'acqua prima dell'uso. Il contributo del pesce di prova al contenuto di carbonio organico nell'acqua (escrezioni) e quello dei residui alimentari deve essere il più basso possibile. Durante tutto il saggio, la concentrazione del carbonio organico nel recipiente di esecuzione del saggio non deve superare la concentrazione di carbonio organico derivata dalla sostanza in esame e dall'eventuale agente solubilizzante più di 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Soluzioni di saggio*

Preparare una soluzione madre («stock») della sostanza in esame a una concentrazione adatta. La soluzione madre deve essere preparata preferibilmente per semplice miscelazione o agitazione della sostanza in esame nell'acqua di diluizione. È preferibile non usare solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti); può tuttavia essere opportuno in alcuni casi per produrre una soluzione madre di concentrazione adatta. Solventi che si possono usare sono etanolo, metanolo, etere monometilico del glicol etilenico, etere dimetilico del glicol etilenico, dimetilformammide e glicol trietilenico. Disperdenti utilizzabili sono Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. Prestare attenzione quando si usano agenti prontamente biodegradabili perché possono causare problemi di crescita batterica nelle prove a flusso continuo. La sostanza in esame può essere radiomarcata e dovrebbe avere la massima purezza (preferibilmente > 98 %).

▼B

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (per esempio pompa dosatrice, diluitore proporzionale, sistema di saturazione) per fornire le concentrazioni di prova nelle camere di saggio. Il volume di ciascuna camera di saggio deve essere sostituito preferibilmente almeno cinque volte al giorno. La modalità a flusso continuo va preferita, ma laddove non sia possibile (per esempio quando ciò ha un'influenza dannosa sugli organismi in esame) si può utilizzare una tecnica semistatica, purché siano rispettati i criteri di validità. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione devono essere controllate 48 ore prima del saggio e poi almeno una volta al giorno durante il saggio. In questo controllo deve essere inclusa la determinazione della portata attraverso ciascuna camera di saggio e si deve garantire che questa vari non più del 20 % all'interno di ciascuna camera e tra una camera e l'altra.

1.7.4. *Scelta delle specie*

Criteri importanti nella scelta delle specie sono la disponibilità, la possibilità di ottenerle di dimensioni convenienti e di mantenerle in modo soddisfacente in laboratorio. Altri criteri per la scelta delle specie ittiche includono l'importanza ricreativa, commerciale ed ecologica nonché una sensibilità paragonabile, il fatto che essa sia stata già utilizzata con successo in passato, ecc.

Specie sperimentali raccomandate sono indicate nell'allegato 2. Si possono usare anche altre specie, ma può darsi che la procedura di saggio debba venire adattata per ottenere condizioni sperimentali idonee. In questo caso, la relazione deve indicare la ragione della scelta della specie e il metodo di saggio.

1.7.5. *Stabulazione del pesce*

Acclimatare la popolazione ittica di scorta per almeno due settimane in acqua alla temperatura di saggio e alimentarla con mangime dello stesso tipo usato durante il saggio in quantità sufficiente.

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'intera partita viene respinta,

— mortalità tra il 5 % e il 10 % della popolazione in sette giorni: l'acclimatazione prosegue per altri sette giorni,

— mortalità minore del 5 % della popolazione in sette giorni: la partita è accettabile — in caso di mortalità superiore al 5 % durante il secondo periodo di sette giorni l'intera partita viene respinta.

Assicurarsi che i pesci usati nelle prove non presentino malattie o anomalie osservabili. Scartare qualsiasi pesce ammalato. Nelle due settimane che precedono il saggio e durante il saggio i pesci non devono ricevere alcun trattamento per la cura di malattia.

▼B

1.8. ESECUZIONE DEL SAGGIO

1.8.1. *Saggio preliminare*

Può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentali del test definitivo, per esempio la scelta delle concentrazioni della sostanza in esame e la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione.

1.8.2. *Condizioni di esposizione*

1.8.2.1. Durata della fase di assorbimento

La durata prevedibile della fase di assorbimento si può ricavare dall'esperienza pratica (per esempio da uno studio precedente o da un composto chimico con accumulo simile) o da certe relazioni empiriche, conoscendo la solubilità in acqua o il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza in esame (vedi allegato 3).

La fase di assorbimento deve durare 28 giorni, salvo dimostrazione che l'equilibrio è stato raggiunto prima. Se in 28 giorni non si raggiunge lo stato stazionario, prolungare la fase di assorbimento effettuando ulteriori misure, fino al raggiungimento dello stato stazionano, con un massimo di 60 giorni.

1.8.2.2. Durata della fase di depurazione

Un periodo pari a metà della durata della fase di assorbimento è solitamente sufficiente per una riduzione appropriata (per esempio del 95 %) del carico della sostanza nel corpo (vedi allegato 3 per una spiegazione della stima). Se il tempo necessario per raggiungere una perdita del 95 % è troppo lungo nella pratica, per esempio se supera il doppio della normale durata della fase di assorbimento (cioè oltre 56 giorni), si può utilizzare un periodo più breve (fino ad una riduzione della concentrazione della sostanza in esame al di sotto del 10 % della concentrazione nello stato stazionario). Tuttavia, per sostanze con caratteristiche di assorbimento e depurazione più complesse di quelle rappresentate da un modello ittico a compartimento singolo, che fornisce una cinetica di primo ordine, prevedere fasi di depurazione più lunghe per la determinazione delle costanti di velocità di perdita. Il periodo può tuttavia dipendere dal tempo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nel pesce rimane al di sopra del limite analitico di rivelazione.

1.8.2.3. Numero di pesci di prova

Scegliere il numero di pesci per ogni concentrazione di prova in modo tale che ad ogni campionamento siano disponibili almeno quattro pesci per campione. Se si richiede una potenza statistica più elevata, sarà necessario un maggior numero di pesci per campione.

Se si usano pesci adulti, indicare nella relazione se l'esperimento viene effettuato con maschi o femmine o ambedue. Se si utilizzano tutti e due i sessi, prima di incominciare l'esposizione documentare che le differenze di contenuto di lipidi tra i sessi non siano significative; può essere necessario raggruppare tutti i maschi e tutte le femmine.

▼B

In ogni saggio scegliere pesci di peso simile, tale che il più piccolo abbia un peso non inferiore a due terzi del più grande. I pesci dovrebbero essere tutti della stessa classe di età e provenire dalla stessa fonte. Poiché il peso e l'età di un pesce sembrano talvolta avere un effetto significativo sui valori di BCF (1), riportare accuratamente questi dettagli nella relazione. Si raccomanda di pesare un sottocampione dello stock di pesci prima del saggio per stimare il peso medio.

1.8.2.4. Carico

Usare rapporti acqua su pesce elevati per minimizzare la riduzione di C_a causata dall'aggiunta del pesce all'inizio del saggio e per evitare riduzioni della concentrazione di ossigeno disciolto. È importante che il carico sia appropriato per la specie usata nel saggio. In ogni caso si raccomanda normalmente un carico di 0,1-1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno. Si possono utilizzare carichi elevati se si dimostra che la concentrazione della sostanza in esame può venire mantenuta entro i limiti di ± 20 % del valore richiesto, e che la concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60 % della saturazione.

Nella scelta di appropriati regimi di carico si deve tener conto dell'habitat normale della specie ittica. Per esempio, pesci che vivono sul fondo, a pari volume d'acqua, possono richiedere un acquario con area di fondo più grande rispetto alle specie ittiche pelagiche.

1.8.2.5. Alimentazione

Durante i periodi di acclimatazione e di saggio, mantenere i pesci ad un regime alimentare appropriato, avente un contenuto di lipidi e di proteine totali noto, in quantità sufficiente per tenerli in condizioni di buona salute e per mantenere il peso corporeo. Per tutto il periodo di acclimatazione e di prova somministrare ai pesci il cibo in una quantità approssimativamente dall'1 % al 2 % del peso corporeo al giorno; nella maggior parte delle specie ittiche questo regime mantiene la concentrazione dei lipidi ad un livello relativamente costante durante il saggio. La quantità di mangime deve venire ricalcolata, per esempio una volta alla settimana, per mantenere costanti il peso corporeo e il contenuto di lipidi. Per questo calcolo, si può stimare il peso dei pesci in ciascuna camera di saggio in base al peso del pesce campionato più recentemente nella stessa camera. Non pesare i pesci rimasti nella camera.

Cibo non consumato e feci vengono sifonati giornalmente dalle camere di saggio poco dopo la fornitura del cibo (da 30 minuti a 1 ora). Mantenere le camere più pulite possibile per tutto il saggio in modo che la concentrazione di materia organica rimanga più scarsa possibile perché la presenza di carbonio organico può limitare la biodisponibilità della sostanza in esame (1).

Poiché molti mangimi derivano da farina di pesce, analizzare il contenuto della sostanza in esame nel mangime. È desiderabile analizzare nel mangime anche il contenuto di pesticidi e metalli pesanti.

▼B

1.8.2.6. Luce e temperatura

Il fotoperiodo è normalmente da 12 a 16 ore e la temperatura (± 2 °C) dovrebbe essere appropriata per la specie di prova (cfr. allegato 2). Il tipo e le caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti. Fare attenzione ad una possibile fototrasformazione della sostanza in esame nelle condizioni di irraggiamento dello studio. Usare un'illuminazione appropriata evitando l'esposizione del pesce a fotoprodotti non naturali. In alcuni casi può essere appropriato utilizzare un filtro per bloccare la radiazione UV al di sotto di 290 nm.

1.8.2.7. Concentrazioni di prova

I pesci vengono esposti in condizioni di flusso continuo ad almeno due concentrazioni della sostanza in esame in acqua. Normalmente la concentrazione più elevata (o massima) della sostanza in esame viene scelta intorno all'1 % della sua CL_{50} asintotica acuta e almeno dieci volte più elevata del suo limite di rivelazione in acqua mediante il metodo analitico usato.

La concentrazione di prova massima può venire determinata anche dividendo la CL_{50} acuta a 96 ore per un appropriato rapporto acuta/-cronica (rapporti appropriati per alcuni composti chimici possono essere da circa 3 fino a 100). Se possibile, scegliere l'altra o le altre concentrazioni in modo che differiscano dalla suddetta di un fattore 10. Se ciò non è possibile perché il limite analitico urta con il criterio dell'1 % della CL_{50}, si può usare un fattore minore di 10, altrimenti prendere in considerazione la marcatura con ^{14}C della sostanza in esame. Non usare mai una concentrazione superiore alla solubilità della sostanza in esame.

Se si usa un agente solubilizzante, la sua concentrazione non dovrebbe essere superiore a 0,1 ml/l, e deve essere uguale in tutte le vasche di saggio. Il suo contributo, insieme con la sostanza in esame, al contenuto complessivo di carbonio organico nell'acqua usata per il saggio deve essere noto. Fare comunque il possibile per evitare l'uso di tali materiali.

1.8.2.8. Prove di controllo

Oltre alla serie dei saggi, eseguire una prova di controllo con l'acqua di diluizione o, se del caso, una prova con acqua contenente l'agente solubilizzante, posto che sia stato stabilito che l'agente non ha effetti sul pesce; altrimenti eseguire tutte e due le prove di controllo.

1.8.3. *Frequenza delle misure della qualità dell'acqua*

Durante il saggio, misurare in tutte le vasche ossigeno disciolto, TOC, pH e temperatura. La durezza totale e la salinità, se del caso, devono essere misurate nelle prove di controllo e in una vasca alla concentrazione massima. Come minimo, l'ossigeno disciolto e, se del caso, la salinità devono essere misurati tre volte — all'inizio, verso la metà e alla fine del periodo di assorbimento — e una volta alla settimana durante il periodo di depurazione. Il TOC deve essere misurato all'inizio del saggio (24 h e 48 h prima dell'inizio della fase di assorbimento) prima dell'aggiunta del pesce e almeno una volta la settimana durante le fasi di assorbimento e depurazione. La temperatura va misurata giornalmente, il pH all'inizio e al termine di ciascun periodo e la durezza una volta per ogni saggio. La temperatura dovrebbe preferibilmente essere controllata in continuo in almeno una vasca.

▼B

1.8.4. *Campionamento e analisi dei pesci e dell'acqua*

1.8.4.1. Programma di campionamento del pesce e dell'acqua

Per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame, l'acqua delle camere di saggio viene campionata prima dell'aggiunta del pesce e durante le fasi di assorbimento e depurazione. Campionare l'acqua come minimo tutte le volte che viene campionato il pesce e prima della fornitura del mangime. Durante la fase di assorbimento, determinare le concentrazioni della sostanza in esame per verificare il rispetto dei criteri di validità.

I pesci vengono campionati almeno cinque volte durante la fase di assorbimento e almeno quattro volte durante la fase di depurazione. Poiché in qualche caso risulterà difficile calcolare una stima ragionevolmente precisa del BCF sulla base di questo numero di campioni, in particolare quando la cinetica di depurazione non è una semplice cinetica di primo ordine, è consigliabile prelevare campioni a frequenza più elevata in tutti e due i periodi (cfr. allegato 4). I campioni in più vengono conservati e analizzati solo se i risultati della prima serie di analisi si dimostrano inadeguati per il calcolo del BCF con la precisione desiderata.

L'allegato 4 presenta un esempio di un programma di campionamento accettabile. Se si usano altri valori di P_{oa} per calcolare il tempo di esposizione necessario per un assorbimento del 95 %, si possono facilmente calcolare altri programmi.

Il campionamento viene continuato durante la fase di assorbimento fino a quando si stabilisce lo stato stazionario, con un limite massimo di 28 giorni. Se non si raggiunge lo stato stazionario in 28 giorni, il campionamento continua fino al raggiungimento dello stato stazionario, con un massimo di 60 giorni. Prima dell'inizio della fase di depurazione, i pesci vengono trasferiti in vasche pulite.

1.8.4.2. Campionamento e preparazione del campione

I campioni d'acqua per l'analisi vengono ottenuti per esempio mediante sifonatura attraverso tubature inerti da un punto centrale della camera di saggio. Poiché sembra che né la filtrazione né la centrifugazione separino sempre la frazione non-biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile (in particolare per composti chimici super-lipofili, cioè quelli con un log $P_{oa} > 5$) (1) (5), i campioni non devono essere sottoposti a questi trattamenti.

Curare, invece, di mantenere le vasche più pulite possibile e controllare il contenuto di carbonio organico totale durante le fasi di assorbimento e depurazione.

Ad ogni campionamento rimuovere dalle camere di saggio un numero appropriato di pesci (normalmente almeno quattro). I pesci campionati vengono rapidamente risciacquati con acqua, «asciugati» per tamponamento, uccisi immediatamente con l'uso del metodo più appropriato e umano e poi pesati.

È preferibile analizzare il pesce e l'acqua immediatamente dopo il campionamento allo scopo di evitare degradazione o altre perdite e calcolare tassi approssimativi di assorbimento e depurazione nel corso del saggio. L'analisi immediata evita inoltre ritardi nella determinazione del raggiungimento di un livello costante.

▼B

In mancanza di analisi immediata, conservare i campioni mediante un metodo appropriato. Prima di iniziare lo studio procurarsi le informazioni sul metodo appropriato di conservazione per la particolare sostanza in esame — per esempio surgelazione, mantenimento a 4 °C, durata della conservazione, estrazione, ecc.

1.8.4.3. Qualità del metodo analitico

Poiché tutta la procedura è basata sostanzialmente sull'accuratezza, la precisione e la sensibilità del metodo analitico utilizzato per la sostanza in esame, controllare sperimentalmente che la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica, e che il recupero della sostanza in esame dall'acqua e dal pesce, siano soddisfacenti per quel particolare metodo. Inoltre, controllare che la sostanza in esame non sia rilevabile nell'acqua di diluizione usata.

Se necessario, correggere i valori di C_a e C_f ottenuti nel saggio per tener conto del livello di recupero e dei valori di fondo delle prove di controllo. Manipolare sempre i campioni di pesce e acqua in modo da minimizzare la contaminazione e le perdite (per esempio per assorbimento sul dispositivo di campionamento).

1.8.4.4. Analisi del campione di pesce

Se nel saggio vengono usati materiali radiomarcati, è possibile analizzare il radiomarcante totale (cioè progenitore e metaboliti), oppure i campioni possono venire depurati, così da poter analizzare il composto progenitore separatamente. Inoltre si possono caratterizzare i principali metaboliti allo stato stazionario, oppure al termine della fase di assorbimento se viene conclusa prima del raggiungimento dello stato stazionario. Se il BCF, in termini di residui radiomarcati totali, è ≥ 1 000 %, può essere consigliabile, e per alcune categorie di composti chimici come i pesticidi è fortemente raccomandato, identificare e quantificare i composti di degradazione che rappresentano ≥ 10 % dei residui totali nei tessuti del pesce allo stato stazionario. Se si identificano e quantificano i prodotti di degradazione che rappresentano ≥ 10 % dei residui radiomarcati totali nei tessuti del pesce, si raccomanda di identificarli e quantificarli anche nell'acqua di prova.

La concentrazione della sostanza in esame viene di solito determinata su ciascun singolo pesce pesato. Se ciò non è possibile, si possono raggruppare i campioni in occasione di ciascun campionamento, ma questo limita le procedure statistiche applicabili ai dati. Se si da importanza ad una specifica procedura statistica e alla sua potenza, nel saggio va incluso un numero di pesci adeguato per tener conto della procedura di raggruppamento e della potenza desiderate (6) (7).

Il BCF va espresso sia in funzione del peso umido totale che, per le sostanze fortemente lipofile, in funzione del contenuto di lipidi. Determinare se possibile il contenuto di lipidi nel pesce ad ogni campionamento. Per la determinazione del contenuto lipidico utilizzare metodi adatti (rif. 8 e 2 dell'allegato 3). Come metodo standard si può raccomandare la tecnica di estrazione con cloroformio/metanolo (9). I vari metodi non forniscono valori identici (10), per cui è importante indicare in dettaglio il metodo usato. Se possibile l'analisi dei lipidi deve essere effettuata sullo stesso estratto prodotto per l'analisi della sostanza in esame, perché i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica. La differenza del contenuto di lipidi del pesce (in mg/kg di peso umido) tra l'inizio e il termine dell'esperimento non deve essere superiore a ± 25 %. Registrare anche i solidi percentuali del tessuto per poter convertire la concentrazione lipidica da base umida a base secca.

▼B

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

La curva di assorbimento della sostanza in esame viene ottenuta riportando la sua concentrazione nel/sul pesce (o tessuti specificati) durante la fase di assorbimento contro il tempo su scale aritmetiche. Se la curva ha raggiunto un andamento costante, cioè è diventata approssimativamente asintotica all'asse del tempo, il BCF_{SS} allo stato stazionario si calcola da:

$$\frac{C_i \text{ stato stazionario (media)}}{C_w \text{ stato stazionario (media)}}$$

Quando non si raggiunge lo stato stazionario si può calcolare un BCF_{SS} di sufficiente precisione per una valutazione di rischio da uno «stato stazionario» all'80 % ($1{,}6/k_2$ o al 95 % ($3{,}0/k_2$ dell'equilibrio.

Determinare inoltre il fattore di concentrazione (BCF_k) come rapporto k_1/k_2, cioè delle due costanti cinetiche di primo ordine. La costante di velocità di depurazione (k_2) viene di solito determinata dalla curva di depurazione (cioè da una curva di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce contro il tempo). La costante di velocità di assorbimento (K_1) viene poi calcolata sulla base di k_2 e di un valore di C_f che si ottiene dalla curva di assorbimento (vedi anche allegato 5). Il metodo preferito per l'ottenimento del BCF_k e delle costanti di velocità k_1 e k_2 consiste nell'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer (11). Altrimenti, per calcolare k_1 e k_2 si possono usare metodi grafici. Se è evidente che la curva di depurazione non è di primo ordine, bisogna allora impiegare modelli più complessi (vedi bibliografia dell'allegato 3) con l'assistenza di un biostatistico.

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se le concentrazioni misurate delle soluzioni di prova sono prossime al limite di rivelazione del metodo analitico, i risultati devono essere interpretati con cautela.

Curve di assorbimento e di perdita chiaramente definite sono un'indicazione di buona qualità dei dati di bioconcentrazione. La variazione delle costanti di assorbimento/depurazione tra le due concentrazioni di prova deve essere minore del 20 %. Se si osservano differenze significative nelle velocità di assorbimento/depurazione tra le due concentrazioni di prova applicate, registrarle e fornire una possibile spiegazione. In genere, il limite di confidenza di BCF ottenuti da studi ben impostati è vicino al ± 20 %.

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

3.1. SOSTANZA DI PROVA

— natura fisica e, se del caso, proprietà chimico fisiche,

— dati di identificazione chimica (incluso, se opportuno, il contenuto di carbonio organico),

— se radiomarcata, la posizione precisa dell'atomo o degli atomi marcati e la percentuale di radioattività associata ad impurezze.

▼B

3.2. SPECIE USATA NEL SAGGIO

— nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, intervallo di dimensioni, ecc.

3.3. CONDIZIONI SPERIMENTALI

— procedura di saggio usata (per esempio a flusso continuo o semistatica),

— tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodo(i),

— impostazione della prova (per esempio numero e dimensioni delle camere di saggio, tasso di sostituzione del volume d'acqua, molteplicità dei campioni, numero di pesci per campione, numero delle concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e depurazione, frequenza di campionamento per i campioni di pesce e di acqua,

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (se usato, indicare l'agente solubilizzante, la sua concentrazione e il suo contributo al contenuto di carbonio organico dell'acqua),

— concentrazioni nominali nel saggio, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche di saggio, e metodo mediante cui sono stati ottenuti questi valori,

— fonte dell'acqua di diluizione, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati di eventuali dimostrazioni della capacità del pesce di saggio di vivere nell'acqua, e caratteristiche dell'acqua: pH, durezza, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli residui di cloro (se misurati), carbonio organico totale, solidi sospesi, salinità dell'ambiente di prova (se del caso) ed eventuali altre misure effettuate,

— qualità dell'acqua all'interno delle vasche di saggio, pH, durezza, TOC, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto,

— informazioni dettagliate sull'alimentazione (per esempio tipo di mangime, fonte, composizione — se possibile almeno il tenore lipidico e proteico, quantità somministrata e frequenza),

— informazioni sul trattamento dei campioni di pesce e d'acqua, inclusi dettagli di preparazione, conservazione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame e il contenuto di lipidi (se misurato).

3.4. RISULTATI

— risultati di eventuali studi preliminari eseguiti,

— mortalità dei pesci di controllo e dei pesci in ciascuna camera di esposizione ed eventuale, comportamento anomalo osservato,

— contenuto di lipidi del pesce (se determinato durante l'esecuzione delle prove),

— curve (con tutti i dati di misura) di assorbimento e di depurazione del composto chimico in esame nel pesce, tempo di raggiungimento dello stato stazionano,

▼B

— C_f e C_a (con deviazione standard e intervallo, se del caso) per tutti i momenti di campionamento [C_f espresso in µg/g di peso umido (ppm) del corpo intero o dei suoi tessuti specificati, per esempio lipidi, e C_a in µg/ml (ppm)]. Valori di C_a per la serie di controllo (riportare anche il valore di fondo),

— fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) e/o fattore di concentrazione cinetico (BCF_k) e, se del caso, limiti di confidenza al 95 % per le costanti di velocità di assorbimento e depurazione (perdita) (tutte espresse in relazione al corpo intero e al contenuto totale di lipidi, se misurato, dell'animale o di suoi tessuti specificati), limiti di confidenza e deviazione standard (se disponibili) e metodi di calcolo o analisi dei dati per ciascuna concentrazione della sostanza in esame usata,

— se vengono usate sostanze radio-marcate, e se richiesto, si può presentare l'accumulo di tutti i metaboliti rilevati,

— qualsiasi cosa insolita riguardo al saggio, eventuali deviazioni da queste procedure e qualsiasi altra informazione pertinente.

Minimizzare i risultati come «non rilevato a questo limite di rivelazione» mediante lo sviluppo pre-test del metodo e l'imposizione sperimentale, perché tali risultati non possono venire utilizzati per i calcoli delle costanti di velocità.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 1 17-1.56.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/'water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l) Analysis of Human or Animai Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in «The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation», Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

ALLEGATO 1

Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

	Sostanza	Concentrazione limite
1	Solidi sospesi	5 mg/l
2	Carbonio organico totale	2 mg/l
3	Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
4	Cloro residuo	10 µg/l
5	Pesticidi organofosforati totali	50 µg/l
6	Pesticidi organoclorurati totali più bifenili policlorurati	50 µg/l
7	Cloro organico totale	25 µg/l
8	Alluminio	1 µg/l
9	Arsenico	1 µg/l
10	Cromo	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Rame	1 µg/l
13	Ferro	1 µg/l
14	Piombo	1 µg/l
15	Nichel	1 µg/l
16	Zinco	1 µg/l
17	Cadmio	100 µg/l
18	Mercurio	100 µg/l
19	Argento	100 µg/l

▼B

ALLEGATO 2

Specie ittiche raccomandate per l'esecuzione del saggio

	Specie raccomandata	Intervallo di temperatura raccomandato per la prova (°C)	Lunghezza totale raccomandata dell' animale di prova (cm)
1	Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zebrato	20-25	3,0± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20-25	5,0± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpa comune	20-25	5,0± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck e Schlegel) Ricefish	20-25	4,0± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20-25	3,0± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20-25	5,0± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Trota iridea	13-17	8,0± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarello	18-20	3,0± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Rovai Society of London, Series B., Vol.252, p. 231.

Varie specie di estuario e marine sono in uso in differenti paesi, per esempio:

Corvina striata	Leiostomus xanthurus
Sheepshead minnow	Cyprinodon variegatus
Latterino	Menidia beryllina
Shiner perch	Cymatogaster aggregata
English sole	Parophrys vetulus
Staghorn sculpin	Leptocottus armatus
Spinarello	Gasterosteus aculeatus
Spigola	Dicentracus labrax
Alborella	Alburnus alburnus

Raccolta

I pesci d'acqua dolce suelencati sono facilmente allevabili e/o sono largamente disponibili per tutto l'anno, mentre la disponibilità delle specie marine e di estuario è parzialmente confinata ai rispettivi paesi. Possono riprodursi e venire allevati sia in stabilimenti di acquacoltura che in laboratorio, in condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di saggio siano sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

▼B

ALLEGATO 3

Previsione della durata delle fasi di assorbimento e depurazione

1. *Previsione della durata della fase di assorbimento*

Prima di eseguire il saggio, si può ricavare una stima di k_2 e quindi di una data percentuale del tempo occorrente per arrivare allo stato stazionario da relazioni empiriche tra k_2 e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (P_{oa}) o tra k_2 e la solubilità in acqua (s).

Una stima di k_2 (giorni^{-1}) si può ottenere per esempio dalla seguente relazione empirica (1):

$$\log_{10}k_2 = 0{,}414\ \log_{10}(P_{oa}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{[equazione 1]}$$

Per altre relazioni cfr. rif. (2).

Se il coefficiente di ripartizione (P_{oa}) non è noto, si può ricavare una stima (3) conoscendo la solubilità in acqua della sostanza da utilizzare:

$$\log_{10}(P_{oa}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{[equazione 2]}$$

in cui

s = solubilità (moli/1): (n = 36)

Queste relazioni valgono solo per composti chimici con valori di P_{oa} compresi tra 2 e 6,5 (4).

Il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può ricavare, applicando il valore stimato di k_2, dall'equazione cinetica generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

o, se C è costante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w\ (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[equazione 3]}$$

Approssimandosi allo stato stazionario, (t — ∞), l'equazione 3 può venire ridotta (5) (6) a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

C_w è allora k_1/k_2 . un'approssimazione della concentrazione nel pesce allo «stato stazionario» (C_{fs}).

L'equazione 3 può venire riscritta come:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ o } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[equazione 4]}$$

Applicando l'equazione 4, si può prevedere il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario quando k_2 sia stato pre-stimato con l'equazione 1 o 2.

▼B

Indicativamente, la durata statisticamente ottimale della fase di assorbimento per ottenere dati statisticamente accettabili (BCF_K) è il periodo necessario perché la cura del logaritmo della concentrazione della sostanza in esame nel pesce contro il tempo, su scala lineare raggiunga il suo punto medio, o $1,6/k_2$, o 80 % dello stato stazionario, ma non più di $3,0/k_2$ o 95 % dello stato stazionario (7).

Il tempo necessario per raggiungere l'80 % dello stato stazionario si ottiene da (equazione 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ o } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[equazione 5]}$$

Similmente, il 95 % dello stato stazionario si ottiene da:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[equazione 6]}$$

Per esempio, la durata dalla fase di assorbimento (as) per una sostanza in esame con log P_{oa} = 4 sarà (utilizzando le equazioni 1, 5, 6):

$\log_{10}k_2 = - 0,414.(4) + 1,47$ $\qquad$ $k_2 = 0,652$ giorni^{-1}

$t_{op} = t_{80} = 1,6/0,652$, cioè 2,45 giorni (59 ore)

o $t_{op} = t_{95} = 3,0/0,652$, cioè 4,60 giorni (110 ore)

Similmente, per una sostanza con s = 10^{-5} mol/l (log(s) = - 5,0), la durata dell'assorbimento sarà (utilizzando le equazioni 1, 2, 5, 6):

$\log_{10} (P_{oa}) = - 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10}k_2 = - 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246$ giorni^{-1}

$t_{op}^{=} t_{80}^{=} 1,6/0,246$, cioè 6,5 giorni (156 ore)

o $t_{op} = t_{95} = 3,0/0,246$, cioè 12,2 giorni (293 ore)

In alternativa, si può utilizzare l'espressione:

$t_{eq} = 6,54 \text{ x } 10^{-3} P_{oa} + 55,31$ (ore)

per calcolare il tempo necessario per raggiungere uno stato stazionario efficace (4).

2. *Previsione della durata della fase di depurazione*

Una previsione del tempo necessario per ridurre il carico sul corpo ad una certa percentuale della concentrazione iniziale si può ricavare anch'essa dall'equazione generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine) (1) (8).

Per la fase di depurazione, si assume che C_a sia zero. L'equazione si può ridurre a:

$$\frac{dC_f}{dt} = - k_2 C_f \text{ o } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

dove $C_{f,\,o}$ è la concentrazione all'inizio del periodo di depurazione. Una depurazione del 50 % verrà allora raggiunta al tempo (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ o } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Similmente, una depurazione del *95* % verrà raggiunta a:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Se per il primo periodo si usa un assorbimento dell'80 % (1,6/k,) e nella fase di depurazione si usa una perdita del 95 % ($3,0/k_2$), la fase di depurazione dura allora circa il doppio della fase di assorbimento.

È importante notare, tuttavia, che le stime sono basate sull'ipotesi che l'assorbimento e la depurazione seguano una cinetica di primo ordine. Se è ovvio che non viene seguita una cinetica di primo ordine, si devono impiegare modelli più complessi [per esempio rif (1)].

Bibliografia (dell'allegato 3**)**

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organic in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pagine 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ: Sci. Technol. 16 (1), pagine 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pagine 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pagine 785-792.

(6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, pagine 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd, N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng, 55, pagine 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pagine 3-19.

▼B

ALLEGATO 4

Esempio teorico di un programma di campionamento per saggi di bioconcentrazione di sostanze con log P_{oa} = 4

Campionamento del pesce	Programma di campionamento		Numero di campioni d'acqua	Numero di pesci per campione
	Frequenza minima richiesta (giorni)	Campionamento addizionale		
Fase di assorbimento	-1 0		2 (*) 2	immettere 45-80 pesci
1ª	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2ª	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3ª	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4ª	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5ª	4,7		2	6
Fase di depurazione				Trasferire il pesce in acqua esente dal composto chimico in esame
6ª	5,0	5,3		4 (4)
7ª	5,9	7,0		4 (4)
8ª	9,3	11,2		4 (4)
9ª	14,0	17,5		6 (4)

(*) Campionare l'acqua dopo l'erogazione di almeno tre «volumi di camera».

I valori tra parentesi sono il numero di campioni (acqua, pesce) da prelevare se si esegue un campionamento addizionale.

Nota: La stima preliminare di k_2 per log P_{ow} = 4,0 è di 0,652 giorni^{-1}. La durata totale dell'esperimento viene impostata su 3 × as = 3 × 4,6 giorni, cioè 14 giorni. Per la stima di «as» vedi allegato 3.

▼B

ALLEGATO 5

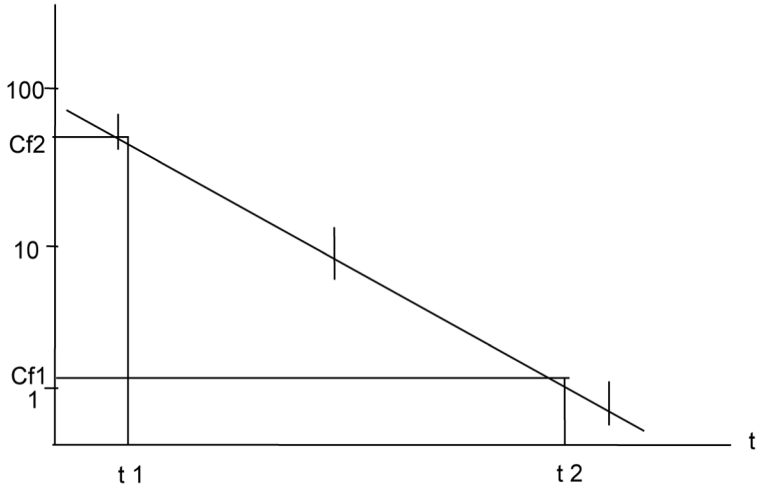
Differenziazione dei modelli

Si è supposto che la maggior parte dei dati di bioconcentrazione sia «ragionevolmente» ben descritta mediante un semplice modello a due compartimenti e due parametri, come indicato dalla curva rettilinea che approssima i punti delle concentrazioni nel pesce durante la fase di depurazione quando vengono tracciati su carta semilogaritmica (nel caso questi punti non possano essere descritti mediante una linea retta, impiegare modelli più complessi, cfr. per esempio Spacie and Hamelink, rif. 1 nell'allegato 3).

Metodo grafico per la determinazione della costante di velocità di depurazione (perdita) k_2

Tracciare la concentrazione della sostanza in esame trovata in ciascun campione di pesce contro il tempo su carta semilogaritmica. Il coefficiente angolare della linea è k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Si noti che le deviazioni dalla linea retta possono indicare uno schema di depurazione più complesso di una cinetica di primo ordine. Per risolvere i tipi di depurazione che deviano dalla cinetica di primo ordine si può applicare un metodo grafico.

Metodo grafico per la determinazione della costante di velocità di assorbimento k_t

Dato k_2 calcolare k_1 come segue:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[equazione 1]}$$

Il valore di C_f viene letto dal punto centrale del tratto piatto della curva di assorbimento ottenuta dai dati tracciando log concentrazione contro il tempo (su scala aritmetica).

▼B

Metodo per il calcolo su computer delle costanti di velocità di assorbimento e depurazione (perdita)

Il mezzo preferito per ottenere il fattore di bioconcentrazione e le costanti di velocità k_1 e k_2 prevede l'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer. Questi programmi trovano i valori di k_1 e k_2 data una serie di dati sequenziali di concentrazione contro il tempo e il modello:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[equazione 2]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{[equazione 3]}$$

in cui si ha t_e = tempo al termine della fase di assorbimento.

Questo approccio e stime della deviazione fornisce standard di k_1 e k_2.

Poiché k_2 nella maggior parte dei casi può venire stimato con una precisione relativamente elevata dalla curva di depurazione, e poiché vi è una forte correlazione tra i due parametri, k_1 e k_2 se vengono stimati simultaneamente, e può essere conveniente calcolare per primo k_2 dai soli dati di depurazione e successivamente k_1 dai dati di assorbimento utilizzando una regressione non lineare.

▼B

C.14. TEST SULLA CRESCITA DEI PESCI GIOVANI

1. METODO

Questo metodo di test di tossicità sulla crescita corrisponde al TG 215 (2000) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo test è valutare gli effetti dell'esposizione prolungata alle sostanze chimiche sulla crescita dei pesci giovani. Il test si basa su un metodo, sviluppato e sottoposto ad esercizi di intercalibrazione (ring test) (1) (3) all'interno dell'Unione europea, per valutare gli effetti delle sostanze chimiche sulla crescita di giovani di trota iridea (*Oncorynchus mykiss*) in condizioni di flusso continuo. È possibile utilizzare anche altre specie ben documentate. Per esempio, esistono esperienze di test sulla crescita con il danio zebrato (Danio rerio) ([1]) (2) (4) (5) e *Oryzias latipes* (6) (7) (8).

Cfr. anche Introduzione generale, parte C.

1.2. DEFINIZIONI

Minima concentrazione con effetto (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): è la più bassa concentrazione testata di una sostanza in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0{,}05$) rispetto alla sostanza di controllo. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quelli osservati alla LOEC.

Massima concentrazione senza effetto (No Observed Effect Concentration, NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

EC_x: in questo metodo di test è la concentrazione della sostanza in esame che provoca una variazione x % nel tasso di crescita dei pesci rispetto ai controlli.

Regime di carico: peso fresco dei pesci per volume di acqua.

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua.

Tasso di crescita specifico del singolo pesce: esprime il tasso di crescita di un individuo in base al suo peso iniziale.

Tasso di crescita specifico medio della vasca: esprime il tasso di crescita medio della popolazione di una vasca a una specifica concentrazione.

Tasso di crescita pseudo-specifico: esprime il tasso di crescita di un individuo rispetto al peso iniziale medio della popolazione della vasca.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI TEST

I pesci giovani in fase di crescita esponenziale vengono pesati e collocati in contenitori di prova e quindi esposti a un intervallo di concentrazioni subletali della sostanza in esame disciolta in acqua, preferibilmente in condizioni di flusso continuo o, ove non sia possibile, in adeguate condizioni semistatiche (statiche con rinnovo del medium). La durata del test è di 28 giorni. I pesci sono alimentati quotidianamente. La razione di cibo è basata sul peso iniziale dei pesci e può essere ricalcolata dopo 14 giorni. Al termine del test, i pesci vengono nuovamente pesati. Gli effetti sui tassi di crescita vengono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una variazione x % del tasso di crescita, cioè EC_X (ad esempio EC_{10}, EC_{20} o EC_{30}). In alternativa, è possibile paragonare i dati con valori di controllo per determinare la minima concentrazione con effetto (LOEC) e di conseguenza la concentrazione senza effetto (NOEC).

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Dovrebbero essere disponibili i risultati di un test di tossicità acuta (cfr. metodo C.1) eseguito preferibilmente sulle stesse specie scelte per il presente test. Occorre pertanto che siano note la solubilità in acqua e la tensione di vapore della sostanza in esame e che sia disponibile un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza nelle soluzioni di prova, di cui devono essere noti e riportati i dati relativi all'accuratezza e al limite di rivelabilità.

Le informazioni utili comprendono: formula di struttura, purezza della sostanza, stabilità in acqua e alla luce, pK_a, P_{ow}- e risultati di un test di biodegradabilità immediata (cfr. metodo C.4).

1.5. VALIDITÀ DEL TEST

Perché il test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità del/i controllo/i non deve superare il 10 % alla fine del test,

— il peso medio dei pesci di controllo deve essere aumentato a sufficienza da consentire di individuare la variazione minima del tasso di crescita considerata significativa. Un ring-test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, il peso medio dei pesci controlli deve essere aumentato, nei 28 giorni, di almeno la metà (50 %) del loro peso medio iniziale: ad esempio, peso iniziale:1 g/pesce (= 100 %), peso finale dopo 28 giorni: > 1,5 g/pesce (≥ 150 %),

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere rimasta almeno al 60 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata del test,

— la temperatura dell'acqua non deve mai differire di oltre ± 1 °C fra i diversi contenitori, né fra i vari giorni e dovrebbe essere mantenuta in un intervallo di 2 °C entro gli intervalli di temperatura specificati per la specie utilizzata (allegato 1).

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Apparecchiatura**

Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

— misuratori dell'ossigeno e del pH;

▼B

— attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;

— apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;

— vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. sezione 1.8.5 e appendice 1);

— bilancia sufficientemente precisa (precisione a ± 0,5 %).

1.6.2. **Acqua**

Per il test si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie in esame dimostra di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata del test. Il pH deve essere compreso entro 6,5 e 8,5, ma nel corso di un dato test deve essere compreso entro un intervallo di ± 0,5 unità di pH. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come $CaCO_3$). Per evitare effetti indesiderati dell'acqua di diluizione sui risultati del test (ad esempio per complessazione della sostanza in esame), ad intervalli si dovrebbero prelevare campioni e analizzarli. La misura dei metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), 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 è risultata costante per almeno un anno, le determinazioni possono essere effettuate con minore frequenza (ad esempio ogni sei mesi). Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'allegato 2.

1.6.3. **Soluzioni di prova**

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 di prova 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).

In alcuni casi può rendersi necessario l'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti) per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. A tale scopo si prestano, ad esempio, solventi quali acetone, eta-nolo, metanolo, dimetilsolfossido, dimetilformammide e glicole trietilenico o disperdenti quali Cremophor RH40. Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. Quando si impiegano agenti a rapida biodegradabilità, come l'acetone, e/o altamente volatili è necessario procedere con cautela, poiché potrebbero causare problemi nelle prove a flusso continuo dovuti a sviluppo batterico Eventuali agenti solubilizzanti non devono avere effetti significativi sulla crescita dei pesci, né effetti negativi visibili sui giovani; come deve risultare da un controllo con solo solvente.

▼B

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio una pompa dosatrice, un diluitore proporzionale, un sistema di saturazione) per fornire alle camere di prova una serie di concentrazioni. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione dovrebbero essere controllate a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non devono variare di oltre il 10 % per tutta la durata del test. Un ring-test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, è accettabile una rimozione dell'acqua, durante il test, di 6 litri/g di pesce/-die (cfr. sezione 1.8.2.2).

Per i test semistatici (con rinnovo), la frequenza di rinnovo del mezzo dipende dalla stabilità della sostanza in esame, ma si raccomanda di sostituire l'acqua quotidianamente. Se da test preliminari di stabilità (cfr. sezione 1.4) la concentrazione della sostanza in esame non risulta stabile (cioè è al di fuori dell' intervallo dell'80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante l'intervallo di tempo tra due rinnovi dell'acqua, occorre prendere in considerazione l'uso di un test a flusso continuo.

1.6.4. **Selezione della specie**

La trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) è la specie raccomandata per questo test, in quanto la maggior parte dell'esperienza deriva da ring-test effettuati su questa specie (1) (3). È però possibile utilizzare altre specie ben documentate, ma in questo caso potrebbe essere necessario adattare la procedura sperimentale per fornire condizioni sperimentali adeguate. Ad esempio, sono state fatte esperienze anche con il danio zebrato (*Danio rerio*) (4) (5) e l'*Oryzias latipes* (6) (7) (8). In questo caso occorre motivare la scelta della specie e descrivere dettagliatamente il metodo sperimentale.

1.6.5. **Mantenimento dei pesci**

I pesci vanno selezionati da una popolazione di un solo stock, preferibilmente dalla stessa nidiata che sia stata mantenuta in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate nel test per almeno due settimane prima della sperimentazione. Essi vanno alimentati con una razione minima quotidiana pari al 2 % del peso corporeo (razione quotidiana ideale = 4 % del peso corporeo) per tutto il periodo di mantenimento e durante il test.

Dopo un periodo di acclimatazione di 48 h si registra la mortalità e si applicano i seguenti criteri:

— mortalità di oltre il 10 % della popolazione in sette giorni: respingere l'intero lotto,

— 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.

Durante le due settimane precedenti il test e durante il test ai pesci non vanno somministrate sostanze terapeutiche.

▼B

1.7. DISEGNO SPERIMENTALE

Il «disegno sperimentale» comprende la selezione del numero delle concentrazioni di prova, e dell'intervallo fra esse, il numero di vasche per ciascun livello di concentrazione e il numero di pesci per vasca. Idealmente, il disegno sperimentale dovrebbe essere scelto tenendo conto dei seguenti aspetti:

— obiettivo dello studio;

— metodo di analisi statistica che verrà impiegato;

— disponibilità e costo delle risorse sperimentali.

Nel dichiarare l'obiettivo occorre possibilmente specificare il potere statistico a cui occorre rilevare una data differenza (ad esempio nel tasso di crescita) o, alternativamente, la precisione con cui occorre stimare la EC_X (ad esempio con x = 10, 20 o 30, comunque di preferenza non meno di 10). In assenza di questi dati è impossibile dare indicazioni precise sulle dimensioni dello studio.

È importante riconoscere che un disegno che risulta ottimale (ovvero utilizza al meglio le risorse) per un dato metodo di analisi statistica non è necessariamente ottimale per un altro metodo. Il disegno raccomandato per la stima della LOEC/NOEC non sarebbe pertanto lo stesso raccomandato per l'analisi con la regressione.

Nella maggior parte dei casi l'analisi di regressione è preferibile all'analisi della varianza per i motivi discussi da Stephan e Rogers (9). Comunque, qualora non si trovi un modello di regressione adeguato ($r^2 < 0,9$), si dovrebbe utilizzare la NOEC/LOEC.

1.7.1. **Disegno per l'analisi con la regressione**

Nel definire il disegno sperimentale di un test cui applicare l'analisi di regressione occorre considerare quanto segue:

— la concentrazione con effetto (ad esempio $EC_{10,20,30}$) e l'intervallo di concentrazioni a cui interessa l'effetto della sostanza in esame dovrebbero necessariamente essere compresi dalle concentrazioni incluse nel test. La precisione con cui si possono stimare le concentrazioni con effetto sarà maggiore quando la concentrazione con effetto è al centro dell'intervallo di concentrazioni da testare. Un test preliminare di ricerca dell'intervallo può risultare utile per selezionare le concentrazioni di prova più adeguate;

— per consentire l'intervallo di un modello statistico soddisfacente il test dovrebbe comprendere almeno una vasca di controllo e cinque vasche ulteriori a concentrazioni diverse fra loro. Se del caso, quando si utilizza un agente solubilizzante, occorre predisporre un controllo contenente l'agente solubilizzante alla più alta concentrazione utilizzata, oltre alla serie prevista dal test (cfr. sezioni 1.8.3 e 1.8.4);

— è possibile usare una serie geometrica adeguata allo scopo o una serie logaritmica (10) (cfr. allegato 3). E preferibile un intervallo logaritmico fra le concentrazioni sperimentali;

▼B

— se sono disponibili più di sei vasche, le vasche in eccedenza dovrebbero essere utilizzate come repliche o distribuite per tutto il intervallo di concentrazioni per ridurre gli intervalli tra le concentrazioni. Entrambi i metodi sono ugualmente accettabili.

1.7.2. **Disegno per la stima di una NOEC/LOEC mediante analisi della varianza (ANOVA)**

È preferibile che vi siano vasche di replica per ciascuna concentrazione e l'analisi statistica dovrebbe essere fatta a livello di vasca (11). La mancanza di vasche di replica non consente di tener conto della variabilità fra le vasche al di là di quella dovuta ai singoli pesci. Tuttavia, l'esperienza (12) ha dimostrato che, nel caso esaminato, la variabilità fra le vasche era molto bassa rispetto alla variabilità all'interno della vasca (ovvero fra i pesci). Pertanto un'alternativa relativamente accettabile è quella di effettuare l'analisi statistica a livello dei singoli pesci.

Di norma si utilizzano almeno cinque concentrazioni sperimentali in una serie geometrica con un fattore preferibilmente non superiore a 3,2.

Generalmente, quando si eseguono test con repliche, il numero di vasche di replica nel controllo e pertanto il numero di pesci dovrebbe corrispondere al doppio del numero in ciascuna delle concentrazioni sperimentali, che dovrebbero essere di dimensioni uguali (13) (14) (15). Per contro, in mancanza di repliche il numero di pesci nel gruppo di controllo dovrebbe essere uguale a quello in ciascuna concentrazione sperimentale.

Se l'ANOVA deve essere basata sulle vasche invece che sui singoli pesci [cosa che comporterebbe la marcatura individuale dei pesci o l'uso dei tassi di crescita «pseudo» specifici (cfr. sezione 2.1.2)], il numero di vasche di replica deve essere sufficiente per consentire la determinazione della deviazione standard delle «vasche all'interno delle concentrazioni». Ciò significa che i gradi di libertà dell'errore nell'analisi della varianza sono almeno 5 (11). Replicando solo i controlli si rischia di influenzare la variabilità dell'errore poiché essa può aumentare con il valore medio del tasso di crescita in questione. Poiché è probabile che il tasso di crescita diminuisca con l'aumentare della concentrazione, ciò tenderà a portare a una sovrastima della variabilità.

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Selezione e pesatura dei pesci da sottoporre al test**

È importante ridurre a! minimo la differenza di peso tra i pesci all'inizio del test. L'appendice 1 fornisce gli intervalli adeguati di misura per le diverse specie raccomandate per questo test. Per l'intero lotto di pesci utilizzato nel test, la differenza di peso tra i singoli individui all'inizio del test dovrebbe essere idealmente mantenuta entro ± 10 % del peso medio aritmetico e, in ogni caso, non deve superare il 25 %. Si raccomanda di pesare un sottocampione di pesci prima del test per stimare il peso medio.

▼B

La popolazione dello stock non va nutrita per 24 ore prima dell'inizio del test. Successivamente, i pesci vanno scelti in maniera casuale. Utilizzando un anestetico generale [ad esempio con una soluzione acquosa di 100 mg/l di metilsolfonato di tricaina (MS 222) neutralizzato con l'aggiunta di due parti di bicarbonato di sodio per parte di MS 222], occorre pesare individualmente i pesci asciugati per tamponamento come peso fresco alla precisione indicata nell'allegato 1. I pesci con pesi entro il intervallo desiderato vanno tenuti e quindi distribuiti a caso tra le vasche sperimentali. È necessario registrare il peso fresco totale dei pesci in ciascuna vasca sperimentale. L'impiego di anestetici e la manipolazione dei pesci (compresi l'asciugatura e la pesatura) possono provocare stress e lesioni nei pesci giovani, in particolare nelle specie di piccola taglia. I pesci giovani vanno pertanto maneggiati con la massima cura per evitare di stressare e danneggiare gli animali sperimentali.

I pesci vanno nuovamente pesati il giorno 28 del test (cfr. sezione 1.8.6). Se tuttavia si ritiene necessario ricalcolare la razione di cibo, i pesci possono essere pesati anche il giorno 14 del test (cfr. sezione 1.8.2.3). Per determinare i cambiamenti di dimensione dei pesci, su cui basarsi per adeguare le razioni di cibo, si possono utilizzare metodi diversi come quello fotografico.

1.8.2. **Condizioni di esposizione**

1.8.2.1. *Durata*

La durata del test è di ≥ 28 giorni.

1.8.2.2. *Regimi di carico e densità della popolazione*

È importante che il regime di carico e la densità della popolazione siano adeguate per la specie usata nel test (cfr. allegato 1). Se la densità della popolazione è eccessivamente alta, si verificherà uno stress da sovraffollamento, con conseguente diminuzione dei tassi di crescita e, verosimilmente, sviluppo di malattie. Se è eccessivamente bassa, è possibile che si induca un comportamento territoriale passibile di influenzare anche la crescita degli individui. In ogni caso il regime di carico dovrebbe essere sufficientemente basso da consentire di mantenere, senza areazione, una concentrazione di ossigeno disciolto pari ad almeno il 60 % del valore di saturazione in aria. Un ring test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, è accettabile un regime di carico di 16 trote di 3-5 g in un volume di 40 litri. La frequenza raccomandata di rimozione dell'acqua durante il test è di 6 litri/g di pesce/die.

1.8.2.3. *Alimentazione*

I pesci vanno nutriti con cibo adatto (allegato 1) in quantità sufficiente da indurre un tasso di crescita accettabile. Occorre evitare la crescita microbica e l'intorbidimento dell'acqua. Per la trota iridea una quantità quotidiana pari al 4 % del peso corporeo dovrebbe soddisfare queste condizioni (3) (16) (17) (18). La razione quotidiana può essere suddivisa in due porzioni uguali e offerta ai pesci in due pasti al giorno, a distanza di almeno 5 ore l'uno dall'altro. La razione si basa sul peso totale iniziale dei pesci per ciascuna vasca sperimentale. Se i pesci vengono pesati anche il giorno 14. la razione viene ricalcolata. Nelle 24 ore precedenti alla pesatura i pesci non dovrebbero essere nutriti.

▼B

Il cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche sperimentali ogni giorno, pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un aspiratore.

1.8.2.4. *Luce e temperatura*

Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (allegato 1).

1.8.3. **Concentrazioni sperimentali**

Normalmente occorrono cinque concentrazioni della sostanza in esame, a prescindere dal disegno sperimentale scelto (cfr. sezione l.7.2). La conoscenza preliminare della tossicità della sostanza in esame (ad esempio mediante un test di tossicità acuta e/o uno studio di ricerca dell'intervallo di tossicità) dovrebbe essere d'aiuto nella selezione delle opportune concentrazioni sperimentali Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre spiegarne il motivo. La più alta concentrazione utilizzata nel test non deve superare il limite di solubilità in acqua della sostanza.

Se nella preparazione delle soluzioni madre si utilizza un agente solubilizzante, la sua concentrazione finale non deve superare 0,1 ml/l e, di preferenza, essere uguale in tutte le vasche (cfr. sezione 1.6.3). L'uso di tali materiali dovrebbe comunque essere evitato il più possibile.

1.8.4. **Controlli**

Il numero di controlli dell'acqua di diluizione dipende dal disegno sperimentale (cfr. sezioni 1.7-1.7.2). Se si utilizza un agente solubilizzante, il numero di controlli dell'agente solubilizzante deve corrispondere a quello dei controlli dell'acqua di diluizione.

1.8.5. **Frequenza delle determinazioni analitiche e delle misure**

Durante il test vanno determinate a intervalli regolari le concentrazioni della sostanza in esame (cfr. sotto).

Nei test a flusso continuo le portate del diluente e della soluzione madre della sostanza tossica dovrebbero essere controllati a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non dovrebbero variare di oltre il 10 % per tutta la durata del test. Quando si suppone che le concentrazioni della sostanza in esame siano entro ± 20 % dei valori nominali (cioè entro l'intervallo 80-120 %; cfr. sezioni 1.6.2 e 1.6.3), si raccomanda di analizzare, come minimo, la concentrazione minima e massima all'inizio del test e, successivamente, a intervalli settimanali. Per i test in cui non si ritiene che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali (sulla base dei dati di stabilità relativi alla sostanza in esame), è necessario analizzare tutte le concentrazioni sperimentali, ma seguendo lo stesso regime.

Nei test semistatici (con rinnovo) in cui si suppone che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali, si raccomanda di analizzare, come minimo, la concentrazione minima e massima appena preparate e subito prima del rinnovo, all'inizio dello studio e, successivamente, ogni settimana. Per i test in cui non si ritiene che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali, si devono analizzare tutte le concentrazioni sperimentali seguendo lo stesso regime adottato per le sostanze più stabili.

▼B

Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Se tuttavia vi sono prove che dimostrino che la concentrazione della sostanza in esame in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione iniziale nominale o misurata per tutta la durata del test, allora i risultati possono essere basati sui valori nominali o misurati.

Qualora si rendesse necessario filtrare (ad esempio con pori di 0,45 μm) o centrifugare i campioni, la centrifugazione è la procedura raccomandata. Comunque, se il materiale da testare non assorbe ai filtri, può essere accettabile anche la filtrazione.

Durante il test l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura dovrebbero essere misurati in tutte le vasche sperimentali. La durezza totale, l'alcalinità e la salinità (se del caso) vanno misurate nei controlli e in una vasca alla concentrazione massima. L'ossigeno disciolto e, eventualmente la salinità, vanno misurati almeno tre volte (all'inizio, verso la metà e alla fine del test). Nei testi semistatici si raccomanda di misurare l'ossigeno disciolto con maggiore frequenza, preferibilmente prima e dopo ogni rinnovo dell'acqua o almeno una volta alla settimana. Il pH dovrebbe essere misurato all'inizio e alla fine di ogni rinnovo dell'acqua nei test semistatici e almeno una volta alla settimana nei test a flusso continuo. La durezza e l'alcalinità vanno misurate una sola volta per ciascun test. È auspicabile che la temperatura sia controllata continuamente in almeno in una vasca sperimentale.

1.8.6. **Osservazioni**

Peso: alla fine del test tutti i pesci sopravvissuti devono essere pesati come peso fresco dopo essere stati asciugati per tamponamento o in gruppo per ogni vasca sperimentale o singolarmente. La pesatura degli animali per vasca è preferibile a quella dei singoli individui, poiché evita di marcare i pesci uno per uno. Nel caso della misura individuale per la determinazione del tasso di crescita specifico di ogni singolo pesce, la tecnica di marcatura selezionata non deve causare stress agli animali (possono risultare adatte delle alternative alla marcatura per congelamento come ad esempio l'uso di una sottile lenza da pesca colorata).

I pesci dovrebbero essere esaminati ogni giorno durante il periodo di test ed eventuali anomalie esterne (quali emorragie, scoloramento) o comportamenti anomali dovrebbero essere registrati. Eventuali casi di mortalità vanno registrati e i pesci morti devono essere rimossi appena possibile. Questi non vanno sostituiti, in quanto il regime di carico e la densità della popolazione sono sufficienti per evitare effetti sulla crescita dovuti al cambiamento del numero di pesci per vasca. Sarà invece necessario adeguare la quantità di cibo somministrata.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si raccomanda di ricorrere ad uno statistico sia per la concezione del disegno sperimentale che per l'analisi statistica dei risultati del test, in quanto il metodo consente considerevoli variazioni, ad esempio nel numero di vasche e di concentrazioni di prova, nel numero dei pesci e così via. Viste le diverse opzioni di disegno sperimentale, in questa sede non si forniscono indicazioni specifiche sulle procedure statistiche.

▼B

Non vanno calcolati i tassi di crescita per le vasche in cui la mortalità supera il 10 %. Il tasso di mortalità dovrebbe però essere indicato per tutte le concentrazioni di prova.

Qualsiasi metodo venga utilizzato per l'analisi dei dati, il concetto centrale è il tasso di crescita specifico r fra il tempo t_1 e il tempo t_2. Esso può essere definito in vari modi, a seconda che i pesci siano marcati individualmente o meno, o che sia richiesta una media della vasca.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

dove,

r_1 = tasso di crescita specifico del singolo pesce

r_2 = tasso di crescita specifico medio della vasca

r_3 = tasso di crescita «pseudo» specifico

w_1, w_2 = pesi di un particolare pesce rispettivamente ai tempi t_1 e t_2

$\log_e w_1$ = logaritmo del peso di un singolo pesce all'inizio del periodo di studio

$\log_e w_2$ = logaritmo del peso di un singolo pesce alla fine del periodo di studio

$\log_e W_1$ = media dei logaritmi dei valori w_1 per i pesci nella vasca all'inizio del periodo di studio

$\log_e W_2$ = media dei logaritmi dei valori w_2 per i pesci nella vasca alla fine del periodo di studio

t_1, t_2 = tempo (giorni) all'inizio e alla fine del periodo di studio

r_1, r_2, r_3 possono essere calcolati per il periodo compreso fra i giorni 0 e 28 ed eventualmente (cioè quando è stata effettuata la misurazione al giorno 14) per i periodi fra i giorni 0 e 14 e 14 e 28.

2.1.1. **Analisi dei risultati con la regressione (modello concentrazione-risposta)**

Questo metodo di analisi trova una relazione matematica adeguata fra il tasso di crescita specifico e la concentrazione. e dunque consente la stima della «EC_X», ovvero qualsiasi valore di EC richiesto. Con questo metodo non è necessario calcolare r per ogni singolo pesce (r_1): l'analisi può invece essere basata sul valore di r medio per la vasca (r_2). Quest'ultimo metodo è preferibile, nonché più adatto nel caso si utilizzino le specie più piccole.

I tassi di crescita specifici medi per la vasca (r_2) dovrebbero essere riportati in grafico contro la concentrazione, allo scopo di esaminare la relazione concentrazione-risposta.

▼B

Per esprimere la relazione fra r_2 e la concentrazione occorre scegliere un modello adatto e la sua scelta deve essere sostenuta da opportune considerazioni.

Se il numero dei pesci sopravvissuti varia di vasca in vasca, il processo di adattamento del modello ai punti sperimentali (fitting) che sia semplice o non lineare, dovrebbe essere pesato per tenere conto delle diverse dimensioni dei gruppi.

Il metodo di adattamento del modello deve permettere di ricavare una stima, ad esempio, della EC_{20} e della sua dispersione (errore standard o intervallo di confidenza). Il grafico del modello trovato va presentato in relazione ai dati in modo tale da mostrare l'adeguatezza dell'adattamento (fit) del modello (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analisi dei risultati per la stima della LOEC**

Se il test prevedeva repliche a tutti i livelli di concentrazione, la stima della LOEC può essere basata su un'analisi della varianza (ANOVA) del tasso di crescita specifico medio della vasca (cfr. sezione 2.1), seguita da un metodo adeguato [ad esempio il test di Dunnett o di Williams (13) (14) (15) (22)] di confronto tra l'r media per ciascuna concentrazione con l'r media per i controlli, allo scopo di identificare la concentrazione più bassa alla quale tale differenza risulti significativa a un livello di probabilità dello 0,05. Se non vengono soddisfatte le assunzioni richieste per i metodi parametrici — distribuzione non normale (ad esempio al test di Shapiro-Wilk) o varianza eterogenea (al test di Bartlett) —, potrebbe essere necessario trasformare i dati per rendere omogenee le varianze prima di eseguire l'ANOVA oppure effettuare un'ANOVA ponderata.

Se il test non comprendeva repliche a ciascuna concentrazione, un'ANOVA basata sulle vasche non sarà sensibile o risulterà impossibile. In tal caso un compromesso accettabile è quello di basare l'ANOVA sul tasso di crescita «pseudo» specifico r_3 dei singoli pesci.

L'r_3 medio di ciascuna concentrazione sperimentale può quindi essere paragonato con l'r_3 medio dei controlli. La LOEC può quindi essere identificata come in precedenza. Va detto che questo metodo non consente di tenere conto della variabilità fra le vasche, (né di salvaguardarsi da essa) ma solo di quella dovuta alla variabilità esistente fra i singoli pesci. Tuttavia, l'esperienza ha dimostrato (9) che la variabilità fra le vasche era molto piccola rispetto alla variabilità all'interno della vasca (cioè fra i pesci). Se nell'analisi non sono compresi i singoli pesci, occorre indicare il metodo di identificazione dei valori anomali e giustificarne l'utilizzo.

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui nelle soluzioni di prova si misurino concentrazioni di sostanze tossiche a livelli vicini al limite di rivelabilità del metodo analitico o, nei test semistatici, quando la concentrazione della sostanza in esame prima del rinnovo risulta diminuita rispetto alla soluzione appena preparata.

2.3. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

▼B

2.3.1. **Sostanza in esame:**

— natura fisica e proprietà chimico-fisiche rilevanti,

— dati chimici di identificazione, compresi purezza e metodo analitico per la quantificazione della sostanza in esame, se del caso.

2.3.2. **Specie utilizzata:**

— nome scientifico, se possibile,

— ceppo, dimensioni, fornitore, eventuali pretrattamenti, ecc.

2.3.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— procedura sperimentale utilizzata (ad esempio semistatica con rinnovo, a flusso continuo, carico, densità della popolazione, ecc.),

— disegno sperimentale (ad esempio numero di vasche, concentrazioni e repliche, numero di pesci per vasca),

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (l'agente solubilizzante, se usato, va indicato insieme alla sua concentrazione),

— concentrazioni sperimentali nominali, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche sperimentali nonché metodo con cui sono state calcolate e dimostrazione che le misure si riferiscono alle concentrazioni della sostanza in esame in soluzione vera,

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, alcalinità, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale, solidi in sospensione, salinità del mezzo di prova (se misurata) ed eventuali altre misurazioni effettuate,

— qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, durezza, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto,

— informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo/i di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

2.3.4. **Risultati:**

— dimostrazione che i controlli soddisfino i criteri di validità per la sopravvivenza, nonché dati sulla eventuale mortalità in tutte le concentrazioni sperimentali,

— tecniche di analisi statistica utilizzate, statistica basata sulle repliche o sui pesci, trattamento dei dati e giustificazione delle tecniche usate,

— dati tabulati sui pesi individuali e medi dei pesci nei giorni 0,14 (se misurati) e 28, valori dei tassi di crescita medi per vasca o pseudo specifici (a seconda del caso) per i periodi da 0 a 28 giorni o eventualmente da 0 a 14 e da 14 a 28,

— risultati dell'analisi statistica (analisi di regressione o ANOVA) preferibilmente mostrati in tabelle e grafici, nonché la LOEC ($p = 0,05$) e la NOEC o EC_x con gli errori standard, se possibile, a seconda dei casi,

▼B

— incidenza delle eventuali reazioni anomale da parte dei pesci e di eventuali effetti visibili indotti dalla sostanza in esame.

3. BIBLIOGRAFIA

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio rerio),* a model System in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (198 5). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14. pp. 1855-1870.

(5) Nagel R.. Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M, Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio* reno): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto. Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio. Japan.

(7) Holcombe, G. \V., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the japanese medaka (Oryzias *latipes).* Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28. pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A.. Holcombe, G. W. and Spehar. R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with japanese medaka (O*ryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmoni Conservation and Protection, Ontano, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

▼B

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

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

(16) Johnston, W. L, Atkinson, J. L, Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, O*ncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake. R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhvnchus mvkiss.* Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M, Cooney, J. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

ALLEGATO 1

SPECIE DI PESCI RACCOMANDATE PER IL TEST E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADEGUATE

Specie	Intervallo di temperatura raccomandalo (°C)	Fotoperiodo (ore)	Intervallo raccomandato per il peso iniziale dei pesci (g)	Precisione della misura richiesta	Regime di carico (g/l)	Densità della popolazione (per litro)	Cibo	Durata de! test (giorni)
Specie raccomandate:								
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	12,5-16,0	12-16	1-5	Ai 100 mg più vicini	1,2-2,0	4	Cibo secco commerciale per avan-notti di salmonidi	≥ 28
Altre specie ben documentate:								
Danio rerio Danio zebrato	21-25	12-16	0,050-0,100	All'1 mg più vicino	0,2-1,0	5-10	Cibo vivo (Brachionus Artemia)	≥ 28
Oryzias latipes	21-25	12-16	0,050-0,100	All'1 mg più vicino	0,2-1,0	5-20	Cibo vivo (Brachionus Anemia)	≥ 28

2008R0440 — IT — 22.03.2014 — 004.001 — 1018

▼B

ALLEGATO 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

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

▼B

APPENDICE 3

Serie logaritmiche di concentrazioni adatte per i test di tossicità (9)

Colonna (numero di concentrazioni fra 100 e 10 o fra 10 e 1([1])						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

([1]) Da ciascuna colonna è possibile scegliere una serie di cinque (o più) concentrazioni .successive. I punti intermedi fra le concentrazioni nella colonna (x) si trovano nella colonna (2x + 1). I valori elencati possono rappresentare le concentrazioni espresse come percentuale per volume o peso (mg/1 o ug/1). I valori possono essere moltiplicati o divisi per qualsiasi potenza di 10 a seconda del caso. È possibile usare la colonna 1 in caso di notevoli incertezze sul livello di tossicità.

▼B

C.15. PESCI, PROVA DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONI E DI LARVA CON SACCO VITELLINO

1. METODO

Questo metodo di prova della tossicità a breve termine corrisponde al TG 212 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questa prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino di pesci è una prova a breve termine in cui vengono esposti i pesci negli stadi che vanno dall'uovo appena fertilizzato alla fine dello stadio di larve con sacco vitellino. La prova sugli embrioni e sulle larve con sacco vitellino non prevede alcun tipo di alimentazione e va pertanto conclusa mentre le larve con sacco vitellino sono ancora nutrite dal sacco vitellino.

L'obiettivo della prova è definire gli effetti letali e, limitatamente, subletali di sostanze chimiche sugli specifici stadi vitali e specie sottoposti alla prova. Questa prova è in grado di fornire informazioni utili in quanto: a) può fare da nesso fra le prove letali e subletali; b) può essere utilizzata come prova di screening in una «prova completa su stadi di vita precoci» per una prova di tossicità cronica e c) può essere usata per saggiare specie per le quali le tecniche di allevamento non sono sufficientemente avanzate per coprire il periodo di transizione dall'alimentazione endogena a quella esogena.

È necessario ricordare che, in generale, solo le prove che comprendono tutti gli stadi del ciclo vitale dei pesci sono in grado di fornire una stima accurata della tossicità cronica delle sostanze chimiche nei confronti dei pesci e che eventuali riduzioni dell'esposizione in funzione dei diversi stadi di vita possono diminuire la sensibilità della prova e quindi sottovalutare la tossicità cronica. Si ritiene pertanto che la prova sugli embrioni e su larve con sacco vitellino sia meno sensibile di una «prova completa su stadi di vita precoci», soprattutto rispetto a sostanze chimiche altamente lipofile (log P_{OW} > 4) e a sostanze chimiche con un meccanismo di azione tossica specifico. Comunque, si prevede che per sostanze chimiche con un modo di azione narcotico non specifico le differenze di sensibilità fra le due prove siano minori (1).

Prima della sua pubblicazione la presente prova sugli embrioni e su larve con sacco vitellino è stata per la maggior parte condotta sul pesce d'acqua dolce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — nome comune: danio zebrato). Per questo motivo l'appendice 1 contiene indicazioni più dettagliate sull'esecuzione della prova su questa specie, ma ciò non impedisce di utilizzare altre specie con le quali sono già state fatte esperienze (tabelle 1A e 1B).

1.2. DEFINIZIONI

Minima concentrazione con effetti significativi (Lowest observed effect concentration, LOEC): è la più bassa concentrazione saggiata di una sostanza di prova alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato alla LOEC.

Massima concentrazione senza effetti significativi (No observed effect concentration, NOEC): è la concentrazione di prova immediatamente inferiore alle LOEC.

▼B

1.3. PRINCIPIO DELLA PROVA

Gli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino vengono esposti a un intervallo di concentrazioni della sostanza di prova disciolta in acqua. Il protocollo consente di optare per una procedura semistatica o per una a flusso continuo in funzione della natura della sostanza in esame. La prova inizia con la collocazione delle uova fecondate in contenitori di prova e termina subito prima che il sacco vitellino di una qualsiasi delle larve in una delle camere di prova sia completamente assorbito, o prima che i controlli inizino a morire per mancanza di cibo. Gli effetti letali e subletali vengono valutati e confrontati con i valori relativi ai controlli allo scopo di determinare la minima concentrazione alla quale si osservano effetti significativi (LOEC) e di conseguenza la concentrazione senza effetti significativi (NOEC). In alternativa, è possibile valutare gli effetti tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione capace di causare una determinata percentuale di effetto (cioè LC/ECx, dove x è una % di effetto definita).

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Dovrebbero essere disponibili i risultati di una prova di tossicità acuta (cfr. metodo C.1) eseguita preferibilmente sulla stessa specie scelta per la presente prova. I risultati possono essere utili per scegliere un intervallo adeguato di concentrazioni di prova nella prova sugli stadi di vita precoci. Occorre conoscere i valori relativi alla solubilità in acqua (compresa la solubilità nell'acqua utilizzata per la prova) e alla tensione di vapore della sostanza di prova. Occorre inoltre disporre di un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza nelle soluzioni di prova, di cui devono essere noti e riportati i dati relativi all'accuratezza e al limite di rivelabilità.

Le informazioni sulla sostanza in esame utili per definire le condizioni di esecuzione della prova sono: formula di struttura, purezza della sostanza, fotostabilità, stabilità nelle condizioni di esecuzione della prova, pKa, P_{OW}. e risultati di una prova di biodegradabilità immediata (cfr. metodo C.4).

1.5. VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché una prova sia valida devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la sopravvivenza complessiva delle uova fecondate nei controlli e, se del caso, nei contenitori con solo solvente, deve essere superiore o uguale ai valori definiti nelle appendici 2 e 3,

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere compresa fra il 60 e il 100 % del valore di saturazione nell'aria per tutta la durata della prova,

— la temperatura dell'acqua non deve mai differire di oltre ± 1,5 °C fra le diverse camere di prova, né fra i vari giorni, e dovrebbe restare negli intervalli di temperatura indicata per le specie utilizzate nella prova (appendici 2 e 3).

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.6.1. **Contenitori di prova**

Si può utilizzare qualsiasi tipo di recipiente in vetro o in altro materiale chimicamente inerte. Le dimensioni dei recipienti devono essere proporzionate al regime di carico (cfr. sezione 1.7.1.2). Si raccomanda di randomizzare la collocazione delle camere di prova nella zona della prova. Se nel laboratorio sussistono effetti sistematici controllabili tramite separazione per blocchi, è preferibile utilizzare un disegno sperimentale a blocchi randomizzati in cui ciascun trattamento è presente in ciascun blocco, piuttosto che un disegno completamente randomizzato. Se si opta per il disegno sperimentale a blocchi, occorre tenerne conto anche in sede di analisi dei dati. Le camere di prova devono essere protette da eventuali disturbi.

1.6.2. **Selezione della specie ittica**

Le specie ittiche raccomandate sono elencate nella tabella 1A. Ciò non preclude l'uso di altre specie (cfr. esempi nella tabella 1B), ma in questo caso potrebbe essere necessario adattare la procedura sperimentale per ottenere adeguate condizioni di esecuzione della prova. In tal caso occorre spiegare i criteri di scelta delle specie e del metodo sperimentale.

1.6.3. **Mantenimento dei pesci riproduttori**

Per informazioni dettagliate su come mantenere i pesci riproduttori in condizioni soddisfacenti, si rimanda al TG 210 dell'OCSE ([1]) e ai riferimenti bibliografici (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Manipolazione di embrioni e larve**

All'interno del contenitore principale gli embrioni e le larve possono essere esposti in recipienti più piccoli forniti di rete ai lati o alle estremità per consentire il flusso della soluzione di prova attraverso il recipiente. Si può indurre un flusso non turbolento in questi recipienti più piccoli sospendendoli a un braccio sistemato in modo che muova il recipiente verticalmente, mantenendo però sempre sommersi gli organismi: è possibile usare anche un sistema di flusso a sifone. Le uova fecondate dei pesci salmonidi possono essere sistemate su rastrelliere o reti con aperture sufficientemente grandi da permettere alle larve di cadere fuori dopo la schiusa delle uova. Per rimuovere gli embrioni e le larve nella prova semistatica con rinnovo quotidiano completo dell'acqua sono adatte pipette Pasteur (cfr. 1.6.6).

I contenitori, le griglie o le reti eventualmente utilizzati per tenere le uova all'interno della vasca principale vanno rimossi, in quanto ostacoli, dopo la schiusa delle larve ([81]): le reti vanno invece lasciate per evitare la fuga dei pesci. Dovendo trasferire le larve, queste non dovrebbero essere esposte all'aria e per rilasciare i pesci dai contenitori per le uova non si devono usare retini (questa precauzione può essere superflua per alcune specie meno delicate, come la carpa). Il trasferimento, i cui tempi dipendono dalla specie, non è sempre necessario. Per la tecnica semistatica si possono usare beaker o contenitori poco profondi e, se necessario, forniti di un divisorio a rete lievemente sopraelevato rispetto al fondo. Se il volume dei contenitori è sufficiente a soddisfare le richieste di carico (cfr. l.7.1.2) il trasferimento degli embrioni o delle larve può essere evitato.

([1]) OECD, Paris. 1992. Test Guideline 210, Fish. Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5. **Acqua**

Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua conforme alle caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile, come descritta nell'appendice 4, e in cui la specie utilizzata nella prova dimostra una capacità di sopravvivenza dei controlli almeno pari a quella descritta nelle appendici 2 e 3. La qualità dell'acqua dovrebbe essere costante per tutta la durata della prova. Il pH dovrebbe rimanere entro un intervallo di ± 0,5 unità di pH. Per escludere la possibilità di effetti indesiderati dell'acqua di diluizione sui risultati della prova (ad esempio per complessazione della sostanza in esame) o influenze negative sulla performance dei pesci riproduttori è utile prelevare di quando in quando alcuni campioni e analizzarli. La misura dei metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), dei pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi sospesi 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),

1.6.6. **Soluzioni di prova**

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 di prova nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (cioè agitazione e ultrasuoni). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità). Per quanto possibile va evitato l'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti); tuttavia, in alcuni casi tali composti possono essere necessari per ottenere una soluzione madre di concentrazione adeguata. A tale scopo si prestano ad esempio solventi quali acetone, etanolo, metanolo, dimetilformammide e glicole trietilenico o disperdenti quali Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. Quando si impiegano agenti a rapida biodegradabilità, come l'acetone, e/o altamente volatili è necessario procedere con cautela, poiché potrebbero causare problemi nelle prove a flusso continuo dovuti a sviluppo batterico. Qualora si utilizzi un agente solubilizzante questo non deve avere effetti significativi sulla sopravvivenza né effetti negativi visibili sui primi stadi di vita degli organismi come è dimostrato da un controllo con solo solvente. L'uso di questi materiali dovrebbe essere evitato il più possibile.

Per la tecnica semistatica è possibile seguire due diverse procedure di rinnovo dell'acqua: i) si preparano nuove soluzioni di prova in recipienti puliti e si trasferiscono delicatamente le uova e le larve sopravvissute nei nuovi recipienti utilizzando un piccolo volume di soluzione vecchia ed evitando l'esposizione all'aria, oppure ii) gli organismi della prova sono mantenuti nei recipienti mentre viene cambiata una parte (almeno tre quarti) dell'acqua. La frequenza di rinnovo del mezzo dipende dalla stabilità della sostanza di prova, ma si raccomanda di sostituire l'acqua quotidianamente. Se da prove preliminari di stabilità (cfr. sezione 1.4) la concentrazione della sostanza di prova non risulta stabile (cioè è al di fuori dell' intervallo dell'80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante l'intervallo di tempo tra le operazioni di rinnovo dell'acqua, occorre prendere in considerazione l'opportunità di utilizzare una prova a flusso continuo, in ogni caso occorre evitare di sottoporre le larve a stress durante l'operazione di rinnovo dell'acqua.

▼B

Le prove a flusso continuo comportano l'uso di un sistema che eroghi e diluisca di continuo la soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio pompa dosatrice, diluitore proporzionale, sistema di saturazione) per fornire alle camere di prova una serie di concentrazioni. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione dovrebbero essere controllate a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non presentare variazioni superiori al 10 % per tutta la durata della prova. Si considera adeguata una portata equivalente ad almeno cinque volte il volume della camera di prova ogni 24 ore (2).

1.7. PROCEDURA

In letteratura si trovano informazioni utili sull'esecuzione della prova di tossicità sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino di pesci; alcuni riferimenti sono elencati nella bibliografia della presente prova (7) (8) (9).

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1. *Durata*

La prova dovrebbe avere inizio preferibilmente entro 30 minuti dalla fecondazione delle uova. Gli embrioni vanno immersi nella soluzione di prova prima o immediatamente dopo l'inizio dello stadio di segmentazione del blastodisco e, comunque, prima che inizi lo stadio di gastrula. Se le uova provengono da fornitori esterni può risultare impossibile iniziare la prova subito dopo la fecondazione. Poiché un ritardo nell'avvio della prova può influire fortemente sulla sua sensibilità, la prova dovrebbe iniziare entro 8 ore dalla fecondazione. Dato che le larve non vengono nutrite durante il periodo di esposizione, la prova dovrebbe terminare subito prima che il sacco vitellino di una qualsiasi delle larve in una delle camere di prova sia stato completamente assorbito, o prima che i controlli inizino a morire per mancanza di cibo. La durata della prova dipende dalla specie utilizzata. Le appendici 2 e 3 contengono alcune raccomandazioni al riguardo.

1.7.1.2. *Carico*

All'inizio della prova il numero di uova fecondate deve essere sufficiente a soddisfare le richieste dell'analisi statistica. Le uova dovrebbero essere distribuite a caso fra i trattamenti e per ogni concentrazione si dovrebbero usare almeno 30 uova fecondate, divise equamente (o il più equamente possibile, visto che con alcune specie può essere difficile ottenere lotti uguali) tra almeno tre repliche. Il regime di carico (biomassa per volume di soluzione di prova) deve essere abbastanza basso da consentire di mantenere senza aerazione una concentrazione di ossigeno disciolto pari ad almeno il 60 % del valore di saturazione nell'aria. Per la prova a flusso continuo è stato raccomandato un regime di carico non superiore a 0,5 g/l per 24 ore e non superiore a 5 g/l di soluzione in qualsiasi momento (2).

1.7.1.3. *Luce e temperatura*

Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua di prova devono essere adatti alla specie utilizzata (appendici 2 e 3). Per controllare la temperatura si può utilizzare un recipiente di prova aggiuntivo.

▼B

1.7.2. **Concentrazioni della sostanza di prova**

Di norma occorrono cinque concentrazioni della sostanza in esame che differiscano di un fattore costante non superiore a 3,2. Nella scelta dell'intervallo delle concentrazioni bisogna tenere conto della curva che pone in relazione la CL_{50} al periodo di esposizione nello studio della tossicità acuta. In alcune circostanze, ad esempio nelle prove limite, può essere appropriato impiegare meno di cinque concentrazioni a un intervallo di concentrazione più ristretto. Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre spiegarne il motivo. Non è necessario provare concentrazioni della sostanza superiori alla CL_{50} nelle 96 ore o a 100 mg/l, qualsiasi sia la più bassa. Le sostanze non dovrebbero essere provate a concentrazioni al di sopra del loro limite di solubilità nell'acqua di prova.

Se nella preparazione delle soluzioni di prova si utilizza un agente solubilizzante (cfr. sezione 1.6.6), la sua concentrazione finale nei recipienti di prova non dovrebbe superare 0,1 ml/l e dovrebbe essere uguale in tutti i recipienti.

1.7.3. **Controlli**

In aggiunta alle concentrazioni della sostanza in esame, dovrebbe essere allestito un controllo con l'acqua di diluizione (ripetendola in modo adeguato) ed eventualmente controllo con acqua contenente l'agente solubilizzante (ripetendola in modo adeguato), ambedue con un adeguato numero di repliche.

1.7.4. **Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche**

Durante la prova vanno determinate a intervalli regolari le concentrazioni della sostanza di prova.

Nella prova semistatica in cui si prevede che la concentrazione della sostanza in esame si mantenga intorno a ± 20 % del valore nominale (ovvero entro un intervallo di 80-120 %; cfr. sezioni 1.4 e 1.6.6), si raccomanda, come minimo, di analizzare le concentrazioni minima e massima subito dopo la preparazione e immediatamente prima del rinnovo dell'acqua almeno tre volte a intervalli regolari nel corso della prova (le analisi vanno effettuate su un campione della stessa soluzione preparata di fresco e poi al momento di rinnovarla).

Quando si prevede che la concentrazione della sostanza in esame non si mantenga intorno a ± 20 % del valore nominale (in base ai dati sulla stabilità della sostanza), è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, preparate di fresco e al momento di rinnovarle, ma seguendo lo stesso schema (cioè almeno tre volte a intervalli regolari nel corso della prova), è sufficiente determinare le concentrazioni della sostanza in esame prima di rinnovare la soluzione solo su una replica per ogni concentrazione. L'intervallo fra le determinazioni analitiche non deve superare i sette giorni. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia se è possibile provare che durante tutta la prova la concentrazione della sostanza di prova nella soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale misurata, i risultati possono essere basati sui valori nominali o sui valori iniziali misurati.

Per le prove a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per i le prove semistatiche (sebbene in questo caso non si effettui la misurazione delle soluzioni «vecchie»). Se però la durata della prova supera i sette giorni, può essere consigliabile aumentare il numero di campionamenti durante la prima settimana (ad esempio, tre serie di misurazioni) per assicurare che le concentrazioni di prova restino stabili.

▼B

Può essere necessario centrifugare o filtrare i campioni (ad esempio con filtro con pori di 0,45 μm). Poiché tuttavia né la centrifugazione né la filtrazione sembrano essere sempre in grado di separare la frazione non biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile, i campioni non devono necessariamente essere sottoposti a questi trattamenti.

Durante la prova in tutti i recipienti di prova dovrebbero essere misurati l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura. La durezza totale e la salinità (se del caso) vanno misurate nei controlli e in un recipiente alla concentrazione massima. L'ossigeno disciolto ed eventualmente la salinità vanno misurati almeno tre volte (all'inizio, verso la metà e alla fine della prova). Nella prova semistatica si raccomanda di misurare l'ossigeno disciolto con maggiore frequenza, preferibilmente prima e dopo ogni rinnovo dell'acqua o almeno una volta alla settimana. Il pH dovrebbe essere misurato all'inizio e alla fine di ogni rinnovo dell'acqua nella prova semistatica e almeno una volta alla settimana nella prova a flusso continuo. La durezza va misurata una sola volta per ciascuna prova. La temperatura dovrebbe essere misurata una volta al giorno e preferibilmente essere costantemente controllata almeno in un recipiente di prova.

1.7.5. **Osservazioni**

1.7.5.1. *Stadio dello sviluppo embrionale*

Lo stadio embrionale (stadio di gastrula) all'inizio dell'esposizione alla sostanza di prova va verificato nel modo più accurato possibile. Per far ciò si può utilizzare un campione rappresentativo di uova adeguatamente conservate e separate. Per la descrizione e l'illustrazione degli stadi embrionali si rimanda alla letteratura in materia (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Schiusa e sopravvivenza*

Almeno una volta al giorno occorre effettuare osservazioni sulla schiusa e la sopravvivenza e registrarne i dati. All'inizio della prova può essere consigliabile effettuare osservazioni più frequenti (ad esempio ogni 30 minuti durante le prime tre ore), poiché in alcuni casi i tempi di sopravvivenza possono avere maggiore importanza del solo numero di decessi (ad esempio in presenza di effetti tossici acuti). Gli embrioni e le larve morti vanno rimossi appena individuati in quanto possono decomporsi rapidamente. Nel rimuovere gli individui morti è necessario procedere con estrema cautela per non urtare o danneggiare le uova/larve vicine, che sono estremamente delicate e sensibili. I criteri per stabilire la morte variano a seconda dello stadio di vita:

— **per le uova:** soprattutto nei primi stadi, marcata perdita di trasluciditá e cambiamento di colorazione dovute a coagulazione e/o precipitazione delle proteine, con conseguente aspetto bianco opaco,

— **per gli embrioni:** assenza di movimenti del corpo e/o assenza di battito cardiaco e/o di colorazione opaca nelle specie in cui gli embrioni sono normalmente traslucidi,

— **per le larve:** immobilità e/o assenza di movimenti respiratori e/o assenza di battito cardiaco e/o colorazione bianca opaca del sistema nervoso centrale e/o mancanza di reazione agli stimoli meccanici.

▼B

1.7.5.3. *Anomalie dell'aspetto*

A intervalli adeguati, a seconda della durata della prova e della natura dell'anomalia descritta, vanno registrati il numero di larve che presentano anomalie morfologiche e/o della pigmentazione, e lo stadio di assorbimento del sacco vitellino. Va rilevato che la presenza di embrioni e larve anomali è un fenomeno naturale e nel/i controllo/i di alcune specie può raggiungere molti punti percentuali. Gli individui che presentano anomalie vanno rimossi dai recipienti solo dopo la loro morte.

1.7.5.4. *Anomalie del comportamento*

Le anomalie, quali iperventilazione. movimenti natatori scoordinati e inattività atipica, dovrebbero essere registrate a intervalli adeguati in funzione della durata della prova. Il rilevamento di tali effetti, per quanto difficili da quantificare, può facilitare l'interpretazione dei dati sulla mortalità, cioè fornire informazioni sul modo d'azione tossica della sostanza.

1.7.5.5. *Lunghezza*

Alla fine della prova si raccomanda di misurare la lunghezza degli individui, che può essere quella standard alla biforcazione della pinna caudale o quella totale. In caso di marcescenza della pinna caudale o erosione della pinna, si dovrebbe misurare la lunghezza standard. Generalmente, in una prova ben eseguita, il coefficiente di variazione della lunghezza tra le repliche dei controlli dovrebbe essere < 20 %.

1.7.5.6. *Peso*

Alla fine della prova si può procedere alla pesatura degli individui; i pesi a secco (24 ore a 60 °C sono preferibili ai pesi umidi (dopo asciugatura). Generalmente, in una prova ben eseguita, il coefficiente di variazione del peso tra le repliche dei controlli dovrebbe essere ≤ 20 %.

Al termine delle osservazioni alcuni o tutti i seguenti dati saranno disponibili per l'analisi statistica:

— mortalità cumulativa,

— numero di larve sane alla fine della prova,

— tempo all'inizio della schiusa e alla fine della schiusa (90 % di schiusa in ogni replica),

— numero di larve che si schiudono ogni giorno,

— lunghezza (e peso) degli animali sopravvissuti alla fine della prova,

— numero delle larve deformi o di aspetto anomalo,

— numero delle larve che presentano un comportamento anomalo.

▼B

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si raccomanda di ricorrere a personale esperto di statistica sia per la concezione del disegno sperimentale che per l'analisi statistica dei risultati della prova, in quanto il metodo consente considerevoli variazioni nel disegno sperimentale, ad esempio nel numero di camere di prova e numero di concentrazioni di prova, nel numero iniziale di uova fecondate e nei parametri da misurare. Viste le diverse possibili opzioni di disegno sperimentale, in questa sede non si forniscono indicazioni specifiche sulle procedure statistiche.

Dovendo stimare i valori LOEC/NOEC sarà necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche mediante l'analisi della varianza (ANOVA) o tabelle di contingenza. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati delle singole concentrazioni e quelli dei controlli, può essere utile il metodo di Dunnett (12) (13). Allo scopo sono disponibili anche altri metodi (14) (15). Occorre calcolare e riportare l'entità dell'effetto individuabile mediante ANOVA o altre procedure (vale a dire la potenza della prova). Va rilevato che non tutti i dati elencati nella sezione 1.7.5.6 sono adatti all'analisi statistica mediante ANOVA. Per esempio, la mortalità cumulativa e il numero delle larve sane alla fine della prova potrebbero essere analizzati con metodi dei probit.

Dovendo stimare i valori CL/CE_X occorre adottare una curva/e adeguata/e (ad esempio la curva logistica) ai dati da analizzare mediante un metodo statistico come quello dei minimi quadrati o dei minimi quadrati non lineare. La/e curva/e dovrebbe/ro essere parametrizzata/e in modo da consentire di stimare direttamente la CL/CE_X di interesse e il suo errore standard. Ciò faciliterà notevolmente il calcolo dei limiti di confidenza della CL/CE_X. A meno che vi siano buoni motivi per preferire livelli fiduciali diversi dovrebbero essere riportati limiti di confidenza a due code ad un livello fiduciale del 95 %. La procedura di adattamento della curva dovrebbe preferibilmente consentire di valutare il significato della mancanza di adattamento (lack of fit). È possibile usare metodi grafici per l'adattamento delle curve. L'analisi di regressione è adatta a tutti i dati elencati nella sezione 1.7.5.6,

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui nelle soluzioni di prova si misurino concentrazioni di sostanze tossiche a livelli vicini al limite di rivelabilità del metodo analitico. Occorre usare cautela anche nell'interpretazione dei risultati riferiti a concentrazioni al di sopra della solubilità in acqua della sostanza.

2.3. RELAZIONE SULLA PROVA

La relazione sulla prova deve contenere le seguenti informazioni:

2.3.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche rilevanti,

— dati chimici di identificazione, compresi purezza e metodo analitico per la quantificazione della sostanza di prova, se del caso.

▼B

2.3.2. **Specie utilizzata:**

— nome scientifico, ceppo, numero di pesci riproduttori (cioè quante femmine sono state usate per produrre il numero di uova necessarie per la prova), origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

2.3.3. **Condizioni di esecuzione della prova:**

— procedura di prova utilizzata (ad esempio semistatica o a flusso continuo, periodo di tempo dalla fecondazione all'inizio della prova, carico, ecc),

— fotoperiodo/i,

— disegno sperimentale (ad esempio, numero di camere di prova e repliche, numero di embrioni per replica),

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (l'agente solubilizzante, se usato, deve essere indicato insieme alla sua concentrazione),

— concentrazioni nominali di prova, valori misurati, loro medie e deviazioni standard nei recipienti di prova e metodo con cui sono state ottenute e, se la sostanza è solubile in acqua a concentrazioni inferiori a quelle provate, va dimostrato che le misurazioni si riferiscono alle concentrazioni della sostanza di prova in soluzione,

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale, solidi sospesi, salinità del mezzo di prova (se misurato) ed eventuali altre misurazioni effettuate,

— qualità dell'acqua nei recipienti di prova: pH, durezza, temperatura e concentrazione di ossigeno disciolto.

2.3.4. **Risultati:**

— risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza di prova,

— dimostrazione che i controlli rispondono allo standard di accettabilità di sopravvivenza complessiva della specie in esame (appendici 2 e 3),

— dati sulla mortalità/sopravvivenza agli stadi embrionale e larvale e mortalità/sopravvivenza complessiva,

— giorni alla schiusa e numero di uova schiuse,

— dati relativi alla lunghezza (e al peso),

— incidenza e descrizione delle eventuali anomalie morfologiche,

— incidenza e descrizione degli eventuali effetti sul comportamento,

— analisi statistica e trattamento dei dati,

— per le prove analizzate mediante ANOVA, minima concentrazione con effetti significativi (LOEC) con $p = 0,05$ e massima concentrazione senza effetti significativi (NOEC) per ogni risposta analizzata, compresa una descrizione delle procedure statistiche utilizzate e un'indicazione dell'entità dell'effetto che poteva essere individuato.

▼B

— per le prove analizzate mediante tecniche di regressione. CL/CE_X e intervalli di confidenza, nonché un grafico del modello adattato usato per i relativi calcoli,

— spiegazione di eventuali deviazioni da questo metodo.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (19 58). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330,

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri).* J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (19 55). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish. *Brachydanio rerio*. Arch, of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London. Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C. Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28,

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *O*ryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Orvzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (198 5). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

TABELLA 1A

Specie di pesci raccomandate per la prova

ACQUA DOLCE
Oncorhynchus mykiss
Trota iridea (9) (16)
Danio rerio
Danio zebrato (7) (17) (18)
Cyprinus capilo
Carpa (8) (19)
Orvzias latipes
(20) (21)
Pimephales promelas
(8) (22)

▼B

TABELLA 1B

Esempi di altre specie ben documentate

Acqua dolce	Acqua salata
Carassius auratus Carassio dorato (8)	*Menidia peninsulare* Latterino menidia (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengu* Aringa (24) (25)
	Gadus morhua Merluzzo comune (24) (25)
	Cyprinodon variegates (23) (24) (25)

▼B

APPENDICE 1

GUIDA ALL'ESECUZIONE DI UNA PROVA DI TOSSICITÀ SUGLI EMBRIONI E SULLE LARVE CON SACCO VITELLINO DEL DANIO ZEBRATO (*BRACHYDANIO RERIO*)

INTRODUZIONE

Il danio zebrato proviene dalla costa di Coromandel, in India, dove vive in corsi d'acqua a corso rapido. Si tratta di un comune pesce da acquario della famiglia delle carpe e le informazioni sulla sua cura e sul suo allevamento si trovano nella normale bibliografia sui pesci tropicali. La sua biologia e il suo impiego nella ricerca ittica sono stati riesaminati da Laale (1).

Questo pesce, che supera raramente i 45 mm di lunghezza, ha il corpo di forma cilindrica, con 7-9 strisce orizzontali blu scuro argentate che arrivano alla pinna caudale e anale. Il dorso è verde oliva. I maschi sono più sottili delle femmine, le quali sono più argentate e presentano l'addome disteso, soprattutto prima della deposizione delle uova.

Gli esemplari adulti sono in grado di tollerare ampie fluttuazioni di temperatura, pH e durezza dell'acqua, ma per ottenere pesci sani che producano uova di buona qualità è necessario creare le condizioni ottimali.

Durante la deposizione delle uova, il maschio insegue e colpisce la femmina con la testa e feconda le uova appena espulse. Le uova, trasparenti e non adesive, cadono sul fondo, dove possono essere mangiate dai genitori. La deposizione delle uova viene influenzata dalla luce. Se la luce del mattino è adeguata, in genere il pesce depone le uova nelle prime ore dopo l'alba.

Ogni femmina può produrre lotti di parecchie centinaia di uova a intervalli settimanali.

CONDIZIONI DEI PESCI RIPRODUTTORI, RIPRODUZIONE E STADI DI VITA PRECOCI

Scegliere un numero adeguato di pesci sani e tenerli in un'acqua adatta (cfr. ad esempio l'appendice 4) per almeno 2 settimane prima della deposizione delle uova progettata. È necessario consentire al gruppo di pesci di riprodursi almeno una volta prima di produrre il lotto di uova da utilizzare nella prova. La densità dei pesci durante questo periodo non dovrebbe superare 1 grammo di pesce per litro. La sostituzione regolare dell'acqua o l'uso di sistemi di purificazione consente di mantenere una maggiore densità. La temperatura nelle di mantenimento dovrebbe essere mantenuta a 25 ± 2 ºC. Il pesce deve avere una dieta varia che può essere costituita, per esempio, da mangime secco commerciale adatto, individui vivi appena schiusi di Artemia, chironomidi, Daphnia ed oligocheti (Enchytrraeidae).

Di seguito vengono descritte due procedure che, nella pratica, hanno consentito di ottenere un lotto sufficiente di uova sane e fecondate per effettuare la prova:

i) In una vasca contenente 50 litri di acqua di diluizione vengono posti 8 femmine e 16 maschi, schermati dalla luce diretta e lasciati il più possibile indisturbati per almeno 48 ore. Nel pomeriggio precedente l'inizio della prova sul fondo dell'acquario viene posto un vassoio per la deposizione delle uova, costituita da un telaio di plexiglas o di altro materiale adatto alto 5-7 mm con una rete a maglia grossa di 2-5 mm fissata sul lato superiore e una rete a maglia fine di 10-30 μm sul fondo. Alla rete a maglia grossa sono attaccati numerosi «alberi di deposizione» formati da corde di nylon non ritorte. I pesci vengono lasciati nell'oscurità per 12 ore, dopo di che viene accesa una luce debole che darà inizio alla deposizione delle uova. Circa 2-4 ore dopo la deposizione delle uova si rimuove l'apposito vassoio e si raccolgono le uova. Il vassoio impedisce ai pesci di cibarsi delle uova e, allo stesso tempo, consente di raccoglierle facilmente. Il gruppo di pesci dovrebbe aver già deposto uova almeno una volta prima della deposizione di quelle destinate alla prova.

▼B

ii) 5-10 pesci maschi e femmine vengono mantenuti singolarmente per almeno 2 settimane prima della deposizione delle uova progettata. Dopo 5-10 giorni l'addome delle femmine apparirà disteso e saranno visibili le loro papille genitali. I maschi non hanno papille. Le uova vengono deposte in apposite vasche fornite di un falso fondo di rete (come descritto sopra). La vasca è riempita di acqua di diluizione, con una profondità di 5-10 cm al di sopra della rete. Il giorno prima della prevista deposizione si introducono nella vasca una femmina e due maschi. La temperatura dell'acqua viene progressivamente aumentata di un grado oltre la temperatura di acclimatazione. Si spegne la luce e si lascia la vasca il più possibile indisturbata. Il mattino seguente si accende una luce debole che darà inizio alla deposizione delle uova. Dopo 2-4 ore si rimuovono i pesci e si raccolgono le uova. Se sono necessarie più uova rispetto a quelle ottenibili da una sola femmina si possono allestire contemporaneamente più vasche di deposizione. Registrando il successo riproduttivo delle singole femmine prima della prova (numero e qualità delle uova deposte), è possibile selezionare per l'allevamento le femmine che presentano maggiore successo riproduttivo.

Le uova vanno trasferite nei recipienti di prova mediante tubi di vetro (diametro interno non inferiore a 4 mm), dotate di bulbo contagocce flessibile. La quantità di acqua raccolta con le uova nel trasferimento dovrebbe essere la minima possibile. Le uova sono più pesanti dell'acqua e colano fuori dal tubo. Occorre evitare che le uova (e le larve) vengano a contatto con l'aria. Alcuni campioni del/i lotto/i vanno esaminati al microscopio per verificare che i primi stadi dello sviluppo non presentino irregolarità. Non è consentito disinfettare le uova.

Il tasso di mortalità delle uova è massimo entro le prime 24 ore dalla fecondazione. Spesso, in questo periodo, si registra una mortalità che varia tra il 5 e il 40 %. Le uova degenerano se non sono fecondate o per difetti dello sviluppo. Sembra che la qualità delle uova dipenda dalla femmina; infatti, alcune femmine producono costantemente uova di buona qualità, altre non vi riescono mai. Anche la velocità di sviluppo e la percentuale di schiusa variano da un lotto all'altro. Le uova fecondate e le larve con sacco vitellino sopravvivono bene, generalmente per oltre il 90 %. A 25 ºC le uova si schiudono 3-5 giorni dopo la fecondazione e il sacco vitellino viene assorbito all'incirca 13 giorni dopo la fecondazione.

Lo sviluppo embrionale è stato accuratamente descritto da Hisaoka e Battle (2). Grazie alla trasparenza delle uova e delle larve dopo la schiusa è possibile seguire lo sviluppo del pesce e osservare la presenza di eventuali malformazioni. Circa 4 ore dopo la deposizione è possibile distinguere le uova non fecondate da quelle fecondate (3). Per effettuare questo esame si pongono uova e larve in recipienti di prova di dimensioni ridotte e le si studiano al microscopio.

Le condizioni di esecuzione della prova che si applicano ai primi stadi di vita sono specificate nell'appendice 2. I valori ottimali del pH e della durezza dell'acqua di diluizione sono rispettivamente 7,8 e 250 mg $CaCO_3$/l.

CALCOLI E STATISTICA

Si propone un approccio a due fasi. Anzitutto si analizzano statisticamente i dati sulla mortalità, sulle anomalie dello sviluppo e sul tempo di schiusa. Poi si valuta statisticamente la lunghezza del corpo, per le concentrazioni alle quali non sono stati rilevati effetti negativi per nessuno dei precedenti parametri. Si consiglia questo approccio in quanto la sostanza tossica può uccidere selettivamente i pesci più piccoli, ritardare il tempo di schiusa e indurre gravi malformazioni, influenzando così i valori relativi alla lunghezza. Inoltre il numero di pesci da misurare per ogni trattamento sarà all'incirca uguale, garantendo così la validità dei dati statistici.

▼B

DETERMINAZIONE DELLA CL_{50} E DELLA CE_{50}

Si calcola la percentuale di uova e larve sopravvissute e la si corregge in base alla mortalità riscontrata nei controlli, mediante la formula di Abbot (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

dove

P = % sopravvivenza corretta

P' = % sopravvivenza osservata nella concentrazione di prova

C = % sopravvivenza nel controllo

Se possibile, la CL_{50} viene determinata alla fine della prova mediante un metodo adeguato.

Per includere nel calcolo statistico della CE_{50} anche le anomalie morfologiche. si rimanda a Stephan (5).

STIMA DEI VALORI DI LOEC E NOEC

Uno degli obiettivi della prova sulle uova e sulle larve con sacco vitellino è paragonare le concentrazioni diverse da zero con il controllo, cioè determinare la LOEC. Occorre dunque utilizzare procedure di comparazione multipla (6) (7) (8) (9) (10).

BIBLIOGRAFIA

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review.). Fish Biol. 10. pp. 121-173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Riproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

APPENDICE 2

CONDIZIONI DI ESECUZIONE DELLA PROVA, DURATA E CRITERI DI SOPRAVVIVENZA PER LE SPECIE RACCOMANDATE

Specie	Temperatura (°C)	Salinità (0/0")	Fotoperiodo (ore)	Durata degli stadi (giorni)		Durata tipica della prova	Sopravvivenza del controllo (% minima)	
				Embrioni	Larve con sacco vitellino		Successo alla schiusa	Post-schiusa
ACQUA DOLCE								
Brachydanio rerio Danio zebrato	25 ±1	—	12-16	3-5	8-10	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio di gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (8-10 giorni)	80	90
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 20 giorni dopo la schiusa (50-55 giorni)	66	70
Carpa carpio Carpa	21-25	—	12-16	5	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (8-9 giorni)	80	75
Oryzias lalipes	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (13-16 giorni)	80	80
Pimephales promelas	25 ± 2	—	16	4-5	5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (8-9 giorni)	60	70

(1) Per gli embrioni.
(2) Per le larve.
(a) Buio per embrioni e larve fino a una settimana dopo la schiusa, tranne per le ispezioni. Poi luce debole per tutta la prova.

APPENDICE 3

Condizioni di esecuzione della prova, durata e criter1 di sopravvivenza per altre specie ben documentate

Specie	Temperatura (ºC)	Salinità (0/00)	Fotoperiodo (ore)	Durata degli sudi (giorni)		Durata tipica della prova su embrioni e larve con sacco vitellino	Sopravvivenza dei controlli (% minima)	
				Embrioni	Larve con sacco vitellino		Successo alla schiusa	Post-schiusa
ACQUA DOLCE								
Carassius auratus Carassio dorato	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (7 giorni)	—	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	—	16	3	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (7 giorni)	—	75
ACQUA SALATA								
Menida peninsulare Latterino menidia	22-25	15-22	12	1,5	10	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (6-7 giorni)	80	60
Clupea harengus Aringa	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 3 giorni dopo la schiusa (23-27 giorni)	60	80
Gadus morhua Merluzzo comune	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 3 giorni dopo la schiusa (18 giorni)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	—	—	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4-7 giorni dopo la schiusa (28 giorni)	> 75	80

▼B

APPENDICE 4

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

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

▼B

C.16. **API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ORALE ACUTA**

1. **METODO**

Questo metodo di test della tossicità acuta corrisponde al TG 213 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo test di tossicità è un metodo di laboratorio progettato per valutare la tossicità orale acuta dei fitofarmaci e di altre sostanze chimiche sulle api operaie adulte.

Per determinare e valutare le proprietà tossiche delle sostanze può rendersi necessario determinare la tossicità orale acuta sulle api, ad esempio in caso di probabile esposizione di api a una data sostanza. Il test di tossicità orale acuta viene eseguito per determinare la tossicità intrinseca dei pesticidi e di altre sostanze chimiche sulle api. In base ai risultati di tale test si valuta la necessità di effettuare analisi più approfondite. In particolare questo metodo può essere applicato per valutare i rischi che i pesticidi presentano per le api nell'ambito di un programma di test a più fasi che prevede in sequenza l'esecuzione di test in laboratorio, di esperimenti condotti parzialmente di semi-campo ed altri di campo (1). I pesticidi possono essere testati come principi attivi (p.a.) oppure come prodotti formulati.

Per verificare la sensibilità delle api e la precisione della procedura del test si utilizza una sostanza tossica standard.

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità orale acuta: effetti avversi che si verificano entro un massimo di 96 ore dalla somministrazione orale di una dose singola della sostanza in esame.

Dose: quantità della sostanza di prova consumata, espressa in termini di massa (μg) della sostanza per animale sperimentale (μg/ape). Non è possibile calcolare la dose reale per ogni ape, in quanto le api vengono alimentate tutte insieme, ma si può fare una stima della dose media (sostanza consumata in totale/numero di api in una gabbia).

DL_{50} (Dose Letale Mediana) orale: dose singola, calcolata statisticamente, di una sostanza in grado di provocare la morte del 50 % degli animali se somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} si esprime in μg di sostanza di prova per ape. Nel caso dei pesticidi la sostanza di prova può essere un principio attivo (p.a.) o un prodotto formulato contenente uno o più principi attivi.

Mortalità: si registra la morte di un animale quando l'esemplare resta completamente immobile.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Si espongono api operaie adulte (*Apis mellifera*) a un range di dosi della sostanza in esame dispersa in soluzioni di saccarosio. Successivamente si alimentano le api con la stessa dieta, senza la sostanza in esame. Per almeno 48 ore si registra quotidianamente la mortalità e la si confronta con i valori di controllo. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 ore e le 48 ore mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero ≤ 10 %,. il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 ore. Si analizzano i risultati per calcolare la DL_{50} a 24 ore e 48 ore e. nel caso lo studio venga prolungato, a 72 ore e 96 ore.

▼B

1.4. VALIDITÀ DEL TEST

Perché un test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità media del numero totale dei controlli non deve superare il 10 % alla fine del test,

— la DL_{50} della sostanza tossica standard corrisponde al range specificato.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.5.1. **Raccolta delle api**

Si utilizzano giovani api operaie adulte della stessa razza, della stessa età, alimentate allo stesso modo ecc. Le api vanno prelevate da colonie con regina, devono essere adeguatamente nutrite e sane e, per quanto possibile, esenti da malattie con storia e condizioni fisioloeiche note. Possono essere raccolte la mattina del test o la sera prima e vanno tenute in condizioni sperimentali fino al giorno successivo. Si prestano a tale fine le api raccolte da telaini senza covata. È meglio evitare di raccogliere gli insetti all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, poiché in tali periodi il loro stato fisiologico è alterato. Dovendo eseguire i test all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, si possono tenere le api in un'incubatrice e allevarle per una settimana con polline raccolto dal favo e soluzione di saccarosio. Le api trattate con sostanze chimiche quali antibiotici, prodotti anti-Varroa ed altri non possono essere utilizzate nei test di tossicità prima di quattro settimane dalla fine dell'ultimo trattamento.

1.5.2. **Condizioni di mantenimento e alimentazione**

Si usano gabbie facili da pulire e ben ventilate di qualsiasi materiale adatto: acciaio inossidabile, reti di ferro, plastica o legno monouso. Il numero ideale è di dieci api per gabbia. Le dimensioni delle gabbie devono essere adeguate al numero di api per garantire uno spazio sufficiente.

Le api devono essere mantenute nell'oscurità in una stanza sperimentale a una temperatura di 25 ± 2 °C. L'umidità relativa (normalmente tra 50-70 %) va registrata durante tutto il test. Le procedure di manipolazione, compresi il trattamento e le osservazioni, possono essere condotte in presenza di luce (naturale). L'alimentazione è costituita da una soluzione di saccarosio in acqua ad una concentrazione finale di 500 g/l (50 % p/v). Dopo aver somministrato le dosi sperimentali, le api vanno alimentate per tutta la durata del test. Il sistema di alimentazione deve consentire di registrare l'assunzione di cibo per ogni gabbia (cfr. sezione 1.6.3.1). Come tale si può usare una pipetta di vetro (lunga 50 mm e larga 10 mm circa con l'estremità aperta ristretta a circa 2 mm di diametro).

1.5.3. **Preparazione delle api**

Le api raccolte vengono collocate per randomizzazione nelle gabbie, a loro volta poste in maniera randomizzata nella stanza sperimentale.

▼B

Prima di iniziare il test si possono lasciare le api a digiuno per un massimo di 2 ore. Si raccomanda di privare le api del cibo prima del trattamento in modo che all'inizio del test risultino tutte uguali per contenuto intestinale. Prima di cominciare il test occorre scartare le eventuali api moribonde e sostituirle con api sane.

1.5.4. **Preparazione delle dosi**

Se la sostanza di prova è un composto idromiscibile, la si può disperdere direttamente in una soluzione di saccarosio al 50 %. Per i prodotti tecnici e le sostanze a bassa idrosolubilità è possibile usare veicoli come i solventi organici, gli emulsionanti e i disperdenti scarsamente tossici per le api (quali acetone, dimetilformammide, dimetilsolfossido). La concentrazione del veicolo dipende dalla solubilità della sostanza di prova e deve essere uguale per tutte le concentrazioni testate. Generalmente, però, non si dovrebbe superare una concentrazione dell'1 %, che risulta essere la più appropriata.

Occorre preparare adeguate soluzioni di controllo; quando si utilizza un solvente o un disperdente per solubilizzare la sostanza vanno usati due gruppi di controllo separati: una soluzione in acqua e una soluzione di saccarosio con il solvente/veicolo alla concentrazione usata nelle soluzioni di dosaggio.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali e gruppi di controllo**

Il numero di dosi e di repliche testati deve soddisfare i requisiti statistici per la determinazione della DL_{50} con limiti di affidabilità del 95 %. Per il test sono di solito necessarie cinque dosi in serie geometriche, con un fattore non superiore a 2,2 e che coprano il range della DL_{50}. È tuttavia necessario determinare il fattore di diluizione e il numero di concentrazioni per dosaggio, in relazione alla pendenza della curva di tossicità (dose/mortalità) e tenendo conto del metodo statistico scelto per l'analisi dei risultati. Un test di ricerca del range permette di scegliere le concentrazioni adeguate per dosaggio.

Con ogni concentrazione utilizzata vanno effettuate almeno 3 repliche, ognuna di dieci api. Oltre alle serie sperimentali è necessario analizzare almeno tre lotti di controllo, ognuno di dieci api. Occorrono 3 gruppi di controllo anche per i solventi/veicoli usati (cfr. sezione 1.5.4).

1.6.2. **Sostanza tossica standard**

Nelle serie sperimentali deve essere inclusa una sostanza tossica standard. Occorre selezionare almeno tre dosi che coprano il valore atteso di DL_{50}. Per ciascuna dose si utilizzano almeno tre gabbie, ognuna contenente dieci api. La sostanza tossica di elezione è il dimetoato, per il quale la DL_{50} sulle 24 ore per somministrazione orale si colloca tra 0,10 e 0,35 µg p.a./ape (2). Tuttavia sono accettabili anche altre sostanze tossiche standard di cui occorre avere dati sufficienti per verificare la risposta attesa rispetto alla dose (ad esempio il parathion).

▼B

1.6.3. **Esposizione**

1.6.3.1. *Somministrazione delle dosi*

Ogni gruppo sperimentale di api deve ricevere 100-200 µl di soluzione di saccarosio/acqua al 50 % contenente la sostanza in esame alla concentrazione adeguata. Per i prodotti a bassa solubilità, bassa tossicità o bassa concentrazione nella formulazione è necessario aumentare il volume, in quanto vanno usate proporzioni maggiori nella soluzione di saccarosio. È necessario monitorare la quantità di cibo trattato consumato da ciascun gruppo. Una volta vuoto (in genere entro 3-4 ore), l'alimentatore va tolto dalla gabbia e sostituito con un altro contenente solo la soluzione di saccarosio. Le soluzioni di saccarosio vengono quindi somministrate ad libitum. Per alcune sostanze a concentrazioni elevate è possibile che le api rifiutino l'alimentazione trattata. Anche se le quantità consumate sono ridotte, dopo un massimo di 6 ore il cibo trattato non consumato va comunque sostituito con la soluzione di solo saccarosio. È necessario valutare la quantità di cibo trattato consumato (ad esempio con misurazione del peso/volume del cibo trattato rimanente).

1.6.3.2. *Durata*

Il test dovrebbe durare 48 ore dal momento della sostituzione della soluzione di prova con la soluzione di solo saccarosio. Se la mortalità continua ad aumentare di oltre il 10 % dopo le prime 24 ore, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

1.6.4. **Osservazioni**

La mortalità viene registrata 4 ore dopo l'inizio del test e in seguito dopo 24 ore e 48 ore dalla somministrazione della dose. In caso di prolungamento del periodo di osservazione occorre effettuare altre valutazioni a intervalli di 24 ore, fino a un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità nei controlli non superi il 10 %.

E necessario stimare la quantità di cibo trattato consumato da ciascun gruppo. Il confronto fra la quantità consumata di cibo trattato e non trattato entro le 6 ore può fornire informazioni sulla gustosità della dieta trattata.

Vanno registrate tutte le anomalie del comportamento osservate durante il periodo di svolgimento del test.

1.6.5. **Test limite**

In alcuni casi (ad esempio quando si presume che la sostanza di prova sia poco tossica) si può eseguire un test limite utilizzando 100 µg p.a./ape per dimostrare che la DL_{50} è maggiore di tale valore. La procedura da seguire è la stessa, comprese le tre repliche per dose di prova, i controlli, la valutazione della quantità di cibo trattato consumato e l'uso della sostanza tossica standard. Se si verificano casi di mortalità occorre effettuare uno studio completo. Se si verificano effetti subletali, è necessario registrarli (cfr. sezione 1.6.4).

▼B

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati vanno riassunti in una tabella che evidenzi il numero di api usate, la mortalità a ogni osservazione e il numero di api con comportamento anomalo per ogni gruppo di trattamento, di controllo e relativo alla sostanza tossica standard. Per analizzare i dati della mortalità occorrono metodi statistici adeguati (ad esempio analisi probit, media mobile, probabilità binomiale) (3) (4). Occorre tracciare curve dose-risposta per ogni tempo di osservazione raccomandato e calcolare le pendenze delle curve e le dosi letali mediane (DL_{50}) con limiti di affidabilità al 95 %. Le correzioni per la mortalità fra i controlli possono essere effettuate con il metodo di Abbott (4) (5). Quando il cibo trattato non viene consumato completamente è necessario determinare la dose della sostanza in esame consumata da ciascun gruppo. La DL_{50} va espressa in µg di sostanza di prova per ape.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche rilevanti (ad esempio stabilità nell'acqua, tensione di vapore),

— dati chimici di identificazione, compresi formula di struttura, purezza (per i pesticidi: identità e concentrazione del/i principio/i attivo/i).

2.2.2. **Animali sperimentali:**

— nome scientifico della specie, razza, età approssimativa (in settimane), metodo e data di raccolta,

— informazioni sulle colonie usate per la raccolta, compresi stato di salute, eventuali malattie degli esemplari adulti, eventuali pretrattamenti, ecc.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— temperatura e umidità relativa della stanza sperimentale,

— condizioni di alloggiamento, compresi tipo, dimensioni e materiale delle gabbie,

— metodi di preparazione delle soluzioni madri e sperimentali (indicare eventuale solvente e relativa concentrazione),

— disegno sperimentale, ad esempio numero delle concentrazioni della sostanza in esame utilizzata, numero dei controlli; per ciascuna concentrazione e ciascun controllo, numero di gabbie e numero di api per gabbia,

— data del test.

▼B

2.2.4. **Risultati:**

— risultati dello studio preliminare di ricerca del range, se effettuato,

— dati primari: mortalità per ciascuna dose testata in funzione dei diversi tempi di osservazione,

— grafico delle curve dose-risposta alla fine del test,

— valori della DL_{50} con limiti di affidabilità al 95 %, per i singoli tempi di osservazione raccomandati per la sostanza di prova e la sostanza tossica standard,

— procedure statistiche usate per determinare la DL_{50},

— mortalità fra i controlli,

— altri effetti biologici osservati o misurati, quali comportamento anomalo delle api (compreso il rifiuto della dose sperimentale), quantità di cibo consumato nei gruppi trattati e non trattati,

— eventuali deviazioni dalle procedure sperimentali qui descritte ed eventuali altre informazioni pertinenti.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. U9-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ACUTA PER CONTATTO

1. METODO

Questo metodo di test della tossicità acuta corrisponde al TG 214 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo test di tossicità è un metodo di laboratorio progettato per valutare la tossicità acuta per contatto dei fitofarmaci e di altre sostanze chimiche sulle api operaie adulte.

Per determinare e valutare le proprietà tossiche delle sostanze può rendersi necessario determinare la tossicità acuta per contatto nelle api, ad esempio in caso di probabile esposizione di api a una data sostanza. Il test di tossicità acuta per contatto viene eseguito per determinare la tossicità intrinseca dei pesticidi e di altre sostanze chimiche sulle api. In base ai risultati di tale test si valuta la necessità di effettuare analisi più approfondite. In particolare questo metodo può essere applicato per valutare i rischi che i pesticidi presentano per le api nell'ambito di un programma di test a più fasi che prevede in sequenza l'esecuzione di test in laboratorio, di esperimenti condotti di semi-campo ed altri di campo (1). I pesticidi possono essere testati come principi attivi (p.a.) oppure come prodotti formulati.

Per verificare la sensibilità delle api e la precisione della procedura del test si utilizza una sostanza tossica standard.

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità acuta per contatto: effetti avversi che si verificano entro un massimo di 96 ore dall'applicazione topica di una dose singola di una sostanza.

Dose: quantità della sostanza di prova applicata. La dose si esprime in termini di massa (μg) della sostanza per animale sperimentale (μg/ape).

DL_{50} (Dose Letale Mediana) per contatto: dose singola, calcolata statisticamente, di una sostanza in grado di provocare la morte del 50 % degli animali se somministrata per contatto. Il valore della DL_{50} si esprime in μg di sostanza di prova per ape. Nel caso dei pesticidi la sostanza di prova può essere un principio attivo (p.a.) o un prodotto formulato contenente uno o più principi attivi.

Mortalità: si registra la morte di un animale quando l'esemplare resta completamente immobile.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Si espongono api operaie adulte (*Apis mellifera*) a un range di dosi della sostanza in esame disciolta in un veicolo adeguato, per applicazione diretta sul torace (goccioline). La durata del test è di 48 ore. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 ore e le 48 ore mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero $\leq$ 10 %, il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 ore. La mortalità va registrata quotidianamente e confrontata con i valori di controllo. I risultati vengono analizzati per calcolare la DL_{50} a 24 ore e 48 ore e, nel caso lo studio sia prolungato, a 72 ore e 96 ore.

▼B

1.4. VALIDITÀ DEL TEST

Perché un test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità media del numero totale dei controlli non deve superare il 10 % alla fine del test,

— la DL_{50} della sostanza tossica standard corrisponde al range specificato.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.5.1. **Raccolta delle api**

Si utilizzano giovani api operaie adulte della stessa razza, della stessa età, alimentate allo stesso modo ecc. Le api vanno prelevate da colonie con regina, devono essere adeguatamente nutrite e sane e, per quanto possibile. esenti da malattie con storia e condizioni fisiologiche note. Possono essere raccolte la mattina del test o la sera prima e vanno tenute in condizioni sperimentali fino al giorno successivo. Si prestano a tale fine le api raccolte da telaini senza covata. È meglio evitare di raccogliere gli insetti all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, poiché in tali periodi il loro stato fisiologico è alterato. Dovendo eseguire i test all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, si possono tenere le api in un'incubatrice e allevarle per una settimana con polline raccolto dal favo e soluzione di saccarosio. Le api trattate con sostanze chimiche quali antibiotici, prodotti anti-Varroa ed altri non possono essere utilizzate nei test di tossicità prima di quattro settimane dalla fine dell'ultimo trattamento.

1.5.2. **Condizioni di mantenimento e alimentazione**

Si usano gabbie facili da pulire e ben ventilate di qualsiasi materiale adatto: acciaio inossidabile, reti di ferro, plastica, legno monouso, e così via. Le dimensioni delle gabbie devono essere adeguate al numero delle api per garantire uno spazio sufficiente. Si consiglia di mettere gruppi di dieci api per ogni gabbia.

Le api devono essere mantenute nell'oscurità in una stanza sperimentale a una temperatura di 25 ± 2 °C. L'umidità relativa (normalmente tra 50-70 %) va registrata durante tutto il test. Le procedure di manipolazione, compresi il trattamento e le osservazioni, possono essere condotte in presenza di luce (naturale). L'alimentazione, fornita per tutta la durata del test, è costituita da una soluzione di saccarosio in acqua ad una concentrazione finale di 500 g/l (50 % p/v) ed è somministrata tramite un alimentatore per api. Come tale si può usare una pipetta di vetro (lunga 50 mm e larga 10 mm circa con l'estremità aperta ristretta a circa 2 mm di diametro).

1.5.3. **Preparazione delle api**

Le api raccolte possono essere anestetizzate con anidride carbonica o azoto per l'applicazione della sostanza di prova. La quantità di anestetico e i tempi di esposizione devono essere minimi. Prima di cominciare il test occorre scartare le eventuali api moribonde e sostituirle con api sane.

1.5.4. **Preparazione delle dosi**

La sostanza di prova va applicata come soluzione in un veicolo, ad esempio un solvente organico o una soluzione acquosa con un agente umettante. Come solvente organico è preferibile l'acetone, ma si possono utilizzare, anche altri solventi organici {come la dimetilformammide e il dimetilsolfossido). Per i prodotti formulati dispersi in acqua e le sostanze organiche altamente polari non solubili in solventi organici può risultare più semplice applicare le soluzioni preparandole in una soluzione debole di un agente umettante comunemente in commercio (ad esempio Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Occorre preparare adeguate soluzioni di controllo: quando si utilizza un solvente o un disperdente per solubilizzare la sostanza, vanno usati due gruppi di controllo separati: uno trattato con acqua e l'altro con il solvente/disperdente.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali e gruppi di controllo**

Il numero di dosi e di repliche testati deve soddisfare i requisiti statistici per la determinazione della DL_{50} con limiti di affidabilità del 95 %. Per il test sono di solito necessarie cinque dosi in serie geometriche, con un fattore non superiore a 2,2 e che coprano il range della DL_{5O}. È tuttavia necessario determinare il numero di dosi, in relazione alla pendenza della curva di tossicità (dose/-mortalità) e tenendo conto del metodo statistico scelto per l'analisi dei risultati. Un test di ricerca del range permette di scegliere le dosi adeguate.

Con ogni concentrazione utilizzata vanno effettuate almeno tre repliche, ognuna di dieci api.

Oltre alle serie sperimentali è necessario analizzare almeno tre lotti di controllo, ognuno di dieci api. Dovendo utilizzare un solvente organico o un agente umettante occorre aggiungere altri tre lotti di controllo, di dieci api ciascuno, per il solvente o l'agente umettante.

1.6.2. **Sostanza tossica standard**

Nelle serie sperimentali deve essere inclusa una sostanza tossica standard. Occorre selezionare almeno tre dosi che coprano il valore atteso di DL_{50}. Per ciascuna dose si utilizzano almeno tre gabbie, ognuna contenente dieci api. La sostanza tossica di elezione è il dimetoato, per il quale la DL_{50} sulle 24 ore per contatto si colloca tra 0,10 e 0,30 µg p.a./ape (2). Tuttavia sono accettabili anche altre sostanze tossiche standard di cui occorre avere dati sufficienti per verificare la risposta attesa rispetto alla dose (ad esempio il parathion).

1.6.3. **Esposizione**

1.6.3.1. *Somministrazione delle dosi*

Le api vengono anestetizzate e trattate una per una con applicazione topica. L'assegnazione delle diverse dosi sperimentali e dei controlli è fatta per randomizzazione. Con un microapplicatore si applica 1 µl di soluzione contenente la sostanza di prova alla corretta concentrazione nella porzione dorsale del torace di ciascuna ape. Se si utilizza una quantità diversa, occorre precisarne le ragioni. Dopo l'applicazione le api vengono assegnate alle gabbie e alimentate con soluzioni di saccarosio.

1.6.3.2. *Durata*

Di preferenza, il test deve durare 48 ore. Se la mortalità aumenta di oltre il 10 % fra le 24 ore e le 48 ore, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

▼B

1.6.4. **Osservazioni**

La mortalità va registrata 4 ore dopo l'applicazione e, successivamente, alla ventiquattresima e quarantottesima ora. In caso di prolungamento del periodo di osservazione occorre effettuare altre valutazioni a intervalli di 24 ore, fino a un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

E necessario registrare tutte le anomalie del comportamento osservate durante il test.

1.6.5. **Test limite**

In alcuni casi (ad esempio quando si presume che la sostanza di prova sia poco tossica) si può eseguire un test limite utilizzando 100 μg p.a./ape per dimostrare che la DL_{50} è maggiore di tale valore. La procedura da seguire è la stessa, comprese le tre repliche per dose di prova, i controlli e l'uso della sostanza tossica standard. Se si verificano casi di mortalità occorre effettuare uno studio completo. Se si verificano effetti subletali, è necessario registrarli (cfr. sezione 1.6.4).

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati vanno riassunti in una tabella che evidenzi il numero di api usate, la mortalità a ogni osservazione e il numero di api con comportamento anomalo per ogni gruppo di trattamento, di controllo e relativo alla sostanza tossica standard. Per analizzare i dati della mortalità occorrono metodi statistici adeguati (ad esempio analisi probit, media mobile, probabilità binomiale) (3) (4). Occorre tracciare curve dose-risposta per ogni tempo di osservazione raccomandato {cioè 24 ore. 48 ore ed eventualmente 72 ore e 96 ore) e calcolare le pendenze delle curve e le dosi letali mediane (DL_{5O}) con limiti di affidabilità al 95 %. Le correzioni per la mortalità fra i controlli possono essere effettuate con il metodo di Abbott (4) (5). La DL_{50} va espressa in μg di sostanza di prova per ape.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio stabilità nell'acqua, tensione di vapore).

— dati chimici di identificazione, compresi formula di struttura, purezza (per i pesticidi: identità e concentrazione del/i principio/i attivo.i).

2.2.2. **Animali sperimentali:**

— nome scientifico della specie, razza, età approssimativa (in settimane), metodo e data di raccolta,

— informazioni sulle colonie usate per la raccolta, compresi stato di salute, eventuali malattie degli esemplari adulti, eventuali pretrattamenti. ecc.

▼B

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— temperatura e umidità relativa della stanza sperimentale,

— condizioni di alloggiamento, compresi tipo, dimensioni e materiale delle gabbie,

— metodi di somministrazione della sostanza di prova, ad esempio solvente veicolo usato, volume della soluzione di prova applicata, anestetici usati,

— disegno sperimentale, ad esempio numero delle dosi sperimentali usate, numero dei controlli; per ciascuna dose e ciascun controllo, numero di gabbie e numero di api per gabbia,

— data del test.

2.2.4. **Risultati:**

— risultati dello studio preliminare di ricerca del range, se effettuato,

— dati primari: mortalità per ciascuna concentrazione testata in funzione dei diversi tempi di osservazione,

— grafico delle curve dose-risposta alla fine del test,

— valori della DL_{50} con limiti di affidabilità al 95 %, per i singoli tempi di osservazione raccomandati per la sostanza di prova e la sostanza tossica standard,

— procedure statistiche usate per determinare la DL_{50},

— mortalità fra i controlli,

— altri effetti biologici osservati o misurati ed eventuali risposte anomale delle api,

— eventuali deviazioni dalle procedure del metodo sperimentale qui descritte ed eventuali altre informazioni pertinenti.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., Mclndoe, E.C, Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield,). T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO: METODO DISCONTINUO ALL'EQUILIBRIO

1. METODO

Il metodo discontinuo all'equilibrio qui descritto è una replica di: OECD TG 106 for the Determination of Soil Adsorption/Desorption, Using a Batch Equilibrium Method (2000).

1.1. INTRODUZIONE

Nell'elaborazione del presente metodo sono stati presi in conto i risultati di una sperimentazione circolare e di un workshop per la selezione dei terreni in vista della messa a punto di una prova di adsorbimento (1) (2) (3) (4), nonché le linee direttrici già esistenti sul piano nazionale (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Gli studi sull'adsorbimento/desorbimento sono utili per ottenere conoscenze essenziali in merito alla mobilità dei composti chimici e alla loro distribuzione nei comparti terreno, acqua ed aria della biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Queste conoscenze possono servire, per esempio, a prevedere o valutare la disponibilità di un prodotto chimico sotto vari aspetti: degradazione (22) (23); trasformazione ed assimilazione da parte degli organismi viventi (24); dilavamento attraverso il profilo del terreno (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilità a partire dal terreno (21) (29) (30); passaggio dalla superficie del terreno alle acque naturali (18) (31) (32). I dati sull'adsorbimento possono essere impiegati a fini di comparazione e di modellizzazione (19) (33) (34) (35).

La distribuzione di un prodotto chimico fra il terreno e le fasi acquose è un processo complicato, che dipende da svariati fattori: la natura chimica della sostanza (12) (36) (37) (38) (39) (40), le caratteristiche dei terreni (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) e i fattori climatici (precipitazioni, temperatura, luce solare, vento). I numerosi fenomeni e meccanismi coinvolti nel processo di adsorbimento di una sostanza chimica non possono essere definiti completamente attraverso un modello semplificato di laboratorio, sul tipo di quello qui proposto. Nondimeno, pur non permettendo di coprire tutti i casi che possono manifestarsi nella realtà, il presente tentativo fornisce informazioni utili sulla rilevanza ambientale dell'adsorbimento di una sostanza chimica.

Cfr. anche l'Introduzione generale.

1.2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è destinato a valutare il comportamento di una data sostanza sotto l'aspetto del suo adsorbimento/desorbimento nei vari tipi di terreno. Esso ha lo scopo di ricavare un valore del sorbimento che possa essere impiegato per prevedere la ripartizione della sostanza entro un'intera gamma di condizioni ambientali; a tale fine, per ciascun prodotto chimico considerato, si procede a determinare i coefficienti di adsorbimento all'equilibrio su vari tipi di terreno, in funzione delle caratteristiche del terreno stesso (ad esempio contenuto in carbonio organico, contenuto in argilla, struttura, pH). Per coprire nel modo più ampio possibile le interazioni di una data sostanza con i suoli, nelle condizioni in cui essi si presentano effettivamente in natura, è necessario impiegare vari tipi di terreno.

Ai fini del presente metodo, per adsorbimento s'intende il processo col quale un prodotto chimico si lega alla superficie dei terreni; non viene fatta differenza fra i vari processi di adsorbimento (adsorbimento chimico e fisico) ed altri processi, come la degradazione catalitica in superficie, l'adsorbimento in massa o le reazioni chi-miche. Non si è tenuto conto dell'adsorbimento che si verifica sulle particelle colloidali (diametro $< 0{,}2$ μm) generate dai terreni.

▼B

Per i vari tipi di terreno, si è ritenuto che i parametri di maggiore importanza dal punto di vista dell'adsorbimento siano il contenuto in carbonio organico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), il contenuto in argilla e la struttura del terreno (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), e, per i composti ionizzabili, il pH (3) (4) (42). Si è tenuto altresì conto: della capacità effettiva di scambio cationico (CESC), del contenuto in ossidi amorfi di ferro e di alluminio, particolarmente per i terreni vulcanici e tropicali (4), e della superficie specifica (49).

Il metodo è destinato a valutare l'adsorbimento di un prodotto chimico su vari tipi di terreno, entro una gamma variabile di contenuti di carbonio organico e di argilla, di struttura e di pH del terreno. Esso consiste in tre momenti:

Primo momento: studi preliminari destinati a determinare:

— il rapporto terreno/soluzione,

— il tempo di equilibrio per l'adsorbimento e la quantità della sostanza sotto esame che risulta adsorbita all'equilibrio,

— l'adsorbimento della sostanza sotto esame alla superficie dei recipienti e la stabilità della sostanza sotto esame lungo tutta la durata dell'esperimento.

Secondo momento: prova di selezione: l'adsorbimento viene studiato su cinque diversi tipi di terreno, attraverso la cinetica di adsorbimento a concentrazione singola e la successiva determinazione dei coefficienti di distribuzione K_d e K_{oc}.

Terzo momento: determinazione delle isoterme di adsorbimento di Freundlich, per determinare l'influenza della concentrazione sull'entità dell'adsorbimento nei terreni.

Studio di desorbimento attraverso la cinetica di desorbimento/isoterme di desorbimento di Freundlich (appendice 1).

1.3. DEFINIZIONI E UNITÀ

Simbolo	Definizione	Unità
A_{t_i}	percentuale di adsorbimento al tempo t_i	%
A_{eq}	percentuale di adsorbimento all'equilibrio di adsorbimento	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno al tempo t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno durante l'intervallo di tempo At_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento	µg
m_0	massa della sostanza sotto esame contenuta nella provetta, all'inizio della prova di adsorbimento	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame misurata in un'aliquota (v_a^A) al tempo t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa della sostanza nella soluzione all'equilibrio di adsorbimento	µg
m_{soil}	quantità in massa della fase terreno, riferita al secco	g

▼B

Simbolo	Definizione	Unità
c_{st}	concentrazione di massa della soluzione di riserva della sostanza	µg cm^{-3}
C_0	concentrazione iniziale di massa della soluzione in esame a contatto col terreno	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa al tempo t_i in cui l'analisi viene effettuata	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento	µg cm^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento	µg cm^{-3}
V_0	volume iniziale della fase acquosa a contatto col terreno durante la prova di adsorbimento	cm^3
v_a^A	volume dell'aliquota in cui viene misurata la sostanza sotto esame	cm^3
K_d	coefficiente di distribuzione per l'adsorbimento	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico	cm^3 g^{-1}
K_{om}	coefficiente di distribuzione normalizzato per la sostanza organica	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
l/n	esponente di Freundlich	
D_{t_i}	percentuale di desorbimento al tempo t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	percentuale di desorbimento durante l'intervallo di tempo Δt_i	%
K_{des}	coefficiente apparente di desorbimento	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coefficiente di desorbimento secondo Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno al tempo t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno durante l'intervallo di tempo Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	massa della sostanza determinata analiticamente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	massa totale della sostanza sotto esame desorbita all'equilibrio di desorbimento	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa della sostanza che resta adsorbita nel terreno dopo l'intervallo di tempo Δt_i	µg
m_{aq}^A	massa della sostanza residua dall'equilibrio di adsorbimento per effetto di una sostituzione incompleta del volume	µg
$C_s^{des}(eq)$	contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbito sul terreno all'equilibrio di desorbimento	µg g^{-1}

▼B

Simbolo	Definizione	Unità
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza sotto esame presente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento	µg cm^{-3}
V_T	volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante l'esperimento sulla cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie	cm^3
V_R	volume del surnatante eliminato dalla provetta dopo il raggiungimento di un equilibrio di adsorbimento e sostituito dallo stesso volume in una soluzione 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volume dell'aliquota prelevata a fini analitici dal tempo (i), durante l'esperimento sulla cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie	cm^3
V_r^r	volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misurazione della sostanza sotto esame, durante l'esperimento di cinetica di desorbimento (metodo in parallelo)	cm^3
V_r^F	volume della soluzione prelevata dal tubo per la misura della sostanza sotto esame all'equilibrio di desorbimento	cm^3
MB	bilancio di massa	%
m_E	massa totale della sostanza sotto esame estratta in due stadi dal terreno e dalle pareti del recipiente	µg
V_{rec}	volume del surnatante recuperato dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento	cm^3
p_{ow}	coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua	
pKa	costante di dissociazione	
S_w	solubilità in acqua	g l^{-1}

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Volumi noti di soluzioni della sostanza sotto esame, non marcata o radiomarcata, a concentrazioni note in $CaCl_2$0,01 M, vengono aggiunti a campioni di terreno di peso secco noto, previamente equilibrati in $CaCl_2$0,01 M. La miscela viene agitata per un tempo adeguato. Le sospensioni di terreno vengono quindi separate per centrifugazione e facoltativa filtrazione, e si procede all'analisi della fase acquosa. La quantità di sostanza sotto esame adsorbita sul campione di terreno viene calcolata per differenza fra la quantità di sostanza sotto esame contenuta inizialmente nella soluzione e la quantità che rimane alla fine dell'esperimento (metodo indiretto).

Un altro metodo per determinare la quantità adsorbita della sostanza sotto esame è quello di analizzare direttamente il terreno (metodo diretto). Questo procedimento, che comporta un'estrazione per stadi successivi dei terreni mediante un appropriato solvente, è raccomandabile quando le differenze di concentrazione della soluzione della sostanza non possono essere determinate con precisione (casi possibili: adsorbimento della sostanza sotto esame sulla superficie dei recipienti nei quali ha luogo l'esperimento; instabilità della sostanza entro la durata dell'esperimento; adsorbimento debole, che dà luogo soltanto a piccole variazioni di concentrazione nella soluzione; adsorbimento energico, che conduce a basse concentrazioni non determinabili con esattezza). Se si impiega una sostanza radiomarcata, l'estrazione del terreno può essere evitata analizzando la fase terreno con la tecnica della combustione e successiva conta delle scintillazioni in fase liquida. Quest'ultima tecnica, peraltro, manca di specificità e non permette di distinguere i prodotti progenitori da quelli della trasformazione, e perciò dovrebbe essere riservata ai casi in cui il prodotto chimico sotto esame rimane stabile per tutta la durata dello studio.

▼B

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA SOTTO ESAME

I reattivi chimici debbono essere di purezza analitica. Si raccomanda l'impiego di sostanze non marcate, a composizione nota e preferibilmente di purezza non inferiore al 95 %, oppure di sostanze radiomarcate a composizione e radiopurezza note. Nel caso dei radiomarcatori a semivita breve si terrà conto della degradazione apportando adeguate correzioni.

Prima di eseguire una prova per l'adsorbimcnto-desorbimento, è necessario disporre dei seguenti dati relativi alla sostanza sotto esame:

a) solubilità in acqua (A.6);

b) tensione di vapore (A.4) e/o costante della legge di Henry;

c) degradazione abiotica: idrolisi in funzione del pH (C.7);

d) coefficiente di ripartizione (A.8);

e) biodegrabilità rapida (C.4) o trasformazione aerobica ed anaerobica nel terreno;

f) pKa delle sostanze ionizzabili;

g) fotolisi diretta nell'acqua (cioè spettro di assorbimento UV-Vis nell'acqua, rendimento quantico) e fotodegradazione nel terreno.

1.6. APPLICABILITÀ

La prova può essere eseguita sulle sostanze chimiche per le quali si dispone di un metodo analitico sufficientemente preciso. La stabilità della sostanza sotto esame durante il tempo necessario per l'esecuzione della prova è un parametro importante, capace di influenzare l'attendibilità dei risultati, specialmente quando si applica il metodo indiretto. Pertanto, è necessario verificare detta stabilità attraverso uno studio preliminare; se nell'ordine di durata della prova si osserva una trasformazione, si raccomanda di eseguire lo studio principale analizzando tanto la fase terreno quanto la fase acquosa.

L'esecuzione di questa prova su sostanze a bassa solubilità in acqua ($S_W < 10^{-4}$ g l^{-1}) e su sostanze a carica elevata può dar luogo a difficoltà, dovute al fatto che la concentrazione nella fase acquosa non può essere misurata analiticamente con sufficiente precisione. In questi casi debbono essere introdotti passaggi intermedi. Il modo di affrontare questi problemi è descritto dove di rilevanza nel presente documento.

Sperimentando su sostanze volatili, si avrà cura di evitare le perdite durante lo studio.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO

1.7.1. **Apparecchiature e reattivi chimici**

Normale apparecchiatura di laboratorio, e in particolare:

a) provette o recipienti per eseguire l'esperimento. È importante che essi:

— siano adattabili direttamente alla centrifuga, in modo da minimizzare le perdite per manipolazione o travaso,

— siano costituiti da materiale inerte, tale cioè che l'adsorbimento della sostanza sotto esame sulla loro superficie sia minimo;

▼B

b) agitatore od apparecchio equivalente, capace di mantenere il terreno in sospensione durante l'agitazione;

c) centrifuga, di preferenza ad alta velocità (capace per esempio di produrre più di 3 000 g), a temperatura controllabile e che permetta di eliminare dalla soluzione acquosa le particelle di diametro superiore a 0,2 μm. Durante l'agitazione e la centrifugazione i contenitori dovranno essere mantenuti coperti, per evitare le perdite di liquido e quelle dovute alla volatilità; per rendere minimo l'adsorbimento sui coperchi, questi dovranno essere disattivati (ad esempio: coperchi a vite rivestiti di teflon);

d) facoltativi: apparecchio da filtrazione; filtri con porosità da 0,2 μm, sterili, per uso unico. Si avrà particolare cura di scegliere il materiale filtrante in modo da evitare che esso possa provocare perdite della sostanza sotto esame; per le sostanze scarsamente solubili non è opportuno impiegare materiale filtrante organico;

e) strumentazione analitica, adatta a misurare la concentrazione della sostanza sotto esame;

f) stufa da laboratorio, capace di mantenere una temperatura compresa fra 103 °C e 110 °C.

1.7.2. **Caratterizzazione e selezione dei terreni**

I terreni debbono essere caratterizzati attraverso tre parametri, dai quali si ritiene dipendere principalmente la loro capacità di adsorbimento: carbonio organico, contenuto in argilla e struttura del terreno, pH. Come già indicato (cfr. «Campo di applicazione»), va peraltro presa in considerazione ogni altra caratteristica chimico-fisica dei terreni che possa avere effetti sull'adsorbimento/desorbimento di una particolare sostanza.

I metodi impiegati per la caratterizzazione sono molto importanti e possono avere un influsso significativo sui risultati. Si raccomanda pertanto di misurare il pH del terreno in una soluzione in $CaCl_2$ 0,01 M (cioè nella soluzione usata per la prova di adsorbimento/-desorbimento), secondo il corrispondente metodo ISO (ISO-10390-1). Si raccomanda inoltre di determinare le altre proprietà rilevanti del terreno attraverso metodi standard (esempio manuale ISO di analisi dei terreni «Hanbook of Soil Analysis»); in questo modo, l'analisi dei dati sul sorbimento potrà basarsi su parametri dei terreni standardizzati globalmente. I riferimenti bibliografici (50-52) forniscono alcune indicazioni sui metodi standard disponibili per l'analisi e la caratterizzazione dei terreni. Per la taratura dei metodi di prova dei terreni, si raccomanda l'impiego di terreni di riferimento.

La tabella 1 fornisce indicazioni per la scelta dei terreni in vista degli esperimenti di adsorbimento/desorbimento. I sette terreni prescelti coprono i tipi di terreni che si incontrano nelle zone geografiche temperate. Quando le sostanze sotto prova sono ionizzabili, i terreni scelti debbono coprire una vasta gamma di pH, in modo da potersi valutare l'adsorbimento della sostanza nelle sue forme ionizzata e non ionizzata. Indicazioni sul numero di terreni diversi da impiegare nelle varie fasi della prova sono fornite al punto 1.9 («Esecuzione dell'esperimento»).

Se si preferiscono altri tipi di terreno, questi debbono essere caratterizzati dagli stessi parametri, e le loro proprietà debbono variare analogamente a quelle indicate nella tabella 1, anche se non corrispondono esattamente ai criteri.

▼B

Tabella 1

Guida per la selezione dei campioni di terreno per l'adsorbimento-desorbimento

Tipo di terreno	Campo di pH (in $CaCl_2$ 0,01 M)	Contenuto in carbonio organico	Contenuto in argilla (%)	Composizione del terreno ([1])
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	argilla
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	limo argilloso
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	limo sedimentario
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	limo
5	< 4,0-6,0 ([2])	< 0,5-1,5 ([2]) ([3])	< 10-15 ([2])	sabbia limacciosa
6	> 7,0	< 0,5-1,0 ([2]) ([3])	40-65	limo argilloso/argilla
7	< 4,5	> 10	< 10	sabbia/sabbia limacciosa

([1]) Secondo il sistema FAO e quello US (85).
([2]) Le rispettive variabili debbono mostrare di preferenza valori rientranti nel campo indicato. Se tuttavia risultasse difficile trovare materiali appropriati, sono accettabili valori inferiori al minimo indicato.
([3]) I terreni contenenti meno dello 0,3 % di carbonio organico possono perturbare la correlazione fra il contenuto organico e l'adsorbimento. Si raccomanda perciò l'impiego di terreni a contenuto di carbonio organico non inferiore allo 0,3 %.

1.7.3. **Raccolta e conservazione dei campioni di terreno**

1.7.3.1. *Raccolta*

Per il campionamento non si raccomandano tecniche o strumenti specifici; la tecnica di campionamento dipende dalle finalità dello studio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Va tenuto presente quanto segue:

a) è necessario disporre di informazioni particolareggiate sui precedenti della località dove ha luogo il prelievo, riguardanti il manto vegetale, i trattamenti con antiparassitari e/o fertilizzanti, gli ammendamenti biologici o la contaminazione accidentale, e le loro localizzazioni. Quanto alla descrizione del luogo di prelievo vanno seguite le raccomandazioni della norma ISO sul campionamento dei terreni (ISO 10381-6);

b) il luogo di campionamento deve essere definito secondo il metodo UTM (Proiezione universale traversa di Mercatore/dato orizzontale europeo) od attraverso le sue coordinate geografiche; ciò permetterà di eseguire futuri prelievi dello stesso terreno e contribuirà a definire il terreno a norma dei vari sistemi di classifica impiegati nei vari paesi. Si raccoglierà esclusivamente l'orizzonte A fino a una profondità massima di 20 cm. Con particolare riguardo al terreno n. 7, se del terreno fa parte un orizzonte O_h, questo deve essere incluso nel campionamento.

I campioni di terreno debbono essere trasportati entro contenitori, ed in condizioni di temperatura, tali da impedire che le proprietà iniziali del terreno risultino significativamente alterate.

▼B

1.7.3.2. *Conservazione*

È da preferirsi l'impiego di terreni prelevati di recente. Soltanto quando ciò non fosse possibile si potranno utilizzare terreni conservati a temperatura ambiente, al secco e all'asciutto. Per la conservazione non si raccomandano particolari limiti di tempo, ma i terreni conservati per più di tre anni saranno rianalizzati prima dell'impiego, per verificarne il contenuto in carbonio organico, il pH e il CESC.

1.7.3.3. *Manipolazione e preparazione dei campioni di terreno per la prova*

I terreni debbono essere essiccati all'aria a temperatura ambiente (di preferenza fra 20 e 25 °C). La disgregazione deve essere effettuata applicando la minima forza possibile, in modo da non alterare sensibilmente la struttura originale del terreno. I terreni saranno setacciati fino a granulometria < 2 mm; seguendo le raccomandazioni della norma ISO sul campionamento dei terreni (ISO 10381-6). Si raccomanda un'accurata omogeneizzazione, in quanto essa giova alla riproducibilità dei risultati. Il contenuto di umidità di ciascun terreno viene determinato su tre aliquote, per riscaldamento a 105 °C fino a peso sensibilmente costante (12 ore circa). Per tutti i calcoli, la massa del terreno va riferita alla massa essiccata in stufa, cioè al peso del terreno corretto per il suo contenuto di umidità.

1.7.4. **Preparazione della sostanza sotto esame per l'applicazione al terreno**

La sostanza sotto esame viene sciolta in una soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ in acqua distillata o deionizzata; la soluzione di $CaCl_2$ .impiegata come fase acquosa solvente serve a migliorare la centrifugabilità ed a rendere minimo lo scambio di cationi. La concentrazione della soluzione di riserva deve di preferenza superare di tre ordini di grandezza il limite di rivelazione del metodo analitico applicato: ciò salvaguarda l'esattezza delle misure effettuate secondo la metodologia qui descritta. La concentrazione della soluzione di riserva deve inoltre essere inferiore alla solubilità in acqua della sostanza sotto esame.

Di preferenza, la soluzione di riserva deve essere preparata estemporaneamente al momento dell'applicazione ai campioni di terreno ed essere mantenuta ben chiusa e al buio, alla temperatura di 4 °C. Il tempo di conservazione dipende dalla stabilità della sostanza sotto esame e dalla sua concentrazione nella soluzione.

Soltanto nel caso delle sostanze scarsamente solubili ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) può essere necessario ricorrere a un agente di solubilizzazione. Quest'ultimo: a) deve essere miscibile con l'acqua (ad esempio metanolo, acetonitrile); b) la sua concentrazione non deve superare l'1 % del volume totale della soluzione di riserva ed essere inferiore a quella della soluzione della sostanza sotto esame che verrà a contatto col terreno (di preferenza meno dello 0,1 %); c) non deve avere carattere di tensioattivo o dar luogo a reazioni solvolitiche con la sostanza chimica sotto esame. L'impiego di un agente di solubilizzazione deve essere menzionato e giustificato nella relazione.

Un'altra possibilità per le sostanze scarsamente solubili consiste nell'aggiunta intenzionale della sostanza sotto esame al sistema di prova: la sostanza sotto esame viene disciolta in un solvente organico, un'aliquota del quale viene aggiunta al sistema terreno (soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ in acqua distillata o deionizzata). Il contenuto del solvente organico nella fase acquosa deve essere mantenuto al più basso livello possibile, in modo da non superare lo 0,1 %. L'addizione intenzionale di una soluzione organica può compromettere la riproducibilità sotto l'aspetto del volume: essa introdurrebbe un ulteriore fattore di errore, in quanto le concentrazioni della sostanza sotto esame e del cosolvente non sarebbero le stesse in tutte le prove.

▼B

1.8. PREREQUISITI PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA DI ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO

1.8.1. **Il metodo analitico**

Fra i parametri chiave capaci di influenzare la precisione delle misure di sorbimento sono compresi la precisione dei metodi impiegati per analizzare la soluzione e la fase adsorbita, la stabilità e la purezza della sostanza da esaminare, il raggiungimento di un equilibrio di sorbimento, l'ordine di grandezza delle variazioni di concentrazione della soluzione, il rapporto terreno/soluzione e le variazioni di struttura del terreno durante i processi di equilibrazione (35) (59-62). Alcuni esempi, focalizzati sulla precisione, sono riportati nell'appendice 2.

L'attendibilità del metodo analitico nell'intervallo di concentrazioni che è verosimile incontrare durante la prova deve essere controllata. Lo sperimentatore deve essere libero di mettere a punto un metodo appropriato sotto gli aspetti dell'esattezza, della precisione, della riproducibilità, dei limiti di rivelazione e del recupero. La tecnica sperimentale appresso descritta costituisce una guida per l'esecuzione della prova.

Un adeguato volume (ad esempio 100 cm^3) di $CaCl_2$0,01 M viene agitato per 4 ore insieme a un'adeguata massa (ad esempio 20 g) di terreno ad elevata capacità di adsorbimento, vale a dire ad elevato contenuto di carbonio organico e di argilla. Le masse e i volumi possono variare secondo le esigenze analitiche, ma un rapporto terreno/soluzione di 1 a 5 può rappresentare un punto di partenza adeguato. La miscela viene centrifugata, e la fase acquosa viene filtrata. A quest'ultima viene aggiunto un determinato volume della soluzione di riserva della sostanza sotto esame, in modo da ottenere una concentrazione nominale rientrante nel campo di concentrazioni che è verosimile incontrare durante la prova. Il volume non deve superare il 10 % del volume finale della fase acquosa, allo scopo di modificare il meno possibile la natura della soluzione di pre-equilibrazione. Si procede quindi all'analisi della soluzione.

Per tener conto delle sostanze artificiali impiegate nel metodo analitico e degli effetti matrice causati dal terreno va previsto un «bianco», consistente nel solo sistema terreno + soluzione di $CaCl_2$, senza aggiunta della sostanza sotto esame.

Per le misure di sorbimento si possono impiegare la cromatografia gas-liquido (GLC), la cromatografia in fase liquida ad alta pressione (HPLC), la spettrometria (ad esempio GC/spettrometria di massa, HPLC/spettrometria di massa) e la conta delle scintillazioni in fase liquida (per le sostanze radiomarcate). Indipendentemente dalla sua natura, un metodo analitico può ritenersi adeguato se il recupero è compreso fra il 90 % e il 110 % del valore nominale. Per consentire l'identificazione e la quantificazione dopo la ripartizione, i limiti di rivelazione del metodo analitico dovrebbero essere almeno due ordini di grandezza al di sotto della concentrazione nominale.

Le caratteristiche e i limiti di rivelazione del metodo analitico utilizzato per eseguire gli studi sull'adsorbimento sono importanti per definire le condizioni sperimentali e l'intera esecuzione dell'esame. Il presente metodo segue uno schema sperimentale generale e fornisce raccomandazioni e linee direttrici in vista di soluzioni alternative laddove la metodica analitica e le disponibilità di laboratorio imponessero limitazioni.

▼B

1.8.2. **Selezione dei rapporti ottimali terreno/soluzione**

Negli studi sui fenomeni di sorbimento, la scelta dei rapporti terreno/soluzione dipende dal coefficiente di distribuzione K_d e dal grado relativo di adsorbimento desiderato. La variazione di concentrazione della sostanza in soluzione determina la precisione statistica della misura, la quale dipende dalla forma dell'equazione di adsorbimento e, per quanto riguarda la rivelazione della concentrazione della sostanza chimica in soluzione, dalle limitazioni della metodologia analitica applicata. Pertanto, nella pratica generale, è utile adottare un numero limitato di rapporti fissi, nei quali la percentuale adsorbita sia superiore al 20 % e, meglio ancora, al 50 % (62); al tempo stesso si avrà cura che la concentrazione della sostanza sotto esame nella fase acquosa rimanga sempre abbastanza alta da poter essere misurata con precisione. Ciò ha particolare importanza quando le percentuali di adsorbimento sono elevate.

Un modo conveniente per scegliere i rapporti terreno/acqua più appropriati comincia da una valutazione di K_d attraverso studi preliminari o secondo tecniche di valutazione che abbiano dato buona prova (appendice 3). Il rapporto appropriato può quindi essere scelto in base a un grafico del rapporto terreno/soluzione in funzione di K_d per determinate percentuali fisse di adsorbimento (fig. 1). Tale grafico è basato sul presupposto che l'equazione di adsorbimento sia lineare ([1]). La relazione applicabile si ottiene rielaborando l'equazione 4 del K_d nella forma dell'equazione 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

ovvero, in forma logaritmica ed ammettendo che $R = m_{soil}/V_0$ e $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$

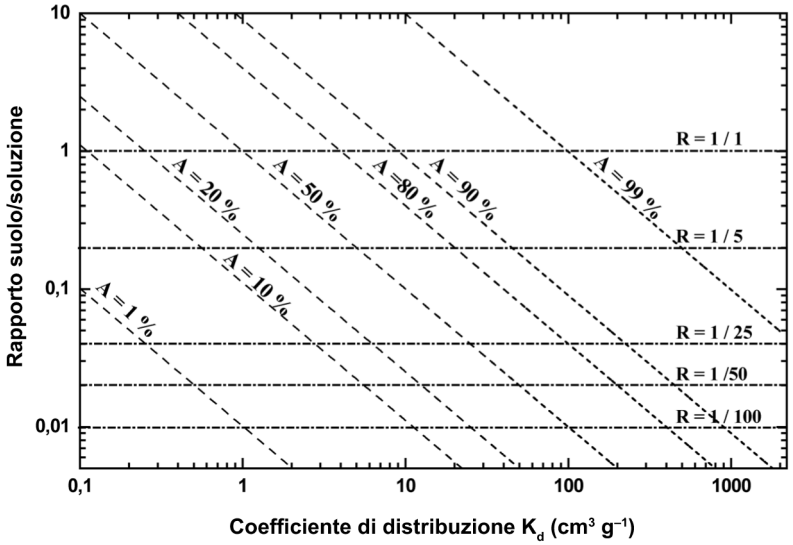


Fig. 1. Relazioni fra i valori di K_d e i vari rapporti terreno/soluzione, alle varie percentuali della sostanza sotto esame adsorbita

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

La figura 1 mostra i rapporti terreno/soluzione, espressi in funzione di K_d, per i vari livelli di adsorbimento. Ad esempio: per un rapporto terreno/soluzione di 1 a 5 e $K_d = 20$, l'adsorbimento dovrebbe essere dell'80 % circa. A parità di K_d, per ottenere un adsorbimento del 50 % andrebbe impiegato un rapporto di 1 a 25. Questa maniera di scegliere gli adeguati rapporti terreno/soluzione offre al ricercatore la flessibilità necessaria per rispondere alle esigenze sperimentali.

Le maggiori difficoltà s'incontrano quando la sostanza chimica viene adsorbita in misura molto elevata o molto bassa. Quando l'adsorbimento è basso, è raccomandabile adottare un rapporto terreno/soluzione di 1 a 1, anche se, per alcuni tipi di terreno ad elevato contenuto organico, può essere necessario ricorrere a rapporti più bassi, in modo da ottenere un impasto liquido. La metodologia analitica dovrà permettere di misurare piccole modifiche della concentrazione della soluzione; in caso contrario, le misure di adsorbimento saranno imprecise. D'altra parte, per valori molto elevati di K_d si può arrivare a rapporti terreno/soluzione di 1 a 100, per lasciare in soluzione una quantità significativa della sostanza chimica. Si avrà comunque cura di assicurare una buona miscelazione, e si lascerà al sistema un tempo adeguato per raggiungere l'equilibrio. Un'altra possibilità è quella di prevedere il valore di Kd applicando tecniche di valutazione fondate, ad esempio, sui valori di P_{ow} (appendice 3). Ciò potrebbe rivelarsi utile, specialmente nel caso delle sostanze chimiche scarsamente adsorbite/polari, con $P_{ow} < 20$, e di quelle lipofile/altamente sorbitive, con $P_{ow} > 10^4$.

1.9. ESECUZIONE DELL'ESPERIMENTO

1.9.1. **Condizioni sperimentali**

Tutta la sperimentazione deve essere effettuata a temperatura ambiente, possibilmente costante, compresa fra 20 °C e 25 °C.

Le condizioni di centrifugazione debbono permettere di eliminare dalla soluzione le particelle oltre 0,2 μm. Questo valore rappresenta le dimensioni limite fra le particelle solide e quelle colloidali. L'appendice 4 offre una guida per determinare le condizioni di centrifugazione.

Se l'apparecchiatura di centrifugazione disponibile non garantisce l'eliminazione delle particelle sopra gli 0,2 μm, la centrifugazione può essere associata alla filtrazione attraverso filtri da 0,2 μm. Per evitare perdite della sostanza sotto esame, questi debbono essere composti di un appropriato materiale inerte. Va in ogni caso assicurato che durante la filtrazione non si verifichino perdite della sostanza sotto esame.

1.9.2. **Primo momento: studio preliminare**

Le ragioni di uno studio preliminare sono già state indicate al capitolo «Campo di applicazione». Lo schema sperimentale suggerito qui appresso costituisce una guida per la sua esecuzione.

1.9.2.1. *Scelta dei rapporti ottimali terreno/soluzione*

Si ricorre a due tipi di terreno e a tre rapporti terreno/soluzione (sei esperimenti). Un tipo di terreno ha un elevato contenuto in carbonio organico e un basso contenuto in argilla, e l'altro ha un basso contenuto in carbonio organico e un elevato contenuto in argilla. Si suggeriscono i seguenti rapporti:

— 50 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/1),

▼B

— 10 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/5),

— 2 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/25).

La quantità minima di terreno da impiegare dipende dalle disponibilità del laboratorio e dall'efficacia del metodo analitico applicato. Per ottenere risultati attendibili si raccomanda comunque di impiegare non meno di 1 g, e preferibilmente 2 g.

Per verificare se la sostanza sotto esame è stabile nella soluzione di $CaCl_2$ e se eventualmente rimane adsorbita sulle pareti dei recipienti, si preparerà un campione di riferimento non contenente terreno, ma soltanto la sostanza in questione e la soluzione di $CaCl_2$0,01 M: esso verrà sottoposto esattamente alle stesse operazioni dei sistemi esaminati.

Per ogni terreno si preparerà un «bianco» contenente la stessa quantità di terreno e un volume totale di 50 cm^3 di soluzione di $CaCl_2$0,01 M (senza la sostanza sotto esame), che verrà sottoposto alla stessa procedura sperimentale. Esso servirà da riferimento di base durante l'analisi, per rivelare se sono presenti sostanze capaci di interferire o se il terreno è contaminato.

Tutti gli esperimenti, compresi quelli sul campione di riferimento e sui «bianchi», verranno effettuati almeno in doppio. Il numero totale di campioni da preparare per lo studio va stabilito in funzione della metodologia da seguire.

I metodi per lo studio preliminare e per quello principale sono genericamente gli stessi: se del caso, gli eventuali discostamenti vanno menzionati.

I campioni di terreno essiccati all'aria vengono equilibrati mantenendoli sotto agitazione per 12 h (tutta la notte precedente l'esperimento) insieme a un volume minimo di 45 cm^3 di $CaCl_2$0,01 M. Si aggiunge poi un certo volume della soluzione di riserva della sostanza sotto esame, fino a un totale di 50 cm^3. Il volume di soluzione di riserva aggiunto: a) non deve eccedere il 10 % dei 50 cm^3 di volume della fase acquosa, per alterare il meno possibile la natura della soluzione di pre-equilibrazione; b) deve condurre di preferenza a una concentrazione iniziale della sostanza sotto esame a contatto col terreno (Co) superiore di almeno due ordini di grandezza al limite di rivelazione del metodo analitico, per salvaguardare la capacità di eseguire misure esatte anche quando l'adsorbimento è forte (> 90 %) e determinare più tardi le isoterme di adsorbimento. Si raccomanda inoltre, se possibile, che la concentrazione iniziale (Co) della sostanza sotto esame non superi la metà del suo limite di solubilità.

Il seguente esempio indica il modo di calcolare la concentrazione della soluzione di riserva (Cst). Si parte dall'idea che il limite di rivelazione sia di 0,01 μg cm^{-3} e l'adsorbimento sia del 90 %: la concentrazione iniziale della sostanza sotto esame a contatto col suolo dovrebbe quindi essere preferibilmente uguale ad 1 μg cm^{-3} (due ordini di grandezza sopra il limite di rivelazione). Ammettendo che si sia aggiunto il massimo volume raccomandato della soluzione di riserva, cioè da 5 a 45 cm^3 della soluzione di equilibrazione di $CaCl_2$0,01 M (= 10 % della soluzione di riserva rispetto a 50 cm^3 di volume totale della fase acquosa), la concentrazione della soluzione di riserva dovrebbe essere di 10 μg cm^{-3}, cioè superiore di tre ordini di grandezza al limite di rivelazione del metodo analitico.

Il pH della fase acquosa deve essere misurato prima e dopo il contatto col terreno, poiché esso ha una funzione importante nell'intero processo di adsorbimento, specialmente per le sostanze ionizzabili.

▼B

La miscela deve essere agitata finché sia raggiunto l'equilibrio di adsorbimento. Il tempo di equilibrio nei terreni è assai variabile, secondo la natura del prodotto chimico e del terreno: in generale è sufficiente un periodo di 24 h (77). Nello studio preliminare, i campioni possono essere prelevati sequenzialmente su un periodo di 48 h di miscelazione (ad esempio 4. 8, 24, 48 h). Comunque, i tempi di analisi debbono essere considerati con flessibilità, tenendo conto dei programmi di lavoro del laboratorio.

Per l'analisi della sostanza sotto esame nella soluzione acquosa è possibile scegliere fra: a) il metodo in parallelo: b) il metodo in serie. Si noti che, sebbene il metodo in parallelo sia più tedioso sul piano sperimentale, il trattamento matematico dei risultati ne risulta semplificato (appendice 5). La scelta della metodologia da seguire spetta comunque allo sperimentatore, il quale terrà conto delle disponibilità materiali e delle risorse del laboratorio.

a) Metodo in parallelo: si preparano dei campioni con lo stesso rapporto terreno/soluzione, nel numero necessario per coprire gli intervalli di tempo ai quali si desidera studiare la cinetica di adsorbimento. Dopo centrifugazione e facoltativa filtrazione, la fase acquosa della prima provetta viene recuperata nel modo più completo possibile; si procede quindi alle misure dopo tempi adeguati (ad esempio dopo 4 h per la prima provetta, dopo 8 h per la seconda, dopo 24 h per la terza, ecc.).

b) Metodo in serie: per ciascun rapporto terreno/soluzione si prepara soltanto un campione in doppio. A determinati intervalli di tempo, la miscela viene centrifugata per separare le fasi. In una piccola aliquota della fase acquosa si ricerca immediatamente la sostanza sotto esame; dopo di che, l'esperimento prosegue sulla miscela originale. Se la centrifugazione è stata seguita dalla filtrazione, il laboratorio deve avere la possibilità di eseguire la filtrazione di piccole aliquote acquose. Per non modificare in modo significativo il rapporto terreno/soluzione e far diminuire la massa del soluto disponibile per l'adsorbimento durante la prova, si raccomanda che il volume totale delle aliquote prelevate non superi l'1 % del volume totale della soluzione.

Per ciascun tempo t_i si calcola la percentuale di adsorbimento A_{t_i}, sulla base della concentrazione nominale iniziale e della concentrazione misurata ai momenti t_i del prelievo, previa correzione per il bianco. Per valutare se la piattaforma di equilibrio è stata raggiunta, si riportano graficamente i valori di A_{t_i} in funzione del tempo (cfr. appendice 5, fig. 1) ([1]). Si calcola inoltre il valore di K_d all'equilibrio. Sulla base del valore di K_d ed utilizzando la fig.l si scelgono gli appropriati rapporti terreno/soluzione, in modo che l'adsorbimento percentuale risulti superiore al 20 % e, di preferenza, al 50 % (61). Tutte le equazioni applicabili e i principi per il tracciamento del grafico sono indicati al capitolo sulla presentazione dei dati e la relazione, nonché nell'appendice 5.

1.9.2.2. *Determinazione del tempo di equilibrazione all'adsorbimento e della quantità di sostanza sotto esame adsorbita all'equilibrio*

Come già detto, i grafici di A_{t_i} o di C_{aq}^{ads} in funzione del tempo permettono di stabilire se l'equilibrio all'adsorbimento è stato raggiunto e di valutare la quantità di sostanza sotto esame adsorbita all'equilibrio. Le figure 1 e 2 nell'appendice 5 mostrano alcuni esempi di tali grafici. Il tempo di equilibrio è quello necessario perché il sistema raggiunga una piattaforma.

([1]) Per valutare se la piattaforma di equilibro è stala raggiunta si potrebbero impiegare arche i grafici della concentrazione della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{ad}^{saq}) in funzione del tempo (cfr. appendice 5, fig. 2).

▼B

Se con un dato terreno non si raggiunge una piattaforma ma si ha un incremento continuo, la causa andrebbe cercata in certi fattori di complicanza, quali la biodegradazione o la diffusione lenta. La biodegradazione può essere evidenziata ripetendo l'esperimento su un campione di terreno sterilizzato. Se nemmeno in questo modo si raggiunge una piattaforma, lo sperimentatore dovrebbe esaminare l'eventualità che nei suoi specifici studi possano essere coinvolti altri fenomeni, e modificare adeguatamente le condizioni sperimentali (temperatura, tempi di agitazione, rapporti terreno/soluzione). Inoltre, spetta a lui decidere se proseguire il lavoro malgrado l'eventuale impossibilità di raggiungere un equilibrio.

1.9.2.3. *Adsorbimento alla superficie dei recipienti e stabilità della sostanza sotto esame*

Alcuni dati sulla stabilità della sostanza sotto esame e sul suo adsorbimento alla superficie dei recipienti possono essere ricavati analizzando i campioni di riferimento. Se si osserva una deplezione superiore all'errore standard implicito nel metodo analitico, si potrebbe pensare a una degradazione abiotica e/o ad un adsorbimento alla superficie del recipiente. Una distinzione fra questi due fenomeni può essere fatta lavando a fondo le pareti del recipiente con un volume noto di un opportuno solvente ed analizzando il liquido di lavaggio per ricercarvi la sostanza sotto esame. Se non si osserva alcun adsorbimento alla superficie dei recipienti, la deplezione evidenzia l'instabilità abiotica della sostanza sotto esame. Se si constata un adsorbimento, è necessario utilizzare recipienti in altro materiale. In ogni modo, i dati sull'adsorbimento così ottenuti non possono essere estrapolati direttamente all'esperimento terreno/soluzione, poiché la presenza del terreno influisce sull'adsorbimento.

Ulteriori informazioni sulla stabilità della sostanza sotto esame possono essere ricavate da un bilancio della massa progenitrice nel tempo. In altre parole, bisogna analizzare la fase acquosa, gli estratti del terreno e le pareti dei recipienti per ricercarvi la sostanza sotto esame. La differenza fra la massa della sostanza sotto esame aggiunta e la somma delle masse della sostanza sotto esame nella fase acquosa, negli estratti di terreno e nelle pareti dei recipienti corrisponde alla massa degradata c/o volatilizzata e/o non estratta. Per un corretto bilancio di massa, l'equilibrio di adsorbimento dovrebbe essere stato raggiunto durante l'esperimento.

Il bilancio di massa dev'essere eseguito tanto sui terreni quanto per un rapporto terreno/soluzione per ogni terreno che all'equilibrio dia luogo a una deplezione superiore al 20 % e preferibilmente al 50 %. Quando l'esperimento per la ricerca dei rapporti viene completato con l'analisi dell'ultimo campione della fase acquosa dopo 48 h, le fasi debbono essere separate per centrifugazione e facoltativa filtrazione. La fase acquosa dev'esere recuperata nella maggior quantità possibile, aggiungendo poi al terreno un solvente di estrazione adatto (coefficiente di estrazione non inferiore al 95 %) per estrarne la sostanza sotto esame. Si raccomanda di eseguire non meno di due estrazioni successive. Si determina poi la quantità di sostanza sotto esame negli estratti del terreno e dei recipienti e si calcola il bilancio di massa (equazione 10, «Dati e relazione»). Se essa è inferiore al 9 %, la sostanza sotto esame viene considerata instabile nella scala di tempo dell'esperimento. Gli studi vanno comunque proseguiti, tenendo conto dell'instabilità della sostanza sotto esame: in questo caso si raccomanda di esaminare ambedue le fasi nello studio principale.

▼B

1.9.2.4. *Secondo momento — Cinetica di adsorbimento per una data concentrazione della sostanza sotto esame*

Si impiegano cinque terreni, scelti dalla tabella 1. Può convenire includere fra di essi qualcuno di quelli impiegati nello studio preliminare (al limite, tutti}. In questo caso, le operazioni del secondo momento non vanno ripetute sui terreni impiegati nello studio preliminare.

Il tempo di equilibrio, il rapporto terreno/soluzione, il peso di campione di terreno, il volume della fase acquosa a contatto col terreno e la concentrazione della sostanza sotto esame nella soluzione debbono essere scelti sulla base dei risultati degli studi preliminari. Di preferenza, l'analisi deve essere eseguita dopo circa 2, 4, 6, 8 e possibilmente anche 10 e 24 ore di contatto; il tempo di agitazione può essere portato fino a un massimo di 48 h nel caso che una sostanza chimica richieda tempi di equilibrio più lunghi rispetto ai risultati della ricerca del campo di rapporti. In ogni modo, i tempi di analisi debbono essere considerati con flessibilità.

Ogni esperimento (un terreno ed una soluzione) deve essere fatto almeno in doppio, per poter valutare la varianza dei risultati. Per ogni esperimento va previsto un bianco, consistente nel terreno e nella soluzione di $CaCl_2$0,01 M, senza aggiunta della sostanza sotto esame, di peso e volume rispettivamente identici a quelli dell'esperimento. A titolo di salvaguardia contro gli imprevisti, si sottoporrà alla stessa procedura sperimentale un campione di controllo contenente soltanto la sostanza sotto esame nella soluzione di $CaCl_2$0,01 M (senza aggiunta di terreno).

L'adsorbimento percentuale va calcolato per ogni attimo A_{t_i} e/o intervallo di tempo $A_{\Delta t_i}$ (secondo necessità), e riportato in funzione del tempo. Vanno altresì calcolati il coefficiente di distribuzione K_d all'equilibrio e il coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico K_{oc} (per i composti chimici organici non polari).

Risultati degli esperimenti sulla cinetica di adsorbimento

Il valore lineare K_d è generalmente abbastanza preciso da poter descrivere il comportamento relativo al sorbimento nei terreni (35) (78) e rappresenta un'espressione della mobilità intrinseca dei prodotti chimici nel terreno. Ad esempio: sul piano generale, i prodotti chimici con $K_d < 1$ cm^3 g^{-1} sono considerati qualitativamente mobili. McCall et al. hanno inoltre messo a punto uno schema di classifica della mobilità basato sul valore di K_{oc} (16). Esistono infine schemi di classifica in funzione del dilavamento, basati su una relazione fra K_{oc} e DT-50 ([1]) (32) (79).

Da studi sull'analisi degli errori (61) risulta altresì che, partendo da una diminuzione della concentrazione della fase acquosa, non è possibile valutare con precisione i valori di K_d inferiori a 0,3 cm^3 g^{-1}, neppure quando si applica il rapporto terreno/soluzione più favorevole dal punto di vista della precisione, cioè quello di 1:1. In questo caso si raccomanda di analizzare ambedue le fasi (terreno e soluzione).

([1]) DT-50: tempo di degradazione per il 50 % della sostanza sotto esame.

▼B

Quanto alle osservazioni di cui sopra, si raccomanda di proseguire gli studi del comportamento all'adsorbimento di un prodotto chimico nel terreno e della sua mobilità potenziale, determinando le isoterme di adsorbimento secondo Freundlich, per tutti i sistemi per i quali il valore di K_d può essere determinato con esattezza, applicando il protocollo sperimentale descritto nel presente metodo. Una determinazione accurata è possibile se il valore ottenuto moltiplicando K_d per il rapporto terreno/soluzione è superiore a 0,3, quando le misure si basano sulla diminuzione di concentrazione nella fase acquosa (metodo indiretto), oppure a 0,1, quando vengono analizzate ambedue le fasi (metodo diretto) (61).

1.9.2.5 *Terzo momento — Isoterme di adsorbimento e cinetica di desorbimento/isoterme di desorbimento*

1.9.2.5.1. Isoterme di adsorbimento

Si impiegano cinque concentrazioni della sostanza sotto esame, tali da coprire preferibilmente due ordini di grandezza: per la scelta di queste concentrazioni vanno prese in conto la solubilità in acqua e le concentrazioni all'equilibrio acquoso che ne risultano. Lo stesso rapporto terreno/soluzione per ogni terreno deve essere mantenuto per tutta la durata dello studio. La prova di adsorbimento viene eseguita come sopra descritto, con la sola differenza che la fase acquosa viene analizzata una sola volta, al momento necessario per raggiungere l'equilibrio. come determinato al secondo momento. Si determinano le concentrazioni all'equilibrio nella soluzione e si calcola la quantità adsorbita partendo dalla deplezione della sostanza sotto esame nella soluzione, oppure col metodo diretto. La massa adsorbita, riferita all'unità di massa di terreno, viene poi riportata graficamente, in funzione della concentrazione all'equilibrio della sostanza sotto esame (cfr. «Dati e relazione»).

Risultati della sperimentazione per le isoterme di adsorbimento

Fra i modelli matematici per l'adsorbimento proposti fino ad oggi, le isoterme di Freundlich sono quelle più frequentemente utilizzate per descrivere i procedimenti di adsorbimento. Dati più particolareggiati sull'interpretazione e l'importanza dei modelli di adsorbimento sono reperibili in letteratura (41) (45) (80) (81) (82).

NB: va tenuto presente che, per varie sostanze, un confronto fra i valori di K_F (coefficienti di adsorbimento secondo Freundlich) è possibile soltanto se tali valori sono espressi nelle stesse unità (83).

1.9.2.5.2. Cinetica di desorbimento

Questo esperimento ha lo scopo di stabilire se una sostanza chimica viene adsorbita reversibilmente o irreversibilmente dal terreno. Questo dato è importante, poiché i processi di desorbimento hanno anch'essi una funzione rilevante nel comportamento di un composto chimico nelle condizioni effettive sul terreno. Inoltre, i dati di desorbimento contribuiscono utilmente alla modellizzazione computerizzata del dilavamento ed alla simulazione della scomparsa della sostanza dilavata. Se si vuole studiare il desorbimento, si raccomanda di eseguire lo studio appresso descritto su ciascun sistema per il quale è stato possibile determinare con accuratezza il valore di K_d nel precedente studio sulla cinetica di adsorbimento.

Analogamente alla cinetica di adsorbimento, per studiare la cinetica di desorbimento esistono due possibilità: a) il metodo in parallelo; b) il metodo in serie. La scelta della metodologia da seguire è lasciata allo sperimentatore, che dovrà considerare le disponibilità strumentali e le risorse del laboratorio.

▼B

a) Metodo in parallelo: per ciascun terreno scelto per lo studio sul desorbimento si preparano dei campioni con lo stesso rapporto terreno/soluzione, nel numero necessario per coprire gli intervalli di tempo ai quali si desidera studiare la cinetica di desorbimento. Di preferenza, vanno impiegati gli stessi intervalli di tempo utilizzati per la cinetica di adsorbimento; tuttavia, il tempo totale può essere esteso secondo necessità, in modo che il sistema possa raggiungere l'equilibrio di desorbimento. Per ogni esperimento (un terreno, una soluzione) si esegue un bianco. Esso consiste nel terreno e nella soluzione 0,01 M di $CaCl_2$, senza la sostanza sotto esame, nonché di un peso e un volume rispettivamente identici a quelli dell'esperimento. Quale termine di riferimento s'impiega la sostanza sotto esame nella soluzione 0,01 M di CaCl, (senza terreno), che viene sottoposta alla stessa procedura sperimentale. Tutte le miscele del terreno con la soluzione vengono agitate fino a raggiungimento dell'equilibrio di adsorbimento (come in precedenza al secondo momento). Le due fasi vengono quindi separate per centrifugazione, e la fase acquosa viene allontanata nella maggior misura possibile. Il volume della soluzione allontanata viene sostituito da un volume uguale di 0,01 M $CaCl_2$, senza la sostanza sotto esame, e le nuove miscele vengono nuovamente agitate. La fase acquosa della prima provetta viene recuperata nel modo più completo possibile e viene misurata, ad esempio, dopo 2 h, quella della seconda provetta dopo 4 h, quella della terza dopo 6 h, ecc. finché sia raggiunto l'equilibrio di desorbimento.

b) Metodo in serie: dopo l'esperimento sulla cinetica di adsorbimento, la miscela viene centrifugata e la fase acquosa viene eliminata nella maggior misura possibile. Il volume di soluzione eliminato viene sostituito da un uguale volume di $CaCl_2$0,01 M, senza la sostanza sotto esame. La nuova miscela viene agitata fino a raggiungere l'equilibrio di desorbimento. Durante questo periodo di tempo, ad intervalli di tempo definiti, la miscela viene centrifugata per separare le fasi. La sostanza sotto esame viene ricercata immediatamente in una piccola aliquota della fase acquosa; l'esperimento prosegue quindi con la miscela originale. Il volume delle singole aliquote deve essere inferiore all'1 % del volume totale. Si aggiunge alla miscela la stessa quantità di soluzione fresca di $CaCl_2$0,01 M, in modo da mantenere il rapporto terreno/soluzione e si prosegue l'agitazione fino al successivo intervallo di tempo.

Il desorbimento percentuale viene calcolato ad ogni momento (D_{t_i})e/o intervallo tempo ($D_{\Delta t_i}$), secondo le esigenze dello studio, e riportato graficamente in funzione del tempo. Si calcola anche il coefficiente di desorbimento Kd_{es} all'equilibrio. Tutte le equazioni applicabili sono riportate al capitolo «Presentazione dei dati e relazione», nonché nell'appendice 5.

Risultati dell'esperimento sulla cinetica di desorbimento

I grafici comuni del desorbimento percentuale D_{t_i} e dell'adsorbimento percentuale A_{t_i} in funzione del tempo permettono di valutare la reversibilità dei processi di adsorbimento. Se l'equilibrio di desorbimento viene raggiunto entro un tempo che può essere anche doppio del tempo ottenuto per l'equilibrio di adsorbimento, e il desorbimento totale risulta superiore al 75 % della quantità adsorbita, l'adsorbimento è considerato reversibile.

1.9.2.5.3. Isoterme di desorbimento

Le isoterme di desorbimento secondo Freundlich sono determinate sui terreni impiegati nell'esperimento sulle isoterme di adsorbimento. La prova di desorbimento viene eseguita come descritto al capitolo «Cinetica di desorbimento» con la sola differenza che la fase acquosa viene analizzata soltanto una volta, all'equilibrio di desorbimento. Si procede poi al calcolo della quantità di sostanza sotto esame desorbita. La quantità di sostanza sotto esame che resta adsorbita sul terreno all'equilibrio di desorbimento viene riportata graficamente in funzione delle concentrazioni di equilibrio della sostanza sotto esame in soluzione (cfr. «Presentazione dei dati e relazione» ed appendice 5).

▼B

2. **PRESENTAZIONE DEI DATI E RELAZIONE**

I dati analitici vanno presentati in forma tabulare (cfr. appendice 6). Vanno indicate le misure singole e le medie calcolate. Debbono essere fornite le rappresentazioni grafiche delle isoterme di adsorbimento. I calcoli vanno eseguiti come appresso indicato.

Ai fini della prova, il peso di 1 cm^3 di soluzione acquosa è considerato uguale a 1 g. Il rapporto terreno/soluzione può essere espresso in unità peso/peso o peso/volume con la stessa cifra.

2.1. ADSORBIMENTO

L'adsorbimento (A_{t_i}) si definisce come percentuale della sostanza sotto esame adsorbita dal terreno, riferita alla quantità presente all'inizio della prova, nelle condizioni sperimentali. Se la sostanza sotto prova è stabile e non viene adsorbita significativamente sulle pareti del recipiente, A_{t_i} può essere calcolato a ciascun momento t_i, con l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

dove:

A_{t_i} = percentuale di adsorbimento al momento t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno al momento t_i (μg);

m_0 = massa della sostanza sotto esame nella provetta, all'inizio della prova (μg).

Informazioni particolareggiate sul modo di calcolare la percentuale di adsorbimento A_{t_i} per i metodi in serie e in parallelo sono fornite nell'appendice 5.

Il coefficiente di distribuzione K_d è il rapporto fra il contenuto della sostanza nella fase terreno e la concentrazione di massa della sostanza della soluzione acquosa, nelle condizioni sperimentali, al momento in cui viene raggiunto l'equilibrio di adsorbimento.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

dove:

$C_s^{ads}(eq)$ = contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (ug g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento (μg cm^{-3}). Questa concentrazione viene determinata analiticamente tenendo conto dei valori indicati dai bianchi;

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza in soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg);

m_{soil} = quantità della fase terreno, espressa come massa secca di terreno (g);

V_0 = volume iniziale della fase acquosa a contatto col terreno (cm^3).

La relazione fra A_{eq} e K_d è data dall'espressione:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

dove:

A_{eq} = percentuale di adsorbimento all'equilibrio di adsorbimento, %.

Il coefficiente normalizzato di adsorbimento del carbonio organico K_{oc} collega il coefficiente di distribuzione K_d al contenuto di carbonio organico del campione di terreno:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (6)$$

dove:

% OC = percentuale di carbonio organico nel campione di terreno (g g^{-1}).

Il coefficiente K_{oc} rappresenta un valore singolo che caratterizza la ripartizione, principalmente delle sostanze chimiche organiche non polari, fra il carbonio organico contenuto nel terreno o nel sedimento e l'acqua. L'adsorbimento di queste sostanze chimiche è in relazione col contenuto organico del solido sorbente (7); quindi, i valori di K_{oc} dipendono dalle specifiche caratteristiche delle frazioni umiche che differiscono considerevolmente per la loro capacità di sorbimento a causa delle differenze di genesi, di provenienza ecc.

2.1.1. **Isoterme di adsorbimento**

L'equazione delle isoterme di adsorbimento secondo Freundlich collega la quantità della sostanza sotto esame adsorbita con la concentrazione della sostanza sotto esame in soluzione all'equilibrio (equazione 8).

I dati sono trattati come descritto alla voce «Adsorbimento», e per ciascuna provetta si calcola il contenuto della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno dopo la prova di adsorbimento [$C_s^{ads}(eq)$ (eq), altrove indicato come x/m]. Si parte dall'idea che l'equilibrio sia stato raggiunto e che $C_s^{ads}(eq)$ (eq) rappresenti il valore all'equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} \ (\mu g \ g^{-1}) \qquad (7)$$

L'equazione di adsorbimento secondo Freundlich è data dall'espressione:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \ (\mu g \ g^{-1}) \qquad (8)$$

oppure, in forma lineare, da:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

dove:

K_F^{ads} = coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich. Le sue dimensioni sono $cm^3 \ g^{-1}$ soltanto se 1/n = 1: in tutti gli altri casi, nelle dimensioni di K_F^{ads} [$\mu g^{1-1/n} \ (cm^3)^{1/n} \ g^{-1}$) è introdotto il coefficiente angolare 1/n;

n = costante di regressione; 1/n è generalmente compreso fra 0,7 e 1,0. Ciò sta a indicare che spesso i dati relativi al sorbimento si discostano leggermente dalla linearità.

Si tracciano i grafici delle equazioni (8) e (9), e si calcolano i valori di K_F^{ads} e di 1/n attraverso l'analisi di regressione applicando la (9). Si calcola inoltre il coefficiente di correlazione r^2 dell'equazione logaritmica. Un esempio dei due grafici è presentato nella figura 2.

▼B

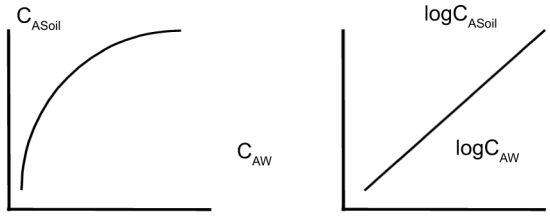


Fig. 2. Grafici di adsorbimento secondo Freundlich, normali e linearizzati

2.1.2. **Bilancio di massa**

Come bilancio di massa (MB) si definisce la percentuale di sostanza che può essere recuperata analiticamente dopo una prova di adsorbimento, espressa in funzione della quantità nominale di sostanza all'inizio della prova.

Il trattamento dei dati sarà diverso se il solvente è completamente miscibile con l'acqua. Nel caso del solvente miscibile con l'acqua, per determinare la quantità di sostanza recuperata per estrazione del solvente si potranno trattare i dati al modo descritto sotto la voce «Desorbimento». Se il solvente è meno miscibile con acqua, si dovrà procedere alla determinazione della quantità recuperata.

Il bilancio di massa MB per l'adsorbimento viene calcolato come appresso indicato: si ammette che il termine (m_E) corrisponda alla somma delle masse dei prodotti chimici sotto prova estratte dal terreno o dalla superficie del recipiente con un solvente organico:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

dove:

MB = bilancio di massa (%)

m_E = massa totale della sostanza sotto prova, estratta dal terreno e dalle pareti del recipiente in due stadi (μg)

C_0 = concentrazione iniziale di massa della soluzione sotto prova a contatto col terreno (μg/cm^3)

V_{rec} = volume del surnatante recuperato dopo l'equilibrio di adsorbimento (cm^{-3}).

2.2. DESORBIMENTO

Il desorbimento (D) si definisce come percentuale della sostanza sotto esame che viene desorbita, riferita alla quantità di sostanza precedentemente adsorbita, nelle condizioni sperimentali:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

dove:

D_{t_i} = percentuale di desorbimento al momento t_i (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno al momento t_i (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg).

Informazioni particolareggiate sul modo di calcolare la percentuale di desorbimento D_t^i per i metodi in parallelo e in serie figurano nell'appendice 5.

Il coefficiente apparente di desorbimento (K_{des}), nelle condizioni sperimentali, è il rapporto fra il contenuto della sostanza che rimane nella fase terreno e la concentrazione di massa della sostanza desorbita nella soluzione acquosa, al momento in cui l'equilibrio di desorbimento è raggiunto:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

dove:

K_{des} = coefficiente di desorbimento $cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa totale della sostanza sotto esame desorbita dal terreno all'equilibrio di desorbimento (μg)

V_T = volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante la prova di cinetica del desorbimento (cm^3).

Una guida per calcolare il $m_{aq}^{des}(eq)$ (eq) figura nell'appendice 5 sotto l'intestazione «Desorbimento».

Osservazioni:

Se la precedente prova di adsorbimento era stata eseguita col metodo in parallelo, il volume V_T nell'equazione 12 viene considerato uguale a V_0.

2.2.1. **Isoterme di desorbimento**

L'equazione delle isoterme di desorbimento secondo Freundlich collega il contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbita al terreno alla concentrazione della sostanza sotto esame nella soluzione, all'equilibrio di desorbimento (equazione 16).

Per ogni provetta, il contenuto della sostanza che rimane adsorbita al terreno all'equilibrio di desorbimento viene calcolata come segue:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$si definisce come:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A\ (\mu g) \qquad (14)$$

dove:

$C_s^{des}(eq)$ = contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbito sul terreno all'equilibrio di desorbimento (μg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = massa di sostanza determinata analiticamente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento (μg)

▼B

m_{aq}^{A} = massa della sostanza sotto esame residuata dall'equilibrio di adsorbimento a causa dell'incompleta sostituzione del volume (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa della sostanza della soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = volume della soluzione prelevata dalla provetta per la misura della sostanza sotto esame, all'equilibrio di desorbimento (cm^3)

V_R = volume del surnatante allontanato dalla provetta dopo il raggiungimento dell'equilibrio all'adsorbimento e sostituito dallo stesso volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3).

L'equazione di desorbimento secondo Freundlich è data dalla (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g \ g^{-1}) \quad (16)$$

oppure, in forma lineare:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

dove:

K_F^{des} = coefficiente di desorbimento secondo Freundlich

n = costante di regressione

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento (μg cm^{-3}).

Le equazioni (16) e (17) possono essere rappresentate graficamente, e i valori di K_F^{des} e 1/n vengono calcolati per analisi di regressione con l'equazione 17.

Osservazioni:

Se l'esponente l/n di adsorbimento o desorbimento secondo Freundlich è uguale a 1, le costanti di legame di adsorbimento o desorbimento secondo Freundlich (K_F^{ads} e K_F^{des}) saranno rispettivamente uguali alle costanti di equilibrio all'adsorbimento o al desorbimento (K_d e K_{des}), e il grafico di C_s in funzione di C_{aq} sarà lineare. Se gli esponenti sono diversi da 1, i grafici di Q in funzione di C_{aq} non saranno lineari, e le costanti di adsorbimento e desorbimento varieranno con le isoterme.

2.2.2. **Relazione**

La relazione deve comprendere i seguenti dati:

— Identificazione completa dei campioni di terreno utilizzati, comprendenti:

— coordinate geografiche della località (latitudine, longitudine),

— data di prelievo del campione,

▼B

— schema d'impiego (esempio: terreno agrario, foresta, ecc),

— profondità del prelievo,

— contenuto in sabbia/torba/argilla,

— valore del pH (come $CaCl_2$0,01 M),

— contenuto in carbonio organico,

— contenuto in sostanza organica,

— contenuto in azoto,

— rapporto C/N,

— capacità di scambio canonico (mmol/kg),

— tutte le informazioni relative alla raccolta e alla conservazione dei campioni di suolo,

— dove del caso, tutte le informazioni rilevanti ai fini dell'interpretazione dell'adsorbimento/desorbimento della sostanza sotto esame,

— riferimento ai metodi impiegati per la determinazione di ciascun parametro,

— informazioni sulla sostanza sotto esame, come del caso,

— temperatura della sperimentazione,

— condizioni di centrifugazione,

— procedimento analitico impiegato per analizzare la sostanza sotto esame,

— giustificazione per l'impiego di qualsiasi agente solubilizzante per la preparazione della soluzione di riserva della sostanza sotto esame,

— spiegazione delle correzioni apportate ai calcoli, se del caso,

— dati secondo il formulario dell'appendice 6 e presentazioni grafiche,

— tutte le informazioni e osservazioni che possono essere utili per interpretare i risultati delle prove.

3. **RIFERIMENTI**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 54O/O9-8S-O96. Date: 1/19SS.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-rate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/-Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048 April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{OC}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995); Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990). Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L, (1989), «The sorption of nonpolar organics by soils and sediments» in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M.Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L, and Dishburger H.J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M, Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R.C, Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J.. Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L, and Osgerby J.M., (1967), «Persistence of herbicides in soil» 175. J. Sci. Fd Agric, IS, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4.6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J.M, (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4. pp. 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem. Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J.W., (1975). «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971). «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J.W. (1972). «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I. pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A.. (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M, and Dekkers W.A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-3 50.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxidation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S.M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor».). Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L, (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C. A. I. and Hamaker J. W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J. (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase». CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems. Chapter 19. Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F. and Schachtschabel. Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag. Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L.. Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, Wl, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W.J. , Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, pp. S31-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C, (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-S46.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité». Revue de 1'Agric. 34 (4). pp. 319-322.

(74) Muller M., Kordel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kordel W., Kotthoff G., Muller M. (1995). «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C, and Harper S.S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H. H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.: Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Terce M., and Arvien J.C, (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

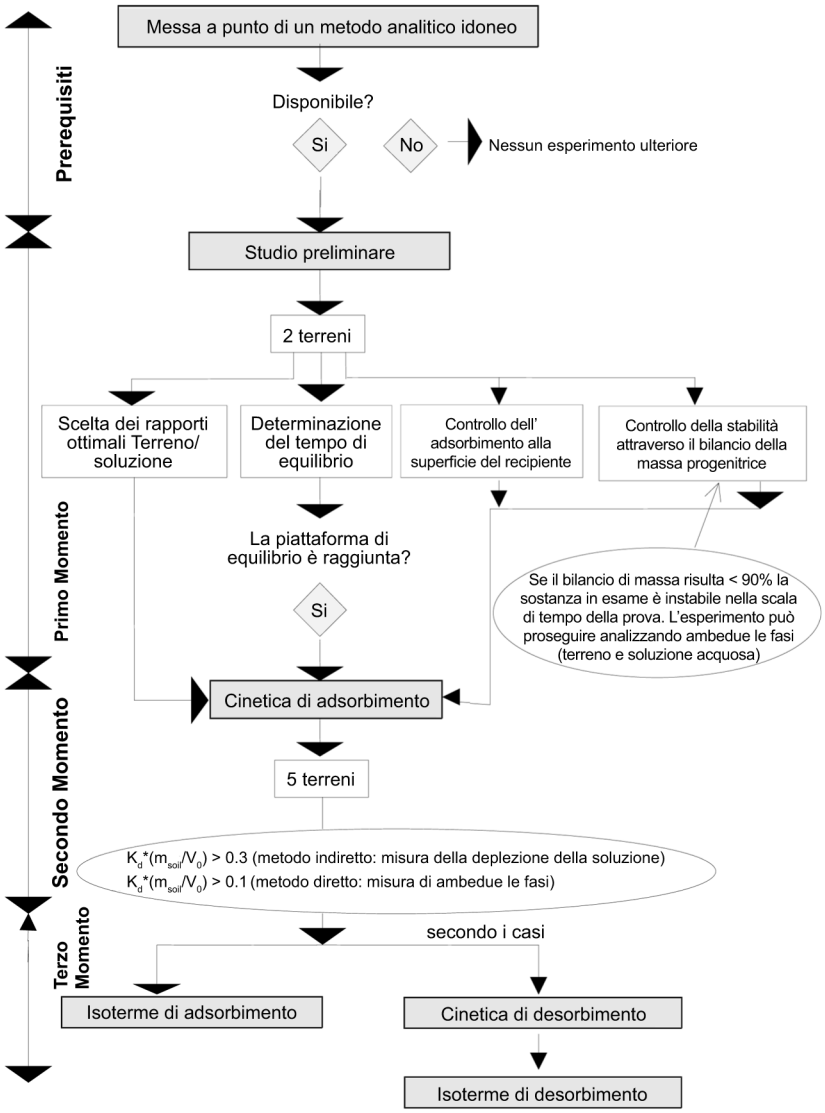
(84) Guth, J. A., (1985), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

APPENDICE 1

Schema di sperimentazione



▼B

APPENDICE 2

INFLUENZA DELLA PRECISIONE DEL METODO ANALITICO E DEL CAMBIAMENTO DI CONCENTRAZIONE SULLA PRECISIONE DEI RISULTATI RELATIVI ALL'ADSORBIMENTO

La seguente tabella (84) mostra chiaramente che, quando la differenza fra la massa iniziale (m_0 = 110 µg) e la massa all'equilibrio ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) della sostanza sotto esame nella soluzione è assai piccola, un errore del 5 % nella misura della concentrazione all'equilibrio conduce a un errore del 50 % nel calcolo della sostanza adsorbita nel terreno ($m_s^{ads}(eq)$) e del 52,4 % nel calcolo del K_d.

Quantità di terreno m_{soil} = 10 g

Volume di soluzione V_o = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)*$ (µg)	$C_s^{ads}(eq)*$ (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PER A = 9 %							
m_0 = 110 µg or C_0 = 1, 100 µg/cm^3	100	1,000	valore vero	10	1,00	valore vero	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PER A = 55 %							
m_0 = 110 µg or C_0 = 1, 100 µg/cm^3	50,0	0,500	valore vero	60,0	6,00	valore vero	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PER A = 99 %							
m_0 = 110 µg or C_0 = 1, 100 µg/cm^3	1,100	0,011	valore vero	108,9	10,89	valore vero	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

Dove:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq)$, $C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]\,V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = contenuto della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentrazione in massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, µg cm^{-3}

R = errore analitico nella determinazione di $m_{aq}^{ads}(eq)$

R‡ = errore calcolato dovuto all'errore analitico R.

▼B

APPENDICE 3

TECNICHE DI VALUTAZIONE PER K_d

1. Le tecniche di valutazione consentono di prevedere i valori di K_d basandosi, ad esempio, sulle correlazioni con i valori di P_{OW} (12) (39) (63-68), sui dati relativi alla solubilità in acqua (12) (19) (21) (39) (68-73), o su quelli relativi alla polarità ricavati applicando la HPLC in fase invertita (74-76). Come mostrato nelle tabelle 1 e 2, queste equazioni permettono di calcolare i valori di K_{oc} o di K_{om}, dai quali si ricava indirettamente il valore di K_d attraverso le equazioni:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Queste correlazioni si fondano essenzialmente su due supposizioni: 1) la principale influenza sull'adsorbimento di una sostanza viene esercitata dalla sostanza organica contenuta nel terreno; 2) le interazioni che si manifestano hanno principalmente un carattere non polare. Di conseguenza, tali correlazioni: 1) non possono essere applicate alle sostanze polari, o possono esserlo soltanto in misura limitata; 2) non possono essere applicate nei casi in cui il contenuto in sostanza organica del terreno è molto basso (12). Inoltre, sebbene si siano trovate correlazioni soddisfacenti fra i valori di P_{OW} e l'adsorbimento (19), lo stesso non può dirsi per le relazioni fra la solubilità in acqua e la misura dell'adsorbimento (19) (21); gli studi effettuati fino ad oggi hanno dato esiti assai contraddittori.

3. Nelle tabelle 1 e 2 sono indicati rispettivamente alcuni esempi di correlazione fra il coefficiente di adsorbimento e il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, nonché alcuni dati relativi alla solubilità in acqua.

Tabella 1

Esempi di correlazione fra il coefficiente di distribuzione all'adsorbimento e il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua [per ulteriori esempi cfr. (12) (68)]

Sostanza	Correlazioni	Autori
Uree sostituite	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Chloroganici aromatici	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Antiparassitari diversi	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Idrocarburi aromatici	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles e Mantoura (1987) (67)

Tabella 2

Esempi di correlazione fra il coefficiente di distribuzione all'adsorbimento e la solubilità in acqua [per ulteriori esempi cfr. (68) (69)].

Sostanza	Correlazioni	Autori
Antiparassitari diversi	$\log Kom = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Sostanze alifatiche e aromatiche clorurate	$\log K0m = (4,040 +/- 0,038) -(0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
a-naftolo	$\log Koc = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sostanze cicliche, alifatiche e aromatiche	$\log Koc = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Composti vari	$\log Kom = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

APPENDICE 4

CALCOLI PER LA DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI DI CENTRIFUGAZIONE

1. Il tempo di centrifugazione è dato dalla formula seguente, basata sul presupposto che le particelle siano sferiche e nella quale,

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

per semplificare, tutti i parametri sono espressi in unità non appartenenti al SI (g, cm).

dove:

ω = velocità angolare (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = giri al minuto

η = viscosità della soluzione (g s^{-1} cm^{-1})

r_p = raggio delle particelle (cm)

ρ_s = densità del terreno (g cm^{-3})

ρ_{aq} = densità della soluzione (g cm^{-3})

R_t = distanza dal centro del rotore della centrifuga alla sommità della soluzione nella provetta da centrifuga (cm)

R_b = distanza dal centro del rotore della centrifuga al fondo della provetta da centrifuga, cm

R_b-R_t = lunghezza della miscela terreno/soluzione della provetta da centrifuga, cm.

In pratica, per assicurare la separazione completa si usa generalmente raddoppiare i tempi calcolati.

2. L'equazione 1 può essere ulteriormente semplificata ammettendo che la viscosità (η) e la densità (ρ_{aq}) della soluzione siano uguali alla viscosità e alla densità dell'acqua a 25 °C; ne deriva che $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s-1 cm^{-1} e ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3}.

Il tempo di centrifugazione si ricava quindi dall'equazione (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Dall'equazione 2 risulta chiaro che, per stabilire le condizioni di centrifugazione (tempo e velocità) da applicare per ottenere la separazione delle particelle di una data grandezza (nel nostro caso, quelle da 0,1 μm di raggio), i parametri importanti sono due: a) la densità del terreno; b) l'«altezza» (R_b-R_t) della miscela contenuta nella provetta da centrifuga, cioè la distanza che una particella di terreno deve percorrere dalla sommità della soluzione al fondo della provetta. Ovviamente, a parità del volume di contenuto, tale altezza dipenderà dal quadrato del raggio della provetta.

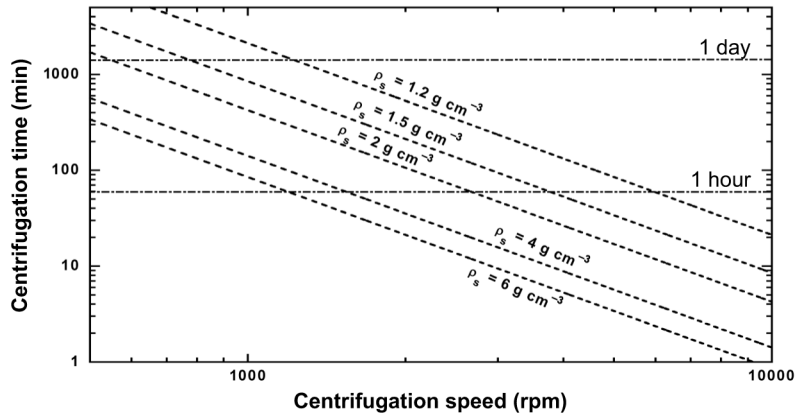
4. Nella figura 1 è rappresentato il modo di variare del tempo di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm), secondo le diverse densità del terreno (ρ_s) (Fig. 1a) e secondo la diversa altezza della miscela nelle provette (Fig. 1b). Dalla Fig. 1a risulta ovvia l'influenza della densità del terreno: ad esempio, per una centrifugazione classica a 3000, il tempo di centrifugazione è di 240 min per una densità di 1,2 g cm^3 ma scende a 50 min per una densità di 2,0 g cm^3. Analogamente, dalla Figura 1b si vede che, per una centrifugazione classica a 3000 rpm il tempo di centrifugazione è dell'ordine di 50 min. quando l'altezza della miscela è di 10 cm, ma scende a soli 7 min. per un'altezza di 1 cm. È comunque importante trovare un compromesso ottimale fra le condizioni di centrifugazione, che richiedono la minor altezza possibile, e la facilità di manipolazione da parte dello sperimentatore al momento di separare le fasi dopo la centrifugazione.

▼B

5. Nello stabilire le condizioni sperimentali per la separazione delle fasi terreno/soluzione non va altresì trascurata la possibile esistenza di una terza «pseudofase», costituita dai colloidi. Le particelle colloidali, di diametro inferiore a 0,2 μm, possono avere un effetto importante sull'intero meccanismo di adsorbimento di una data sostanza in una sospensione di terreno. Quando la centrifugazione viene eseguita al modo sopra descritto, i colloidi restano nella fase acquosa e vengono analizzati insieme a quest'ultima, e i dati relativi ai loro effetti vanno perduti.

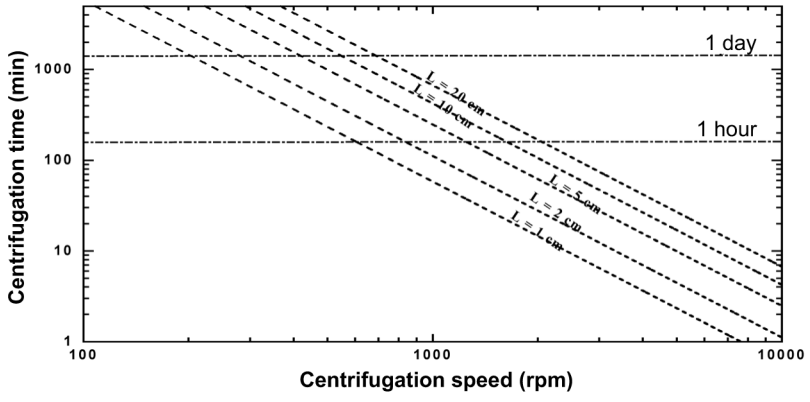
   Se il laboratorio che esegue l'analisi è dotato di strumenti per l'ultracentrifugazione o l'ultrafiltrazione, l'adsorbimento/desorbimento di una sostanza nel terreno può essere studiato più a fondo, per approfondire la maniera in cui la sostanza sotto esame viene adsorbita dai colloidi. In questo caso, per separare le tre fasi (terreno, colloidi, soluzione) si dovrebbe procedere a un'ultracentrifugazione a 60 000 rpm o un'ultrafiltrazione su filtri con pori da 100 000 dalton. La sostanza sotto esame va ricercata in tutte e tre le fasi, perciò il protocollo di sperimentazione dovrebbe essere modificato di conseguenza.

Fig. 1a



Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm) per differenti densità (ρ_s). dei terreni R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} e ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} a 25 °C.

Fig. 1b



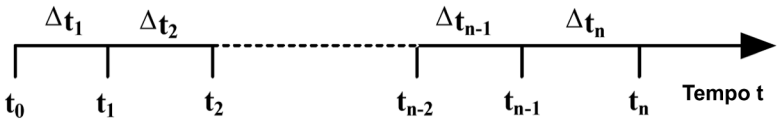
Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione {rpm) per differenti altezze della miscela nella provetta (R_b-R_t) = L, R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-3}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} a 25 °C e ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

APPENDICE 5

CALCOLO DELL'ADSORBIMENTO A (%) E DEL DESORBIMENTO D (%)

Lo schema cronologico del procedimento è il seguente:



Per tutti i calcoli si parte dal presupposto che la sostanza sotto esame sia stabile e non rimanga significativamente adsorbita sulle pareti del recipiente.

ADSORBIMENTO A (A %)

a) *Metodo in parallelo*

La percentuale di adsorbimento è calcolata per ciascuna provetta (i) a ciascun attimo (t_i), secondo l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)\ (^1)$$

I termini di quest'equazione possono essere calcolati come segue:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

dove:

A_{t_i} = percentuale di adsorbimento (%) all'attimo t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame sul terreno all'attimo t_i in cui viene eseguita l'analisi (μg)

m_0 = massa della sostanza sotto esame nella provetta, all'inizio della prova (μg)

C_0 = concentrazione di massa iniziale della soluzione sotto esame a contatto col terreno (μg cm^{-3})

(1) Equazione applicabile tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'attimo t_i in cui l'analisi viene effettuata (μg cm^{-3}); questa concentrazione viene determinata analiticamente tenendo conto dei valori forniti dai «bianchi»

V_0 = volume iniziale della soluzione di prova a contatto col terreno (cm^3).

I valori della percentuale di adsorbimento A_{t_i} o $C_{aq}^{ads}(t_i)$ vengono riportati graficamente in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale viene raggiunto l'equilibrio di sorbimento. Esempi di questi grafici sono riportati rispettivamente nella fig. 1 e fig. 2.

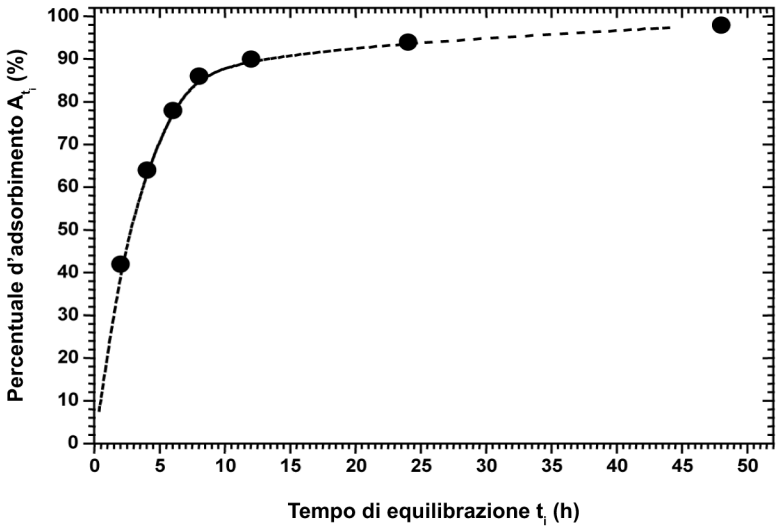


Fig. 1.

Grafico di equilibrio all'adsorbimento

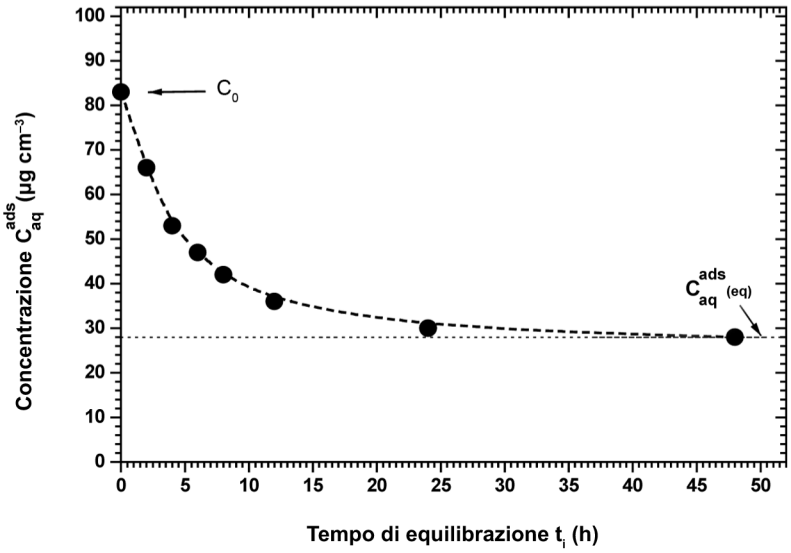


Fig. 2.

Concentrazione di massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{aq}) in funzione del tempo

▼B

b) *Metodo in serie*

Nelle equazioni che seguono si è tenuto conto del fatto che la procedura di adsorbimento viene eseguito attraverso misure della sostanza sotto esame su piccole aliquote della fase acquosa, eseguite a specifici intervalli di tempo.

— Durante ciascun intervallo di tempo, la quantità di sostanza adsorbita dal terreno si calcola come segue:

— per il primo intervallo di tempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— per il secondo intervallo di tempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— per il terzo intervallo di tempo $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— per l'ennesimo intervallo di tempo $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— La percentuale di adsorbimento ad ogni intervallo di tempo $A_{\Delta t_i}$, si calcola con l'equazione seguente:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)\ (1)$$

mentre la percentuale di adsorbimento (A_{t_i}) a un dato attimo t_i si ricava con l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)\ (1)$$

Si riportano graficamente i valori dell'adsorbimento A_{t_i} o $A_{\Delta t_i}$ (secondo le necessità dello studio) in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale si raggiunge l'equilibrio di sorbimento.

— Al tempo di equilibrio t_{eq}:

— la massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno è:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)\ (1)$$

(1) Equazione applicabili tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

— la massa della sostanza sotto esame nella soluzione è:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— la percentuale di adsorbimento all'equilibrio è:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)\ (^1)$$

I parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$	=	massa di sostanza adsorbita sul terreno, rispettivamente durante gli intervalli di tempo Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} (μg);
$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n^{ads}(t_n)$	=	massa della sostanza misurata in un'aliquota $m_s^{ads}(eq)$ rispettivamente agli attimi t_1, t_2, ..., t_n (μg);
$m_s^{ads}(eq)$	=	massa della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg);
$m_{aq}^{ads}(eq)$	=	massa della sostanza nella soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg);
v_a^A	=	volume dell'aliquota nella quale viene misurata la sostanza in esame (cm^3);
$A_{\Delta t_i}$	=	percentuale di adsorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_1 (%);
A_{eq}	=	percentuale di adsorbimento all'equilibrio (%).

DESORBIMENTO D(%)

Quale tempo iniziale t_0 dell'esperimento di cinetica del desorbimento si considera il momento in cui il massimo volume recuperato della soluzione della sostanza sotto esame (dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento) è sostituito da un uguale volume di soluzione di $CaCl_2$ M.

a) *Metodo in parallelo*

All'attimo t_i, si misura la massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa prelevata dalla provetta i V_r^i e si calcola la massa desorbita con l'equazione:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

All'equilibrio di desorbimento è $t_i = t_{eq}$, e pertanto è $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

La massa della sostanza sotto esame desorbita durante l'intervallo di tempo (Δt_i) è data dall'equazione:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

La percentuale di desorbimento si calcola:

all'attimo t_i, con l'equazione:

(1) Equazione applicabili tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

durante l'intervallo di tempo (Δt_1) con l'equazione:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

dove:

D_{t_i} = percentuale di desorbimento all'attimo t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = percentuale di desorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_1 (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita all'attimo t_1, (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita durante l'intervallo di tempo Δt_i (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame misurata analiticamente all'attimo t_1 nel volume V_r^i,di soluzione prelevata per l'analisi (μg)

m_{aq}^{A} = massa della sostanza sotto esame rimasta all'equilibrio di adsorbimento per effetto dell'incompleta sostituzione del volume (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella soluzione all'equilibrio ed adsorbimento (μg)

V_R = volume del surnatante eliminato dal tubo dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento in sostituzione dello stesso volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ soluzione (cm^3)

V_r^i = volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misura della sostanza sotto esame, nell'esperimento di cinetica di desorbimento (cm^3).

Si riportano graficamente i valori del desorbimento D_{t_i} o $D_{\Delta t_i}$ (secondo le necessità dello studio) in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale si raggiunge l'equilibrio di desorbimento.

b) *Metodo in serie*

Le seguenti equazioni tengono conto del fatto che il precedente processo di adsorbimento era stato effettuato misurando la sostanza sotto esame in piccole aliquote (v_a^A) della fase acquosa (cfr. punto 14.9., «1.9. Esecuzione dell'esperimento», metodo in serie). Si ammette quanto segue: a) il volume del surnatante allontanato dal tubo dopo l'esperimento sulla cinetica di adsorbimento è sostituito dallo stesso volume (V_R) di soluzione 0,01 M di $CaCl_2$; b) il volume totale di fase acquosa a contatto col terreno (V_T) durante l'esperimento di cinetica di desorbimento rimane costante ed è espresso dall'equazione:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

All'attimo t_i:

— si misura la massa della sostanza sotto esame in una piccola aliquota $\left(v_a^D\right)$ e si calcola la massa desorbita con l'equazione:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— all'equilibrio di desorbimento è $t_i = t_{eq}$ e pertanto è $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— si calcola la percentuale di desorbimento D_{t_i} con la seguente equazione:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

Per l'intervallo di tempo (Δt_i):

la quantità di sostanza desorbita durante ciascun intervallo di tempo si calcola come segue:

— per il primo intervallo di tempo, $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \quad \text{and} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— per il secondo intervallo di tempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ and}$$
$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— per l'ennesimo intervallo di tempo, $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

In conclusione, la percentuale $D_{\Delta t_i}$, di desorbimento per ciascun intervallo di tempo si calcola con l'equazione

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{24}$$

dove la percentuale di desorbimento D_{t_i} all'attimo t_i è data dall'equazione:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{25}$$

▼B

dove i parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa della sostanza che rimane rispettivamente adsorbita sul terreno dopo gli intervalli di tempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg)

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa della sostanza di prova rispettivamente desorbita durante gli intervalli di tempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg)

$m_s^{des}(t_1)$, $m_s^{des}(t_2)$,... , $m_s^{des}(t_n)$ = massa della sostanza rispettivamente misurata in un'aliquota ai momenti (v_a^D) t_1,t_2,..., t_n(μg)

V_T = volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante l'esperimento di cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie (cm^3);

m_{aq}^A = massa della sostanza sotto esame rimasta dopo l'equilibrio di adsorbimento per effetto della sostituzione incompleta del volume, (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volume del surnatante allontanato dalla provetta dopo il raggiungimento dell'equilibrio di adsorbimento e sostituita dallo stesso volume di soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ (cm^3);

v_a^D = volume dell'aliquota prelevata a fini analitici dalla provetta i), durante l'esperimento di cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

APPENDICE 6

ADSORBIMENTO-DESORBIMENTO NEI SUOLI: FORMULARI DI PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Idoneità del metodo analitico

Suolo pesato	g	
Suolo: massa secca	g	
Volume di soluzione $CaC1_2$	cm^3	
Concentrazione nominale soluzione finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentrazione analitica soluzione finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Principio del metodo analitico impiegato:

Taratura del metodo analitico:

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitica seguita: Indiretta ☐ In parallelo ☐ In serie ☐ Diretta ☐

Prova di adsorbimento: campioni esaminati

	Simbolo	Unità	Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione	
N. della provetta										
Suolo pesato	—	g								
Suolo: massa secca	m_{soil}	g								
Volume d'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	cm^3								
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ per equilibrare il suolo		cm^3								
Volume della soluzione di riserva		cm^3								
Volume totale della fase acquosa a contatto col suolo	V_0	cm^3								
Concentrazione iniziale della soluzione di prova	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Massa della sostanza in esame all'inizio della prova	m_0	µg								

▼B

	Simbolo	Unità	Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione	
Dopo agitazione e centrifugazione										
METODO INDIRETTO										
Metodo parallelo										
Concentrazione sostanza in esame fase acquosa (compresa correzione del bianco)	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Metodo in serie										
Massa di sostanza in esame misurata nell'aliquota V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
METODO DIRETTO										
Massa della sostanza in esame adsorbita nel suolo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Concentrazione dell'adsorbimento										
Adsorbimento	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Media										
Coefficiente di adsorbimento	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Media										
Adsorbimento	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Media										

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Prova di adsorbimento: bianchi e controllo

	Simbolo	Unità	Bianco		Bianco		Controllo	
Provetta N.								
Suoli pesati		g					0	0
Quantità d'acqua nel suolo pesato (calcolata)		cm^3					—	—
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ aggiunta		cm^3						
Volume della soluzione di riserva della sostanza in esame aggiunta		cm^3	0	0				
Volume totale della fase acquosa (calcolata)		cm^3					—	—

▼B

	Simbolo	Unità	Bianco		Bianco		Controllo	
Concentrazione iniziale della sostanza in esame della fase acquosa		μg cm^{-3}						
Dopo agitazione e centrifugazione								
Concentrazione nella fase acquosa		μg cm^{-3}						

Osservazione: aggiungere colonne se necessario.

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: °C

Bilancio di massa

	Simbolo	Unità				
Provetta n.						
Suolo pesato	—	g				
Suolo: massa secca	m_{soil}	g				
Volume d'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	ml				
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ per equilibrare il suolo		ml				
Volume della soluzione di riserva		cm^3				
Volume totale della fase acquosa a contatto col suolo	V_0	cm^3				
Concentrazione iniziale della soluzione in esame	C_0	μg cm^{-3}				
Tempo di equilibrazione	—	h				
Dopo agitazione e centrifugazione						
Concentrazione della sostanza in esame. Fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento, compresa la correzione per il bianco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}				
Tempo di equilibrazione	t_{eq}	h				
I[a] diluizione con solvente						
Volume eliminato di fase acquosa	V_{rec}	cm^3				
Volume aggiunto di solvente	ΔV	cm^3				
I[a] estrazione col solvente						
Segnale analizzato nel solvente	S_{E1}	var.				
Concentrazione della sostanza in esame nel solvente	C_{E1}	μg cm^{-3}				

▼B

	Simbolo	Unità				
Massa della sostanza estratta dal suolo e dalle pareti del recipiente	m_{E1}	µg				
2ª diluizione col solvente						
Volume di solvente eliminato	ΔV_s	cm^3				
Volume di solvente aggiunto	$\Delta V'$	cm^3				
2ª estrazione col solvente						
Segnale analizzato nella fase solvente	S_{E2}	var.				
Concentrazione della sostanza in esame nel solvente	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massa della sostanza estratta dal suolo e dalle pareti del recipiente	m_{E2}	µg				
Massa totale della sostanza in esame estratta in due fasi	m_E	µg				
Bilancio di massa	MB	%				

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: .....°C

Isoterme di adsorbimento

	Simbolo	Unità								
Provetta n.										
Suolo pesato	—	g								
Suolo: massa secca	E	g								
Volume dell'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	cm^3								
Volume di soluzione di 0,01 $CaCl_2$ M necessaria per equilibrare il suolo		cm^3								
Volume di soluzione di riserva aggiunto		cm^3								
Volume totale di fase acquosa a contatto col suolo (calcolato)	V_0	cm^3								
Soluzione della concentrazione	C_0	µg cm^{-3}								
Tempo di equilibrio	—	h								

▼B

	Simbolo	Unità								
Dopo agitazione e centrifugazione										
Concentrazione della sostanza nella fase acquosa, compresa la correzione per il bianco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Massa adsorbita per unità di suolo	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Analisi di regressione:

valore di K_F^{ads}:

valore di 1/n:

coefficiente di regressione r^2:

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitica seguita: Indiretta ☐ Parallel ☐ In serie ☐

Prova di desorbimento

		Simbolo	Unità	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo
N. della provetta proveniente dallo stadio di adsorbimento							
Massa della sostanza adsorbita sul suolo all'equilibrio di adsorbimento		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume di fase acquosa eliminato e sostituito da 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Volume totale di fase acquosa a contatto col suolo	PM	V_0	cm^3				
	SM	v_T	cm^3				
Massa della sostanza in esame rimasta dopo l'equilibrio di adsorbimento per effetto della sostituzione incompleta del volume		m_{aq}^A	µg				
Cinetica di desorbimento							
Massa misurata di sostanza desorbita dal suolo al momento t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misura della sostanza in esame	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Massa della sostanza desorbita dal suolo al momento t_i (calcolata)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massa della sostanza desorbita dal suolo durante l'intervallo di tempo Δt_i (calcolata)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbolo	Unità	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo
Percentuale di desorbimento						
Desorbimento al tempo t_i	D_{ti}	%				
Desorbimento nell'intervallo di tempo di Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficiente di desorbimento apparente	K_{des}					

PM: Metodo in parallelo.

SM: Metodo in serie.

▼B

C.19. STIMA DEL COEFFICIENTE DI ADSORBIMENTO (k_{OC}) SUL TERRENO E SUI FANGHI DI ACQUE DA SCARICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

1. METODO

Il metodo qui descritto corrisponde al TG121 (2001) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Le caratteristiche di adsorbimento delle sostanze presenti nei terreni o nei fanghi di acque da scarico possono essere descritte con parametri determinati per via sperimentale tramite il metodo di prova C.18. Un parametro importante è il coefficiente di adsorbimento, definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza nel suolo/fango e la concentrazione della sostanza stessa nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento. Il coefficiente di adsorbimento K_{oc} normalizzato al contenuto di carbonio organico del terreno è un buon indicatore della capacità a formare legami di una sostanza chimica alla componente organica del suolo e dei fanghi di acque da scarico e permette di fare confronti tra diverse sostanze chimiche. Questo parametro può essere stimato mediante correlazioni con la solubilità in acqua e con il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Il metodo sperimentale descritto in questo test consente di stimare il coefficiente di adsorbimento K_{oc} nel suolo e nei fanghi di acque da scarico mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (8). L'affidabilità dei valori stimati con questo metodo è superiore a quella ottenuta tramite QSAR. (relazione quantitativa struttura-attività) (9). Trattandosi di un metodo di stima, non può sostituire completamente gli esperimenti di equilihrio in batch usati nel metodo di prova 18. Tuttavia, stimare il valore K_{oc} può essere utile nella scelta dei parametri più appropriati per gli studi di adsorbimento-desorbimento secondo il metodo di prova C.18 e a tal fine si calcola il valore K_d (coefficiente di distribuzione) o K_f (coefficiente di adsorbimento di Freundlich) in base all'equazione 3 (cfr. punto 1.2).

1.2. DEFINIZIONI

K_d: si definisce coefficiente di distribuzione il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio C di una sostanza in esame disciolta in un sistema a due fasi composto da un mezzo adsorbente (terreno o fanghi di acque da scarico) e una fase acquosa; è un valore adimensionale quando le concentrazioni in entrambe le fasi sono espresse in termini di peso/peso. Se la concentrazione nella fase acquosa è indicata in termini di peso/volume, il valore sarà espresso in unità ml g^{-1}. Il valore di K_d può variare in base alle proprietà di adsorbimento e col variare della concentrazione.

$$K_d = \frac{C_{suolo}}{C_{aq}} or \frac{C_{fango}}{C_{aq}} \quad (1)$$

dove:

C_{suolo} = concentrazione della sostanza in esame nel terreno all'equilibrio ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{fango} = concentrazione della sostanza in esame nel fango all'equilibrio ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$),

▼B

K_f: il coefficiente di adsorbimento di Freundlich è definito come la concentrazione della sostanza in esame nel suolo o nei fanghi di acque da scarico (x/m) quando la concentrazione all'equilibrio nella fase acquosa C_{aq} è uguale a uno; le unità si riferiscono a $\mu g \cdot g^{-1}$ di sostanza adsorbente. Il valore può variare in base alle proprietà adsorbenti.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n \cdot \log C_{aq}} \quad (2)$$

dove:

x/m = quantità (in μg) di sostanza in esame x adsorbita a contatto con una quantità (in g) di sostanza adsorbente m all'equilibrio

l/n = pendenza dell'isoterma di adsorbimento di Freundlich

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: il coefficiente di distribuzione (K_d) o il coefficiente di adsorbimento di Freundlich (K_f) normalizzati al contenuto di carbonio organico (f_{oc}) della sostanza adsorbente; specialmente per le sostanze chimiche non ionizzate fornisce un'indicazione approssimativa dell'entità di adsorbimento tra una sostanza e il mezzo adsorbente e consente di effettuare confronti tra diverse sostanze chimiche. A seconda delle dimensioni di K_d e K_f, K_{oc} può essere un valore adimensionale o essere espresso in $\mu g \cdot g^{-1}$ di sostanza organica.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}(\text{valore adimensionale or } ml \cdot g^{-1}) \text{ or } \frac{Kf}{foc}(\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

La relazione tra K_{oc} e K_d non è sempre lineare, pertanto i valori di K_{oc} possono variare da terreno a terreno, anche se la loro variabilità è notevolmente minore rispetto i valori di K_d o di K_f.

Il coefficiente di adsorbimento (K_{oc}) viene ricavato dal fattore di capacità (k') usando un diagramma di taratura log k'/log K_{oc} dei composti di riferimento selezionati.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

dove:

t_R = tempo di ritenzione in HPLC del test e della sostanza di riferimento (minuti)

t_0 = tempo morto in HPLC (minuti) (cfr. punto 1.8.2).

P_{ow}: il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua è definito come il rapporto tra le concentrazioni di una sostanza disciolta in n-ottanolo e quella disciolta in acqua; si tratta di una valore adimensionale

$$Pow = \frac{C_{octanol}}{Caq}(= Kow) \quad (5)$$

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Prima di applicare il metodo è opportuno conoscere la formula di struttura, la purezza e la costante di dissociazione (se la sostanza è ionizzabile). Sono utili anche informazioni sulla solubilità in acqua e in solventi organici, sul coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua e sulle caratteristiche di idrolisi.

▼B

Per stabilire una correlazione tra i tempi di ritenzione in HPLC che riguardano la sostanza in esame con il suo coefficiente di adsorbimento K_{oc} occorre costruire un grafico di taratura log K_{oc}/log k' che comprenda almeno sei punti di riferimento, di cui almeno uno al di sopra e uno al di sotto del valore previsto per la sostanza in esame. L'accuratezza del metodo può essere migliorata in modo significativo utilizzando sostanze di riferimento che presentino affinità strutturali con la sostanza in esame. Se tali dati non sono disponibili, la selezione delle sostanze di taratura è affidata al giudizio dell'operatore. In tal caso è consigliabile scegliere una serie più generale di sostanze strutturalmente eterogenee. Le sostanze e i valori di K_{oc} che possono essere utilizzati per i fanghi di acque da scarico e per il terreno sono elencati, rispettivamente, nella tabella 1 e nella tabella 3 dell'appendice. La scelta di altre sostanze di riferimento va motivata.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

L'HPLC viene eseguita con colonne analitiche impaccate con una fase solida commerciale di cianopropile contenente gruppi lipofili e polari. Si utilizza inoltre una fase stazionaria moderatamente polare su una matrice di silice:

— O— Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silice	spaziatore non polare	gruppo polare

Il principio del metodo è analogo al metodo di prova A.8 (coefficiente di ripartizione, metodo per HPLC). Durante il passaggio nella colonna insieme alla fase mobile la sostanza in esame interagisce con la fase stazionaria. La ripartizione tra la fase mobile e la fase stazionaria provoca un rallentamento della sostanza in esame. La doppia composizione della fase stazionaria, che ha gruppi polari e non polari, consente l'interazione tra i gruppi polari e non polari di una molecola in maniera analoga a quanto avviene per le sostanze organiche nelle matrici di terreno o di fango. Ciò permette di stabilire una relazione tra il tempo di ritenzione in colonna ed il coefficiente di adsorbimento sulla sostanza organica.

Il pH influenza in maniera significativa le caratteristiche di adsorbimento, specie per le sostanze polari. Nei terreni agricoli o nei collettori degli impianti di trattamento dei fanghi di acque da scarico il pH varia normalmente tra 5,5 e 7,5. Per le sostanze ionizzabili, nei casi in cui almeno il 10 % del composto in esame verrà dissociato nel range di pH compreso tra 5,5 e 7,5, occorre eseguire due test, uno sulla forma ionizzata e l'altro sulla forma non ionizzata, utilizzando soluzioni tampone adeguate.

Poiché la relazione tra il tempo di ritenzione nella colonna per HPLC e il coefficiente di adsorbimento è il solo criterio impiegato per la stima, non è necessario ricorrere a metodi analitici quantitativi, ma basta solo la determinazione del tempo di ritenzione. Avendo a disposizione un gruppo adeguato di sostanze di riferimento e potendo applicare condizioni sperimentali standard, il metodo offre una tecnica rapida ed efficiente per stimare il coefficiente di adsorbimento K_{oc}.

1.5. APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo per HPLC è applicabile a sostanze chimiche (marcate o non marcate) per cui è disponibile un sistema di rilevazione adeguato (ad esempio spettrofotometro o rilevatore di radioattività) e che siano sufficientemente stabili per tutta la durata dell'esperimento. Può rivelarsi particolarmente utile per sostanze chimiche difficili da studiare con altri sistemi sperimentali (ad esempio sostanze volatili, sostanze non solubili in acqua ad una concentrazione analiticamente misurabile, sostanze con elevata affinità verso la superficie dei sistemi di incubazione). Il metodo è applicabile a miscele che danno bande di eluizione non risolte. In tal caso è opportuno determinare il limite superiore e inferiore del valore log K_{oc} dei composti della miscela di prova.

▼B

Le impurezze possono talvolta interferire con l'interpretazione dei risultati HPLC, ma ciò non ha rilievo particolare purché la sostanza in esame possa essere chiaramente identificata e separata dalle impurezze.

Il metodo è convalidato per le sostanze elencate nella tabella 1 dell'appendice ed è stato anche applicato ad una serie di sostanze delle seguenti classi chimiche:

— ammine aromatiche (ad esempio trifluralin, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilanilina, 1-naftilammina),

— esteri degli acidi carbossilici aromatici (ad esempio estere metilico dell'acido benzoico, estere etilico dell'acido 3,5-dinitrobenzoico),

— idrocarburi aromatici (ad esempio toluene, xilene, etilbenzene, nitrobenzene),

— esteri dell'acido arilossifenossipropionico (ad esempi diclofop-metile, fenoxaprop-etile, fenoxaprop-P-etile),

— fungicidi a base di benzimidazolo e imidazolo (ad esempio carbendazim, fuberidazole, triazoxide),

— ammidi degli acidi carbossilici (ad esempio 2-clorobenzammide, N,N-dimetilbenzammide, 3,5-dinitrobenzammide, N-metilbenzammide, 2-nitrobenzammide, 3-nitrobenzammide),

— idrocarburi clorurati (ad esempio endosulfan, DDT, esaclorobenzene, quintozene, 1,2,3-triclorobenzene),

— insetticidi organofosforati (ad esempio azinfos-metile, disulfoton. fenamifos. isofenfos. pirazofos, sulprofos, triazofos).

— fenoli (ad esempio fenolo. 2-nitrofenolo, 4-nitrofenolo, pentaclorofenolo. 2,4,6-triclorofenolo, I-naftolo),

— derivati della fenilurea (ad esempio isoproturon, monolinuron, pencicuron).

— coloranti di pigmentazione (ad esempio Giallo Acido 219, Blu Basico 41. Rosso Diretto 81),

— idrocarburi poliaromatici (ad esempio acenaftene, naftalene),

— erbicidi a base di 1,3,5-triazina (ad esempio prometryn, propazina, simazina, terbutrin),

— derivati del triazolo (ad esempio tebuconazolo, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Il metodo non è applicabile a sostanze che reagiscono con l'eluente o con la fase stazionaria, né a sostanze che interagiscono in maniera specifica con i componenti inorganici (ad esempio formazione di cluster complessi con i minerali delle argille). Il metodo potrebbe non funzionare per le sostanze tensioattive, i composti inorganici e le basi e gli acidi organici moderati e forti. Sono determinabili i valori di log K_{oc} compresi tra 1,5 e5,0. Le sostanze ionizzabili devono essere testate usando una fase mobile tamponata, ma occorre procedere con la massima cura per evitare la precipitazione di componenti del tampone o della sostanza in esame.

▼B

1.6. CRITERI QUALITATIVI

1.6.1. **Accuratezza**

Normalmente la stima del coefficiente di adsorbimento può raggiungere una precisione di ± 0,5 unità logaritmiche del valore determinato con il metodo di equilibrio in batch (cfr. la tabella 1 nell'appendice). Si può ottenere una maggior accuratezza utilizzando come riferimento sostanze strutturalmente analoghe alla sostanza in esame.

1.6.2. **Ripetibilità**

Le determinazioni devono essere eseguite almeno due volte. I valori di log K_{oc} ricavati dalle singole misurazioni dovrebbero essere compresi entro un range di 0,25 unità logaritmiche.

1.6.3. **Riproducibilità**

L'esperienza finora acquisita nell'applicazione del metodo ne conferma la validità. Da uno studio di validazione del metodo per HPLC usando 48 sostanze (in prevalenza pesticidi), per le quali erano disponibili dati affidabili relativi al K_{oc} sul terreno, è risultato un coefficiente di correlazione di R = 0,95 (10) (11).

Per migliorare e validare il metodo è stato effettuato un test a cui hanno partecipato 11 laboratori (12). I risultati sono riportati nella tabella 2 dell'appendice.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.7.1. **Stima preliminare del coefficiente di adsorbimento**

Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua P_{ow} (= K_{ow}) e, entro certi limiti, la solubilità in acqua, possono servire da indicatori dell'entità dell'adsorbimento, soprattutto per le sostanze non ionizzate, e quindi essere utilizzati per l'identificazione preliminare del range. Sono state pubblicate una serie di utili correlazioni per diversi gruppi di sostanze chimiche (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Apparecchiatura**

E richiesto un apparecchio per cromatografia liquida dotato di pompa pulse-free e di un sistema di rilevazione adeguato. Si raccomanda l'utilizzo di una valvola di iniezione con loop. Occorre utilizzare resine legate a cianopropile, comunemente disponibili in commercio, su una base di silice (ad esempio Hypersil e Zorbax CN). Tra il sistema di iniezione e la colonna analitica è possibile inserire una precolonna dello stesso materiale. L'efficienza di separazione della colonna può variare in modo significativo a seconda della casa produttrice. Si tenga presente che, indicativamente, la colonna deve raggiungere i seguenti fattori di capacità k': log k' > 0,0 per log K_{oc} = 3,0 e log k' > 0,4 per log K_{oc} = 2,0 con una fase mobile metanolo/acqua 55/45 %.

1.7.3. **Fasi mobili**

A seguito di test effettuati su diverse fasi mobili. si raccomandano le due seguenti:

— metanolo/acqua (55/45 % v/v),

— metanolo/soluzione tampone citrato 0,01 M a pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Il solvente di eluizione viene preparato con metanolo per HPLC e acqua distillata o tampone citrato. Prima dell'uso la miscela viene sottoposta a degasaggio. Si consiglia di optare per l'eluizione isocratica. Nel caso le miscele metanolo/acqua non siano adeguate, è possibile provare altre miscele di solvente organico/acqua, come miscele di etanolo/acqua o acetonitrile/acqua. Per i composti ionizzabili si raccomanda l'uso di soluzioni tampone allo scopo di stabilizzare il pH. È importante osservare tutte le precauzioni necessarie per evitare la precipitazione di sali e il deterioramento della colonna, che si possono verificare con alcune miscele di fase organica/soluzione tampone.

Non è consentito l'uso di additivi quali ad esempio i reagenti ione pair che possono modificare le proprietà di adsorbimento della fase stazionaria. Tali modifiche possono essere irreversibili. Per questo motivo è necessario che gli esperimenti che prevedono l'uso di additivi vengano condotti su colonne separate.

1.7.4. **Soluti**

Le sostanze in esame e di riferimento devono essere sciolte nella fase mobile.

1.8. ESECUZIONE DEL TEST

1.8.1. **Condizioni**

È bene registrare la temperatura durante le misurazioni. Si raccomanda in modo particolare l'uso di un comparto colonne a temperatura controllata per garantire condizioni costanti durante i cicli di esecuzione della taratura, delle corse e delle misurazioni sulla sostanza in esame.

1.8.2. **Determinazione del tempo morto t_o**

Il tempo morto t_o può essere determinato con due metodi diversi (cfr. anche il punto 1.2).

1.8.2.1. *Determinazione del tempo morto t_o mediante serie omologa*

È comprovato che con questa procedura i valori di t_o sono affidabili e standardizzati. Per maggiori dettagli, consultare il metodo di prova A.8: coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua), metodo per HPLC.

1.8.2.2. *Determinazione del tempo morto t_o mediante sostanze inerti non trattenute dalla colonna*

Questa tecnica si basa sull'iniezione di formammide, urea o nitrato di sodio. Le misurazioni devono essere eseguite almeno due volte.

1.8.3. **Determinazione dei tempi di ritenzione t_R**

Selezionare le sostanze di riferimento secondo le modalità descritte nel punto 1.3. Queste sostanze sono iniettabili sotto forma di miscela standard, purché esista una conferma che il tempo di ritenzione di ciascuno standard di riferimento non sia influenzato dalla presenza degli altri. Effettuare la taratura a intervalli regolari almeno due volte al giorno, in modo da considerare eventuali variazioni impreviste nelle prestazioni della colonna. È buona prassi eseguire le iniezioni di taratura prima e dopo le iniezioni della sostanza in esame per escludere eventuali derive dei tempi di ritenzione. Iniettare le singole sostanze in esame nella minor quantità possibile (per evitare un sovraccarico della colonna) e determinare i relativi tempi di ritenzione.

▼B

Per aumentare l'affidabilità delle misurazioni, ripetere le determinazioni almeno due volte. I valori di log K_{oc} ricavati dalle singole misurazioni dovrebbero essere compresi entro un range di 0,25 unità logaritmiche.

1.8.4. **Valutazione**

I fattori di capacità k' vengono ricavati dal tempo morto t_o e dai tempi di ritenzione t_R delle sostanze di riferimento selezionate secondo l'equazione 4 (cfr. il punto 1.2). Successivamente si costruisce un grafico log k'/log K_{oc} ottenuti dagli esperimenti di equilibrio in batch riportati nelle tabelle 1 e 3 dell'appendice. Servendosi di questo grafico, si utilizza il valore di log k' della sostanza in esame per determinare il rispettivo valore di log K_{oc} (interpolazione). Se i risultati mostrano che log K_{uc} della sostanza in esame esce dal range di taratura, occorre ripetere il test usando altre sostanze di riferimento più appropriate.

2. **DATI E RELAZIONE**

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— identità della sostanza in esame e delle sostanze di riferimento, relativa purezza e valori pK_a. per composti ionizzabili,

— descrizione della strumentazione e delle condizioni operative, ad esempio tipo e dimensioni della colonna (e precolonna) analitica, mezzi di rivelazione, fase mobile (rapporto dei componenti e pH), intervallo di temperatura durante le misurazioni,

— tempo morto e relativo metodo di determinazione,

— quantità delle sostanze in esame e di riferimento introdotte nella colonna,

— tempi di ritenzione dei composti di riferimento usati per la taratura,

— dettagli sulla retta di regressione approssimata (log k' in rapporto a log K_{oc}) e rappresentazione grafica della retta di regressione,

— dati sui tempi medi di ritenzione e valore stimato di d log K_{oc} riferito al composto in esame,

— cromatogrammi.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl. D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for non-ionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35-(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

APPENDICE

Tabella 1

Confronto tra i valori di K_{oc} per i terreni e i fanghi di acque da scarico e i valori calcolati con il metodo di screening per HPLC (1) (2)

Sostanza	N.CAS	Log K_{oc} fanghi di acque da scarico	Log K_o HPLC	Δ	Log K_{oc} terreni	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrene	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Acido benzoico fenilestere	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzammide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzammide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

(1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges Chemosphere, 3 5 (1/2), pp. 107-119.

Tabella 2

Risultati di un test comparativo fra laboratori (11 laboratori partecipanti) eseguito per migliorare e validare il metodo per HPLC (1)

Sostanza	N.CAS	Log K_{Oc}:	K_{oc}	Log K_{oc}
		[OCSE 106]	[Metodo HPLC]	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	776O8-8S-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

(1) W. Kördel, G, Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Tabella 3

Sostanze di riferimento raccomandate per il metodo di screening per HPLC in base ai dati sull'adsorbimento del suolo

Sostanza di riferimento	N.CAS	Valori medi di log K_{oc} ottenuti dall'equilibrio in batch	Numero di dati relativi a K_{oc}	Log S.D.	Fonte
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenolo	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-nitrobenzammide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzammide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metilbenzammide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoato di metile	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobenzammide	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobenzammide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalene	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diolo	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Giallo Acido 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triclorobenzene	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Rosso Diretto 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-metile	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantrene	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Blu Basico 41 (miscela)	26S50-47-5 12270-l 3-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten, organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oeper, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 21 pp. 285-304.
(c) Dati fomiti dalle industrie.

▼B

C.20. PROVA DI RIPRODUZIONE CON *DAPHNIA MAGNA*

1. METODO

Questo metodo di test della tossicità per la riproduzione corrisponde al TG 211 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Il principale obiettivo del test è valutare l'effetto delle sostanze chimiche sulla capacità riproduttiva di *Daphnia magna*.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Animali riproduttori: femmine di *Daphnia* presenti all'inizio del test la cui capacità riproduttiva è oggetto dello studio.

Prole: piccoli di *Daphnia* prodotti dagli animali riproduttori nel corso del test.

Minima concentrazione con effetti significativi (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): concentrazione più bassa testata della sostanza alla quale si osserva un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) sulla riproduzione e sulla mortalità parentale rispetto ai controlli, entro un periodo di esposizione definito. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quelli osservati alla LOEC. Se non è possibile soddisfare queste due condizioni, è necessario fornire una spiegazione esauriente sulle modalità di scelta della LOEC {e di conseguenza della NOEC).

Massima concentrazione senza effetti significativi (No Observed Effect Concentration, NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC che, se confrontata con i controlli, non ha un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$), entro un periodo di esposizione definito.

$\mathbf{EC_x}$: concentrazione della sostanza di prova disciolta in acqua che provoca una percentuale x di riduzione della capacità riproduttiva di *Daphnia magna* entro un determinato periodo di esposizione.

Tasso intrinseco di accrescimento: misura della crescita della popolazione che integra la capacità riproduttiva e la mortalità specifica in base all'età (20) (21) (22). Nelle popolazioni in equilibrio dinamico è uguale a zero. Per le popolazioni in crescita è positivo, mentre per quelle in diminuzione è negativo. Ovviamente, quest'ultimo tasso non è sostenibile e, alla fine, porta all'estinzione.

Limite di rivelabilità: concentrazione minima che può essere individuata ma non quantificata.

Limite di determinazione: concentrazione minima misurabile quantitativamente.

Mortalità: si considerano morti gli animali che, entro 15 secondi dopo lieve agitazione del contenitore usato per il test, restano immobili, cioè non sono in grado di nuotare, o nei quali non si osserva alcun movimento delle appendici o della parte posteriore dell'addome. (Nel caso si usi un'altra definizione, essa deve essere indicata insieme al relativo riferimento bibliografico).

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Giovani femmine di *Daphnia* (animali riproduttori), di età inferiore alle 24 ore al momento dell'inizio del test, vengono esposte alla sostanza di prova aggiunta ad acqua a un intervallo di concentrazioni diverse. La durata del test è di 21 giorni. Alla fine del test si valuta il numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. Ciò significa che la prole nata da adulti che muoiono durante il test viene esclusa dai calcoli. La capacità riproduttiva degli animali parentali può essere espressa in altri modi (ad esempio, con il numero dei piccoli vivi prodotti giornalmente da ciascun animale a partire dal primo giorno di comparsa della prole) ma questi dati dovrebbero essere riportati solo ad integrazione del numero totale di piccoli prodotti da ciascun genitore vivo alla fine del test. La capacità riproduttiva degli animali esposti alla sostanza di prova viene confrontata con quella del/i controllo/i allo scopo di determinare la concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) e quindi la concentrazione a cui non si osservano effetti (NOEC). Inoltre, e per quanto possibile, si analizzano i dati mediante un modello di regressione allo scopo di calcolare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x della capacità riproduttiva (cioè CE_{50}, CE_{20} o CE_{10}).

Deve essere inoltre riportata la sopravvivenza degli animali riproduttori e il tempo intercorso fino alla produzione della prima schiusa, è possibile esaminare anche altri effetti correlati alla sostanza su parametri quali la crescita (ad esempio la lunghezza) e il tasso intrinseco di accrescimento.

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Dovrebbero essere disponibili i risultati di un test di tossicità acuta (cfr. metodo C.2, parte I) effettuato sulla *Daphnia magna*. Tali risultati possono essere utili per selezionare un intervallo di concentrazione adeguato da utilizzare nei test sulla riproduzione. Dovrebbero essere noti la solubilità in acqua e la tensione di vapore della sostanza di prova e dovrebbe essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza nelle soluzioni di prova con la relativa efficienza di recupero e limite di determinazione.

Le informazioni sulla sostanza in esame utili per definire le condizioni di esecuzione del test sono: formula di struttura, purezza della sostanza, fotostabilità, stabilità nelle condizioni di esecuzione del test, pKa, P_{ow} e risultati del test di biodegradabilità immediata (cfr. metodo C.4).

1.5. VALIDITÀ DEL TEST

Perché il test sia valido, il/i controllo/i dovrebbe/ro soddisfare i seguenti criteri di prestazione:

— la mortalità degli animali riproduttori (femmine di *Daphnia*) non deve superare il 20 % alla fine del test,

— il numero medio dei piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore sopravvissuto alla fine del test deve essere > 60.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1. **Apparecchiatura**

I recipienti di prova e le altre apparecchiature destinate a entrare in contatto con le soluzioni della prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Di norma si utilizzano beaker di vetro come recipienti di prova.

Occorrono inoltre alcuni (o tutti) dei seguenti strumenti:

— misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di volume ridotto),

▼B

— adeguata apparecchiatura per il controllo della temperatura,

— pH-metro,

— apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua,

— apparecchiatura per la determinazione della concentrazione dei carbonio organico totale (TOC) nell'acqua o per la determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD),

— adeguata apparecchiatura per il controllo del regime di illuminazione e la misurazione dell'intensità della luce.

1.6.2. **Organismi da utilizzare nella prova**

La specie da utilizzare nel test è la *Daphnia magna* Straus. È possibile usare altre specie di dafnie, purché soddisfino adeguatamente i criteri di validità (il criterio di validità relativo alla capacità riproduttiva nei controlli deve essere calibrato sulla specie di dafnia). Nel caso si utilizzino altre specie di dafnie, occorre identificarle con precisione e motivare la scelta.

Di preferenza il clone dovrebbe essere stato identificato tramite determinazione del genotipo. La ricerca (1) ha dimostrato che le prestazioni riproduttive del Clone A (proveniente dall'IRCHA, in Francia) (3), allevato nelle condizioni descritte nel presente metodo, soddisfa costantemente il criterio di validità di una media di $\geq$ 60 di piccoli per animale riproduttore sopravvissuto. Sono comunque accettabili altri cloni, purché si dimostri che la coltura di *Daphnia* soddisfa i criteri di validità del test.

All'inizio del test gli animali devono avere meno di 24 ore di vita e non devono provenire dalla prima nidiata. Devono provenire da un allevamento sano (senza segni di stress quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di efippi. ritardo nella produzione della prima nidiata, scolorazione ecc). Gli animali riproduttori vanno mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo, alimentazione e numero di animali per unità di volume) simili a quelle che verranno utilizzate nella prova. Se il mezzo di coltura delle dafnie da usare nel test è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura delle dafnie, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del test, normalmente di tre settimane (cioè una generazione) per evitare di sottoporre a stress gli animali destinati alla riproduzione.

1.6.3. **Mezzo di prova**

Si raccomanda di usare per questa prova un mezzo completamente definito per evitare l'uso di additivi (ad esempio alghe, estratto di terra, e così via), che sono difficili da caratterizzare, e dunque aumentare la possibilità di standardizzazione fra vari laboratori. I mezzi M4 (4) e M7 di Elendt (cfr. appendice 1) si sono rivelati adatti a questo scopo. Sono comunque accettabili altri mezzi [ad esempio (5) (6)], purché si dimostri che le prestazioni della coltura di *Daphnia* soddisfano i criteri di validità del test.

Se si impiegano mezzi contenenti additivi non ben definiti, occorre descriverli in dettaglio aggiungendo nella relazione informazioni sulla loro composizione, con particolare riferimento al contenuto di carbonio, che potrebbe influire sulla dieta. Si raccomanda di determinare il carbonio organico totale (TOC) e/o la domanda chimica di ossigeno (COD) della preparazione madre dell'additivo organico e di effettuare una stima del contributo dato al TOC/COD del mezzo di prova. Si raccomanda che i livelli di TOC nel mezzo (cioè prima dell'aggiunta delle alghe) siano inferiori a 2 mg/l (7).

▼B

Quando si provano sostanze contenenti metalli è importante tener conto del fatto che le proprietà del mezzo di prova (ad esempio la durezza e la capacità di chelazione) possono influire sulla tossicità della sostanza in esame. Per questo motivo è consigliabile avere un mezzo completamente definito. Attualmente però gli unici mezzi di questo tipo noti per essere adatti all' allevamento a lungo termine di *Daphnia magna* sono l'M4 e l'M7 di Elendt. Entrambi i mezzi contengono l'agente chelante EDTA. La ricerca ha dimostrato (2) che la «tossicità apparente» del cadmio è generalmente inferiore quando il test sulla riproduzione viene eseguito nei mezzi M4 e M7 invece che in mezzi non contenenti EDTA. I mezzi M4 e M7 non sono pertanto raccomandati per il test di sostanze contenenti metalli; occorre inoltre evitare anche altri mezzi che contengono agenti chelanti. Per le sostanze contenenti metalli può essere consigliabile utilizzare un mezzo alternativo come, ad esempio, l'acqua dolce dura ricostituita secondo le indicazioni dell'ASTM (7), che non contiene EDTA, con l'aggiunta di estratto di alghe marine (8). Questa combinazione di acqua dolce dura ricostituita ed estratto di alghe marine è adatta anche per l'allevamento a lungo termine e la sperimentazione con *Daphnia magna* (2), sebbene anch'essa eserciti un'azione lievemente chelante a causa del componente organico presente nell'estratto di alghe marine aggiunto.

All'inizio e nel corso del test la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere superiore a 3 mg/l. Il pH dovrebbe restare nel range 6-9 senza di norma variare di oltre 1,5 unità nell'ambito di un test. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come $CaCO_3$). I test eseguiti con un valore pari o superiore a questo livello hanno dimostrato che le prestazioni riproduttive sono conformi ai criteri di validità (9) (10).

1.6.4. **Soluzioni di prova**

Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre dovrebbero preferibilmente essere preparate solubilizzando la sostanza nel mezzo di prova.

Per produrre una soluzione madre alla concentrazione adeguata, talvolta è necessario aggiungere solventi organici o disperdenti, ma l'uso di queste sostanze dovrebbe essere evitato per quanto possibile. Alcuni solventi adatti sono ad esempio l'acetone, l'etanolo, il metanolo, la dimetilformammide e il glicole trietilenico. Alcuni disperdenti adatti sono ad esempio il Cremophor RH40, la metilcellulosa 0,01 % e l'HCO-40. In ogni caso nelle soluzioni di prova la sostanza da saggiare non deve eccedere il limite di solubilità nel mezzo di prova.

Solventi: servono per produrre una soluzione madre che possa essere dosata con precisione nell'acqua. Alla concentrazione di solvente raccomandata nel mezzo di prova finale (< 0,1 ml/l) i solventi sopra elencati non sono tossici e non aumentano la solubilità in acqua delle sostanze.

Disperdenti: possono facilitare il dosaggio preciso e la dispersione. Alla concentrazione raccomandata nel mezzo di prova finale (≤ 0,1 ml/l) i disperdenti sopra elencati non sono tossici e non aumentano la solubilità in acqua delle sostanze.

▼B

1.7. DISEGNO SPERIMENTALE

Occorre randomizzare l'assegnazione dei trattamenti ai recipienti di prova e tutte le successive manipolazioni. In caso contrario si potrebbero venficare «bias» che potrebbero essere interpretate come un effetto della concentrazione. In particolare, se le unità sperimentali vengono manipolate in ordine di trattamento o di concentrazione, non si può escludere che alcuni effetti collegati al tempo (ad esempio la stanchezza dell'operatore o un altro errore) possono produrre effetti maggiori alle concentrazioni più alte. Inoltre, se si ritiene possibile una alterazione dei risultati del test a causa delle condizioni sperimentali iniziali o ambientali (ad esempio la posizione delle vasche nel laboratorio), si può ricorrere al frazionamento del test in blocchi.

1.8. PROCEDURA

1.8.1 **Condizioni di esposizione**

1.8.1.1. *Durata*

La durata del test è di 21 giorni.

1.8.1.2. *Carico*

Gli esemplari riproduttori vengono mantenuti individualmente, uno per ciascun recipiente di prova, con 50-100 ml di mezzo in ogni recipiente.

Talvolta, per soddisfare i requisiti della procedura analitica usata per determinare la concentrazione della sostanza in esame, occorre utilizzare un volume maggiore, sebbene sia consentito il raggruppamento delle repliche per l'analisi chimica. Nel caso si utilizzino volumi superiori a 100 ml, potrebbe essere necessario aumentare la razione fornita alle dafnie per assicurare un'adeguata disponibilità del cibo e il rispetto dei criteri di validità. Per i test a flusso continuo è possibile prendere in considerazione, per motivi tecnici, disegni sperimentali alternativi (ad esempio quattro gruppi di 10 animali in una soluzione di prova più abbondante); qualunque modifica del disegno sperimentale deve essere descritta nella relazione.

1.8.1.3. *Numero di animali*

Per i test semistatici occorrono almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, per ogni concentrazione di prova e almeno 10 animali, mantenuti singolarmente nella serie di controllo.

E stato dimostrato che per i test a flusso continuo è adeguato utilizzare 40 animali suddivisi in quattro gruppi di 10 per ciascuna concentrazione di prova (1). È possibile utilizzare un numero inferiore di organismi sperimentali, ma si raccomanda comunque di utilizzare un minimo di 20 animali per concentrazione, divisi in due o più repliche con un numero uguale di animali (ad esempio quattro repliche con cinque dafnidi ciascuna). Si noti che per i test nei quali gli animali sono tenuti in gruppi, se gli animali riproduttori muoiono, non è possibile esprimere la capacità riproduttiva in termini di numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. In questi casi la capacità riproduttiva dovrebbe essere espressa come «numero totale di piccoli vivi prodotti per (pro)genitore presente all'inizio del test».

1.8.1.4. *Alimentazione*

Nei test semistatici è preferibile nutrire gli animali ogni giorno, e comunque almeno tre volte alla settimana (in concomitanza con la sostituzione del mezzo). Se non si osserva questo modello di alimentazione, (per esempio nei saggi a flusso continuo) occorre segnalarlo nella relazione.

▼B

Durante la prova la dieta degli animali riproduttori dovrebbe consistere preferibilmente in alghe unicellulari vive di una o più delle seguenti specie: *Chlorella sp*., *Selenastrum capricornutum* [ora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] e *Scenedesmus subspicatus*. La dieta deve essere basata sulla quantità di carbonio organico (C) fornita a ciascun animale riproduttore. Ricerche (12) hanno dimostrato che per ottenere il numero di piccoli di *Daphnia magna* necessari per soddisfare i criteri di validità sono sufficienti razioni comprese fra 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/die. È possibile somministrare la razione in maniera costante per tutto il periodo del test oppure una razione inferiore all'inizio della prova del test ed una razione più alta durante la prova, tenendo conto della crescita degli animali riproduttori. In questo caso la razione deve comunque restare sempre nel range raccomandato di 0,1- 0,2 mg C/*Daphnia*/die.

Se per comodità (visto che la misurazione del tenore di carbonio richiede molto tempo) si utilizzano altri parametri di misurazione, quali la conta delle cellule algali o l'assorbanza della luce, per somministrare la razione necessaria, ogni laboratorio deve elaborare un proprio nomogramma che correli il parametro di misurazione scelto al contenuto di carbonio della coltura di alghe (cfr. appendice 2 per l'elaborazione del nomogramma). I nomogrammi vanno controllati almeno una volta all'anno e con maggiore frequenza in caso di modifica delle condizioni di coltura delle alghe. È stato dimostrato che l'assorbanza della luce è un parametro alternativo al contenuto di carbonio migliore rispetto al numero di cellule (13).

Occorre alimentare le dafnie con una sospensione concentrata di alghe per ridurre al minimo il volume del mezzo di coltura algale trasferito nei recipienti di prova. La concentrazione delle alghe avviene per centrifugazione con successiva risospensione in acqua distillata, acqua deionizzata o mezzo di allevamento delle dafnie.

1.8.1.5. *Luce*

16 ore di luce a un'intensità non superiore a 15-20 $\mu E.m^{-2}$ s^{-1}.

1.8.1.6. *Temperatura*

La temperatura dei mezzi di prova dovrebbe rimanere tra i 18 e i 22 °C e possibilmente non variare di oltre 2 °C in ogni test, restando comunque entro i suddetti limiti (ad esempio 18-20, 19-21 o 20-22 °C). Per controllare la temperatura si può utilizzare un recipiente di prova aggiuntivo.

1.8.1.7. *Aerazione*

I recipienti di prova non devono essere aerati durante il test.

1.8.2. **Concentrazioni di prova**

In genere si dovrebbero provare almeno cinque concentrazioni di prova, disposte in serie geometriche e separate da un fattore preferibilmente non superiore a 3,2; per ogni concentrazione si dovrebbe allestire un numero adeguato di repliche (cfr. punto 1.8.1.3). Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre indicare il motivo. Le sostanze non vanno provate al di sopra del loro limite di solubilità nel mezzo di prova.

▼B

Nel definire l'intervallo delle concentrazioni è necessario tenere conto dei seguenti elementi:

i) se l'obiettivo è ottenere la LOEC/NOEC, la concentrazione minima deve essere sufficientemente bassa affinché la fecondità, a tale concentrazione, non sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario il test andrà ripetuto con una concentrazione minima più bassa;

ii) se l'obiettivo è ottenere la LOEC/NOEC, la concentrazione massima deve essere sufficientemente alta affinché la fecondità, a tale concentrazione, sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario il test andrà ripetuto con una concentrazione massima più elevata;

iii) se si stima la CE_X per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile usare un numero sufficiente di concentrazioni tale da consentire di definire la CE_X con un livello di confidenza adeguato. Se si stima la CE_{50} per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile che la massima concentrazione di prova sia maggiore della CE_{50} calcolata. Diversamente, sebbene sia comunque possibile calcolare la CE_{50}, l'intervallo fiduciale per la CE_{50} sarà molto ampio e potrebbe non essere possibile valutare in modo soddisfacente l'adeguatezza del modello adattato;

iv) è preferibile che l'intervallo delle concentrazioni di prova non comprenda concentrazioni con un effetto statisticamente significativo sulla sopravvivenza degli adulti, in quanto ciò trasformerebbe la natura della prova da una semplice prova sulla riproduzione a una prova combinata su riproduzione e mortalità, che richiederebbe un'analisi statistica molto più complessa.

Le informazioni disponibili sulla tossicità della sostanza di prova (ad esempio risultati di prove di tossicità acuta e/o di studi di definizione dell'intervallo di concentrazione) dovrebbero essere di aiuto nella scelta delle concentrazioni di prova appropriate.

Se per facilitare la preparazione delle soluzioni di prova si utilizza un solvente o un disperdente (cfr. punto 1.6.4), la sua concentrazione finale nei recipienti di prova non dovrebbe superare 0,1 ml/l e dovrebbe essere uguale in tutti i recipienti.

1.8.3. **Controlli**

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza di prova, dovrebbe essere allestita una serie di controllo con il mezzo di prova ed eventualmente una serie di controllo contenente il solvente o il disperdente. La concentrazione dell'eventuale solvente o disperdente deve essere identica a quella usata nei recipienti contenenti la sostanza di prova. Anche per i controlli dovrebbe essere usato un numero adeguato di repliche (cfr. punto 1.8.1.3),

Generalmente, in un test ben condotto, il coefficiente di variazione del numero medio di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore nel/i controllo/i dovrebbe essere $\leq$ 25 %; il coefficiente di variazione dovrebbe essere riportato per le prove dove gli animali riproduttori sono mantenuti individualmente.

1.8.4. **Rinnovo del mezzo di prova**

La frequenza con cui il mezzo viene rinnovato dipende dalla stabilità della sostanza di prova, ma dovrebbe essere almeno tre volte alla settimana. Se da prove preliminari sulla stabilità (cfr. punto 1.4) la concentrazione della sostanza di prova non risulta stabile (cioè è al di fuori del range dell'80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 %, della concentrazione iniziale misurata) durante il periodo massimo di rinnovo (tre giorni), si consiglia di rinnovare il mezzo con maggiore frequenza oppure di eseguire una prova a flusso continuo.

▼B

Quando si rinnova il mezzo nelle prove semistatiche si prepara una seconda serie di recipienti dove vengono trasferiti gli animali riproduttori mediante, ad esempio, una pipetta di vetro di diametro adeguato. Il volume del mezzo trasferito con le dafnie dovrebbe essere il più piccolo possibile.

1.8.5. **Osservazioni**

I risultati delle osservazioni fatte durante il test vanno registrati su apposite schede di raccolta dei dati (cfr. appendici 3 e 4). Dovendo fornire i dati di altre misurazioni (cfr. punti 1.3 e 1.8.8) possono essere richieste ulteriori osservazioni.

1.8.6. **Prole**

La prole prodotta da ciascun animale riproduttore dovrebbe essere di preferenza tolta dal recipiente e contata ogni giorno a partire dalla comparsa della prima schiusa, per impedire che consumi cibo destinato all'adulto. Ai fini del metodo qui descritto è necessario contare solo il numero di piccoli vivi, ma è consigliabile registrare anche la presenza di uova abortite o piccoli morti.

1.8.7. **Mortalità**

La mortalità fra gli animali riproduttori va rilevata di preferenza quotidianamente, almeno ad ogni conta dei piccoli.

1.8.8. **Altri parametri**

Sebbene questo metodo sia fondamentalmente inteso a valutare gli effetti sulla riproduzione, è possibile che altri effetti siano sufficientemente quantificati da permettere un'analisi statistica. La misura della crescita è molto auspicabile in quanto fornisce informazioni su possibili effetti subletali, che potrebbero essere più utili della sola misura della riproduzione; si raccomanda di misurare la lunghezza degli animali riproduttori (lunghezza del corpo esclusa la spina posteriore del carapace) alla fine del test. Altri parametri che possono essere misurati o calcolati sono: il periodo intercorso fino alla produzione della prima schiusa (e delle schiuse successive), il numero e le dimensioni delle schiuse per animale, il numero delle schiuse abortite, la presenza di maschi o efippi e il tasso intrinseco di aumento della popolazione.

1.8.9. **Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche**

Concentrazione dell'ossigeno, temperatura, durezza e pH dovrebbero essere misurati almeno una volta alla settimana, nei mezzi freschi e vecchi, nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza in esame.

Durante la prova le concentrazioni della sostanza di prova vanno determinate a intervalli regolari.

Nei test semistatici in cui si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti intorno a ± 20 % del valore nominale (e cioè entro l'intervallo dell'80-120 %; cfr. punti 1.4. e 1.8.4), si raccomanda di analizzare almeno le concentrazioni minima e massima di prova subito dopo la loro preparazione e in occasione di un rinnovo del mezzo nel corso della prima settimana del test (le analisi vanno effettuate su un campione della stessa soluzione, preparata di fresco e al momento di rinnovarla). Queste determinazioni vanno poi ripetute a intervalli almeno settimanali.

▼B

Per i test in cui non si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % del valore nominale, è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, appena preparate e al momento di rinnovarle. Tuttavia, per i test in cui la concentrazione iniziale misurata della sostanza di prova non è entro ± 20 % del valore nominale, ma si può fornire prova che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (cioè entro un range dell'80-120 % delle concentrazioni iniziali), nella seconda e terza settimana del test le determinazioni chimiche possono limitarsi alle concentrazioni massima e minima. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza in esame prima del rinnovo può limitarsi ad un unico recipiente per ciascuna concentrazione.

Per i test a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per i test semistatici (sebbene in questo caso non ci sia la misurazione delle soluzioni «vecchie»). Può essere però consigliabile aumentare il numero di campionamenti durante la prima settimana (ad esempio, tre serie di misurazioni;) per accertare la stabilità delle concentrazioni di prova. In questi tipi di prova dovrebbe essere controllato quotidianamente il tasso di flusso del diluente e della sostanza di prova.

Potendo dimostrare che durante tutto il test la concentrazione della sostanza di prova in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale misurata, i risultati possono essere basati sui valori nominali o sui valori iniziali misurati. Se la deviazione dalla concentrazione iniziale nominale o misurata è maggiore di ± 20 %, i risultati vanno espressi come media ponderata nel tempo (cfr. appendice 5).

2. DATI E RELAZIONE

2.1. ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Scopo di questo test è determinare l'effetto della sostanza di prova sul numero complessivo di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. Occorre calcolare il numero complessivo di piccoli per animale riproduttore per ciascun recipiente di prova (replica). Se in una replica qualsiasi l'animale riproduttore muore durante il test o si rivela essere un maschio, questa replica viene esclusa dall'analisi. L'analisi si baserà quindi su un numero ridotto di repliche.

Per stimare la LOEC e quindi la NOEC per gli effetti della sostanza chimica sulla capacità riproduttiva è necessario calcolare la capacità riproduttiva media nelle varie repliche di ciascuna concentrazione, nonché la deviazione standard residua di dati comuni («pooled»), utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla. Possono essere utilizzati i test di Dunnett o di Williams (14) (15) (16) (17). E necessario controllare se la assunzione di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Si raccomanda di fare questo controllo graficamente piuttosto che con un test formale della significatività (18); una possibile alternativa è il test di Bartlett. Se la assunzione non è fondata, bisogna valutare se trasformare i dati per omogeneizzare le varianze prima di eseguire l'ANOVA, o se eseguire una ANOVA ponderata. Occorre calcolare e riferire nella relazione l'entità dell'effetto misurabile tramite ANOVA (ovvero la più piccola differenza significativa).

▼B

Per la stima della concentrazione che causerebbe una riduzione del 50 % della capacità riproduttiva (CE_{50}) è necessario approssimare ai dati una curva adeguata, come la curva logistica, utilizzando un metodo statistico come quello dei minimi quadrati. È possibile parametrizzare la curva in modo da poter stimare direttamente la CE_{50} e il suo errore standard. Ciò faciliterebbe notevolmente il calcolo dei limiti fiduciali della CE_{50}. A meno che vi siano buoni motivi per preferire limiti fiduciali diversi, vanno utilizzati i limiti di confidenza inferiore e superiore (probabilità del 95 %). La procedura di approssimazione deve fornire, di preferenza, uno strumento per valutare il significato della mancanza di approssimazione. Lo si può fare graficamente o dividendo la somma residua dei quadrati in componenti di mancanza di adattamento e «componenti d'errore puro» ed eseguendo un test della significatività per la mancanza di adattamento. Poiché generalmente i trattamenti che danno alta fecondità tendono ad avere una varianza maggiore nel numero dei piccoli prodotti rispetto ai trattamenti che danno bassa fecondità, si potrebbe eventualmente ponderare i valori osservati per rispecchiare le diverse varianze nei diversi gruppi di trattamento [cfr. riferimento (18) per ulteriori dettagli].

Nell'analisi dei dati ottenuti nel «ring test» finale (2) è stata approssimata una curva logistica mediante il seguente modello, sebbene si possano usare altri modelli adeguati:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

dove:

Y = numero totale dei piccoli per animale riproduttore vivo alla fine del test (calcolato per ciascun recipiente)

x = concentrazione della sostanza

c = numero previsto di piccoli se x = 0

x_0 = CE_{50} della popolazione

b = parametro della pendenza.

Questo modello dovrebbe essere adeguato in molte situazioni diverse, ma esistono senz'altro test per i quali non è adatto. È dunque necessario controllarne la validità come suggerito sopra. In alcuni casi può prestarsi meglio un modello di ormesi in cui concentrazioni basse danno effetti più severi (19).

È possibile calcolare anche altre concentrazioni efficaci, come la CE_{10} o la CE_{20}, anche se può essere preferibile utilizzare una parametrizzazione diversa del modello rispetto a quella usata per la stima della CE_{50}.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere:

2.2.1 **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti,

▼B

— dati di identificazione chimica, compresa la purezza.

2.2.2. **Specie di prova:**

— clone (se è stato tipizzato geneticamente), fornitore o fonte (se nota) e condizioni di utilizzate. Se si usa una specie diversa dalla *Daphnia magna,* è necessario precisarlo nella relazione e giustificare i motivi di questa scelta.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione della prova:**

— procedura usata (ad esempio semistatica o a flusso continuo, volume, carico espresso in numero di *Daphnia* per litro),

— fotoperiodo e intensità della luce,

— disegno sperimentale (ad esempio, numero di repliche, numero di animali riproduttori per replica),

— particolari sul mezzo di allevamento utilizzato,

— eventuali aggiunte di materiale organico, inclusa composizione, fonte, metodo di preparazione, TOC/COD delle preparazioni madri, stima del TOC/COD risultante nel mezzo di prova,

— informazioni dettagliate sull'alimentazione, comprese la quantità (in mg C/*Daphnia*/die) e il programma (ad esempio tipo di alimento/i, compresi il nome della specie di alghe e, se noti, il ceppo e le condizioni di coltura),

— metodo di preparazione delle soluzioni madri e frequenza di rinnovo (deve essere specificato il tipo e la concentrazione del solvente o disperdente, se usati).

2.2.4. **Risultati:**

— risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza di prova,

— concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi per determinare la concentrazione della sostanza nei recipienti di prova (cfr. esempi di schede di raccolta dati nell'appendice 4): vanno riportati nella relazione anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione,

— qualità dell'acqua nei recipienti di prova (pH, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto, e, dove possibile, anche TOC e/o COD e durezza) (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 3),

— numero totale di piccoli vivi per ciascun animale riproduttore (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 3),

— numero di decessi fra gli animali riproduttori e giorno in cui sono avvenuti (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 3),

— coefficiente di variazione per la fecondità dei controlli (basato sul numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo alla fine del test),

— diagramma del numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo (per ogni replica) alla fine del test sulla concentrazione della sostanza in esame,

— concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) sulla riproduzione, comprese una descrizione delle procedure statistiche usate e un'indicazione dell'entità dell'effetto che poteva essere rilevato e concentrazione più alta alla quale non si osservano effetti (NOEC) sulla riproduzione: se del caso, va indicata anche la LOEC/NOEC relativa alla mortalità degli animali riproduttori,

▼B

— se del caso, CE_X per la riproduzione e intervalli di confidenza, nonché un grafico del modello approssimato usato per il suo calcolo, la pendenza della curva dose-risposta e il suo errore standard.

— altri effetti biologici osservati o misure effettuate: riferire qualsiasi altro effetto biologico osservato o misurato (ad esempio, crescita degli animai: riproduttori) comprese le motivazioni adeguate.

— spiegazione di eventuali deviazioni dal metodo di prova.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C, Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano E., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvcrtebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long terra maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen, Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

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

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

(17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

APPENDICE 1

PREPARAZIONE DEI MEZZI M7 E M4 DI ELENDT TOTALMENTE DEFINITI

Acclimatazione ai mezzi M7 e M4 di Elendt

Alcuni laboratori hanno avuto difficoltà nel trasferire direttamente le daphnie nei mezzi M4 (1) e M7. Per contro, con l'acclimatazione graduale, cioè lo spostamento dal mezzo originario a un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine al 100 % si sono avuti risultati soddisfacenti. Potrebbe essere necessario prevedere periodi di acclimatazione persino di un mese.

PREPARAZIONE

Oligoelementi

Inizialmente si preparano soluzioni madri distinte (I) dei singoli oligoelementi in acqua di adeguata purezza, ad esempio deionizzata, distillata o sottoposta a osmosi inversa. Da queste diverse soluzioni madre (I) si prepara una seconda soluzione madre singola (II) che contiene tutti gli oligoelementi (soluzione combinata), e cioè:

Soluzioni madre I (sostanza singola)	Quantità aggiunta (mg/l)	Concentrazione (in relazione al mezzo M4) (volte)	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere la seguente quantità di soluzione madre I ad acqua (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
Kl	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA * 2 H_2O	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—

Sia la soluzione Na_2EDTA che la $FeSO_4$ vengono preparate singolarmente, versate insieme e inserite immediatamente nell'autoclave. Con ciò si ottiene:

21 soluzione Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Mezzi M4 e M7

I mezzi M4 e M7 si preparano usando la soluzione madre II, i macronutrienti e le vitamine, nel modo seguente:

	Quantità aggiunta ad acqua (mg/l)	Concentrazione (rispetto al mezzo M4) (volte)	Quantità di soluzione madre aggiunta per preparare il mezzo ml/l	
			M 4	M 7
Soluzione madre II oligoelementi combinati		20	50	50
Soluzioni madri con macrocostituenti (singola sostanza)				
$CaCl_2$ * 2 H_20	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_20	246 600	2 000	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_20	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Soluzione madre combinata di vitamine	—	10 000	0,1	0,1
La soluzione madre combinata di vitamine si prepara aggiungendo le 3 vitamine a 1 litro di acqua, come segue:				
Cloridrato di tiammina	750	10 000	—	—
Cianocobalamina (B_{l2})	10	10 000	—	—
Biotina	7,5	10 000	—	—

La soluzione madre combinata di vitamine si conserva congelata in piccole aliquote Le vitamine si aggiungono ai mezzi poco prima dell'uso.

Note: Per evitare la precipitazione dei sali durante la preparazione dei mezzi completi, aggiungere le aliquote delle soluzioni madre a circa 500-800 ml di acqua deionizzata e poi portare a 1 litro.

Il primo studio pubblicato sul mezzo M4 si trova in Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

▼B

APPENDICE 2

ANALISI DEL CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC) E PRODUZIONE DI UN NOMOGRAMMA PER IL CONTENUTO DI TOC DELL'ALIMENTO ALGALE

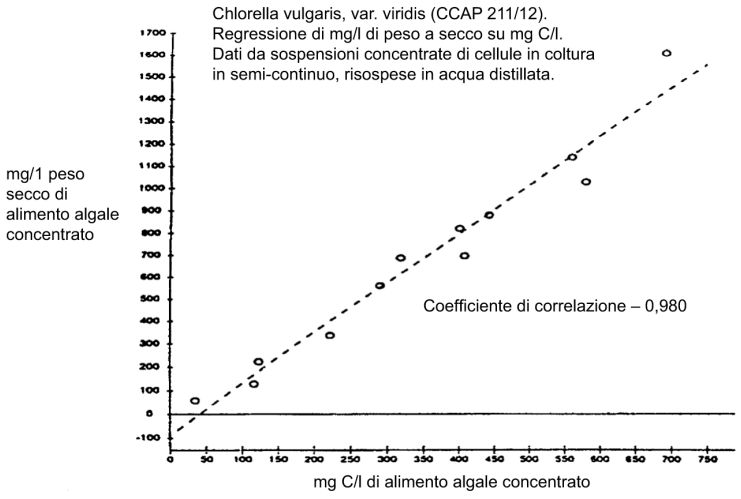
È riconosciuto che il contenuto di carbonio dell'alimento algale non viene di norma misurato direttamente, bensì mediante correlazioni (cioè nomogrammi) con misure sostitutive quali il numero di cellule algali o l'assorbanza della luce.

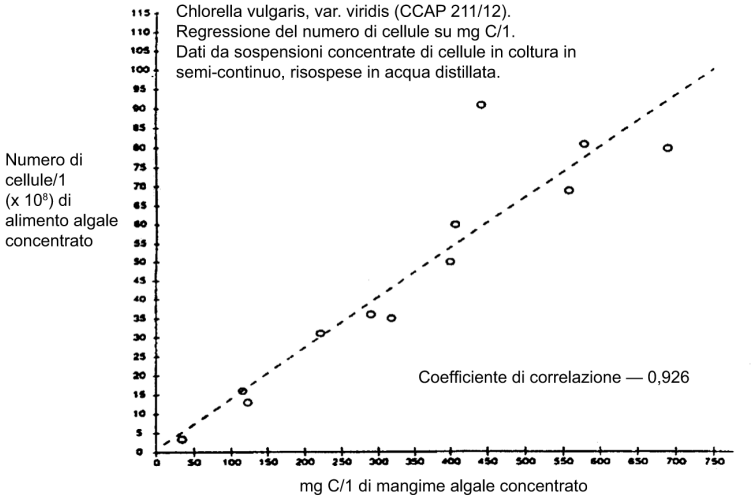
Il TOC dovrebbe essere misurato per ossidazione ad alta temperatura piuttosto che mediante UV o metodi con persolfati. (Cfr.: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Per la produzione del nomogramma, le alghe vanno separate dal mezzo di crescita mediante centrifugazione, seguita da risospensione in acqua distillata. Occorre misurare il parametro surrogato e la concentrazione del TOC in ciascun campione in triplicato. Vanno analizzati i bianchi di acqua distillata e la loro concentrazione di TOC viene dedotta dalla concentrazione del TOC nel campione di alghe.

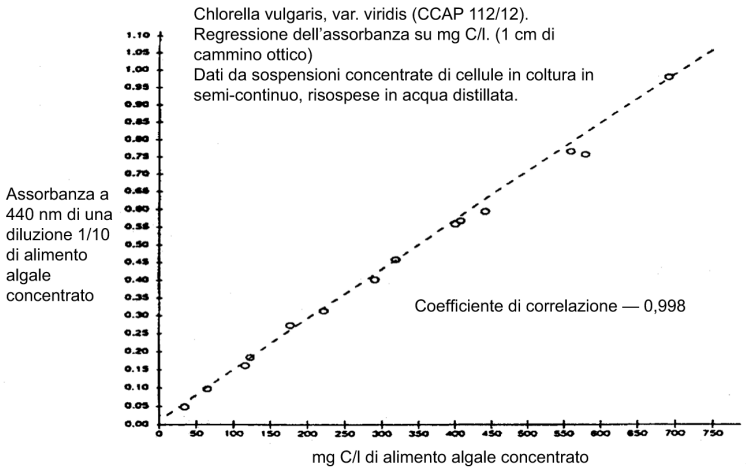
Il nomogramma deve essere lineare nell'intervallo richiesto di concentrazioni del carbonio. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

NB: Non usare questi nomogrammi per effettuare conversioni; è essenziale che ogni laboratorio prepari il suo nomogramma.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regressione dell'assorbanza su mg C/l. (1 cm di cammino ottico)
Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semi-continuo, risospese in acqua distillata.
Assorbanza a 440 nm di una diluzione 1/10 di alimento algale concentrato
Coefficiente di correlazione — 0,998
mg C/l di alimento algale concentrato

▼B

APPENDICE 3

ESEMPIO DI SCHEDA PER LA RACCOLTA DI DATI SUL RINNOVO DEL MEZZO, IL MONITORAGGIO FISICO/CHIMICO, L'ALIMENTAZIONE, LA RIPRODUZIONE DELLE DAPHNIA E LA MORTALITÀ DEGLI ADULTI

Esperimento n.:	Inizio raccolta dati:				Clone:				Mezzo:					Tipo di cibo:			Sostanza di prova;				Concentrazione nominale:			
Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Rinnovo del mezzo (spuntare)																								
PH (1)																							nuovo	
																							vecchio	
O_2 mg/l (1)																							nuovo	
																							vecchio	
Temperatura (ºC) (1)																							nuovo	
																							vecchio	
Somministrazione del cibo (spuntare)																								
N. di piccoli vivi (2)																								Totale
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — IT — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Esperimento n.:	Inizio raccolta dati:				Clone:				Mezzo:				Tipo di cibo:				Sostanza di prova;				Concentrazione nominale:			
Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Totale	
Mortalità cumulativa adulti ([3])																								

([1]) Indicare quale recipiente è stato usato per l'esperimento.
([2]) Registrare la mortalità di qualsiasi animale adulto inserendo la lettera «M» nella casella corrispondente.
([3]) Registrare le schiuse abortite inserendo la sigla «AB» nella casella corrispondente.

▼B

APPENDICE 4

ESEMPIO DI SCHEDA PER LA REGISTRAZIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICHE

a) **Concentrazioni misurate**

Concentrazioni nominali	Campione settimana 1		Campione settimana 2		Campione settimana 3	
	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio

b) **Concentrazioni misurate come percentuale del valore nominale**

Concentrazioni nominali	Campione settimana 1		Campione settimana 2		Campione settimana 3	
	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio

▼B

APPENDICE 5

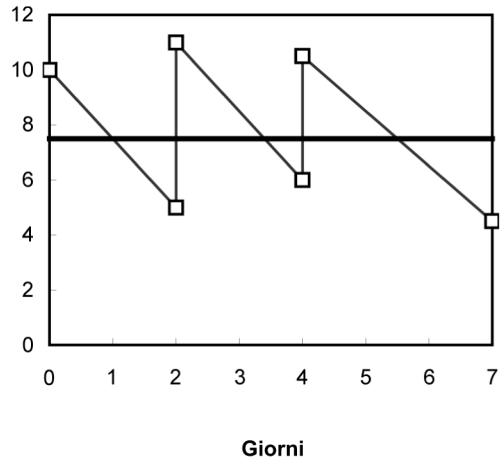
CALCOLO DI UNA MEDIA PONDERATA NEL TEMPO

Media ponderata nel tempo

Dato che la concentrazione della sostanza di prova può diminuire nel periodo fra i rinnovi del mezzo è necessario considerare quale concentrazione vada scelta come rappresentativa dell' intervallo di concentrazioni a cui sono state esposte le dafnie riproduttrici. La selezione deve basarsi su considerazioni biologiche oltre che statistiche. Per esempio, se si ritiene che la riproduzione venga influenzata soprattutto dalla concentrazione picco, si deve utilizzare la concentrazione massima. Se invece si ritiene più importante l'effetto accumulato o a più lungo termine della sostanza tossica, allora risulta più pertinente una concentrazione media. In questo caso una media adeguata è la concentrazione media ponderata nel tempo, in quanto tiene conto della variazione della concentrazione istantanea nel corso del tempo.

Figura 1:

Esempio di media ponderata nel tempo



La Figura 1 mostra un esempio di test (semplificato) della durata di sette giorni con rinnovo del mezzo nei giorni 0, 2 e 4.

— La linea sottile a zig-zag rappresenta la concentrazione in qualsiasi momento nel tempo. Si suppone che la caduta di concentrazione segua un processo di decadimento esponenziale.

— I sei quadratini rappresentano le concentrazioni osservate misurate all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovo.

— La linea retta spessa indica la posizione della media ponderata nel tempo.

La media ponderata nel tempo viene calcolata in modo che l'area ad essa sottostante sia uguale all'area sotto la curva della concentrazione. Il calcolo per l'esempio in figura è illustrato nella tabella 1.

▼B

Tabella 1:

Calcolo della media ponderata nel tempo

Rinnovo n.	Giorni	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Giorni totali: 7					Area totale	50,091
					Media ponderata/t	7,156

«Giorni» è il numero di giorni nel periodo di rinnovo.

«Conc0» è la concentrazione misurata all'inizio di ciascun periodo di rinnovo.

«Conc1» è la concentrazione misurata alla fine di ciascun periodo di rinnovo.

«Ln(Conc0)» è il logaritmo naturale di Conc0.

«Ln(Conc1)» è il logaritmo naturale di Conc1.

«Area» è l'area sotto la curva esponenziale per ciascun periodo di rinnovamento. Viene calcolata nel modo seguente:

$$\text{Area} = \frac{\text{Conc0} - \textit{Conc}1}{\text{Ln(Conc0)} - \text{Ln(Conc1)}} \times \text{Giorni}$$

La media ponderata nel tempo («media ponderata/t») è l'«Area totale» divisa per i «Giorni totali».

Ovviamente per il test di riproduzione con *Daphnia* la tabella andrebbe prolungata fino a coprire 21 giorni.

È chiaro che quando le osservazioni vengono effettuate solo all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovamento non è possibile confermare che il processo di decadimento è effettivamente esponenziale. Una curva diversa produrrebbe un calcolo diverso per l'A*rca*. È tuttavia plausibile che il processo di decadimento sia esponenziale e questa è probabilmente la curva migliore da usare in assenza di altre informazioni.

E però necessario procedere con cautela se l'analisi chimica non rileva alcuna sostanza alla fine del periodo di rinnovo. A meno che non sia possibile stimare la rapidità con cui la sostanza è scomparsa dalla soluzione, è impossibile ottenere un'area sotto la curva che sia realistica, e pertanto è impossibile ottenere una ragionevole media ponderata nel tempo.

▼B

C.21. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DELL'AZOTO

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 216 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare gli effetti a lungo termine delle sostanze chimiche, dopo un'unica esposizione, sull'attività di trasformazione dell'azoto ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura *(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft)* (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti *(Environmental Protection Agency)* (3), dal SETAC (4) e dall'Organizzazione internazionale di normalizzazione (ISO) (5). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (6). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (7) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate. Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinarne gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione dell'azoto viene effettuato per determinare gli effetti di queste sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una sostanza sul processo di trasformazione dell'azoto nei suoli aerobici superficiali, ma consente anche di stimarne gli effetti sulla trasformazione del carbonio ad opera della microflora del suolo. La formazione di nitrati avviene in seguito alla degradazione del legame carbonio-azoto; di conseguenza, qualora nei campioni di suolo trattato ed in quelli di controllo si riscontrino gli stessi tassi di produzione di nitrati, è molto probabile che le principali vie di degradazione del carbonio siano intatte e funzionali. Il substrato scelto per il test (farina di erba medica in polvere) presenta un buon rapporto carbonio/azoto (compreso normalmente tra 12:1 e 16:1). Per questo motivo durante il test la carenza di carbonio è ridotta e le comunità microbiche eventualmente danneggiate da una sostanza chimica possono ristabilirsi entro 100 giorni.

▼B

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia, cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può essere utilizzato non soltanto per i prodotti agrochimici ma anche per altre sostanze chimiche di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione dell'azoto di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x, dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione dell'azoto: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica contenente azoto attraverso il processo di ammonificazione e nitrificazione, con formazione del relativo prodotto finale inorganico, il nitrato.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell'x per cento nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

CE_{50} (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo essere stato setacciato il suolo viene ammendato con farine vegetali in polvere ed una parte viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non viene sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione si utilizza un solvente adeguato per estrarre i campioni trattati e i campioni controllo e si determinano le quantità di nitrati presenti negli estratti. La velocità di formazione dei nitrati nei campioni trattati viene comparata con quella dei campioni di controllo, calcolando la percentuale di scarto tra campione trattato e campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni di suolo trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 % le misurazioni continuano fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni di incubazione vengono misurate le quantità di nitrati formate nei campioni trattati ed in quelli di controllo. I risultati dei test effettuati con concentrazioni multiple sono analizzati mediante un modello di regressione ed infine vengono calcolati i valori CE_x (CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio ± 25 %) tra le concentrazioni di nitrati presenti nei campioni controllo e in quelli trattati, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a ± 15 %.

▼B

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di sottocampioni: cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Si utilizza attrezzatura da laboratorio di uso comune tra cui:

— agitatore: agitatore meccanico o dispositivo equivalente;

— centrifuga (3 000 g) o sistema filtrante (con carta da filtro priva di nitrati);

— strumento di sensibilità e riproducibilità adeguata per l'analisi dei nitrati.

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

— contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;

— pH: 5,5-7,5;

— contenuto di carbonio organico: 0,5-1,5 %;

— deve essere misurata la biomassa microbica (8)(9): il contenuto di carbonio di quest'ultima deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo, (ad es. suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

▼B

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianammide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm).

I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile utilizzare suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra - 18 °C e - 22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafo 1.6.3.2), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.4.3 *Ammendamento con substrato organico*

Il suolo deve essere ammendato con idoneo substrato organico, ad es. farina di erba medica verde in polvere (componente principale: *Medicago sativa)* con un rapporto carbonio-azoto (C/N) compreso tra 12:1 e 16:1. Si raccomanda una proporzione di 5 g di erba medica per ogni chilogrammo di terreno (peso secco).

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1-0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rivestita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con una quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm^3. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione. Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

▼B

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta di alcuna sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato, sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione occorre evitare di compattare o agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e per i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1.3 *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, i tassi di formazione di nitrati nei campioni trattati vengono comparati con quelli riscontrati nei campioni controllo. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno vengono determinate le quantità di nitrati nei campioni trattati e nei campioni controllo e calcolati i valori CE_x.

▼B

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare la quantità di nitrati nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei nitrati sui campioni di suolo viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di nitrati nel suolo.

1.7.2.2 *Analisi dei campioni di suolo*

Ad ogni campionamento viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I nitrati vengono estratti dal suolo agitando i campioni con idoneo solvente di estrazione, ad es. una soluzione 0,1 M di cloruro di potassio. Si raccomanda di utilizzare 5 ml di soluzione KCl per grammo di suolo (peso secco equivalente). Per ottimizzare l'estrazione il campione di suolo e la soluzione di estrazione non devono occupare più della metà del volume del contenitore. La miscela viene agitata a 150 giri al minuto per 60 minuti e poi centrifugata o filtrata; vengono quindi analizzate le fasi liquide per misurare i nitrati. Gli estratti liquidi privi di particelle possono essere stoccati prima dell'analisi ad una temperatura di - 20 ± 5 °C per un massimo di sei mesi.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato di suolo, e i valori medi di tutti i campioni replicati devono essere riportati in una tabella. I tassi di trasformazione dell'azoto devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). La quantità di nitrati è espressa in mg/kg di suolo (peso secco)/die. Il tasso di formazione di nitrati riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale tra i due campioni.

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per stimare i valori CE_x. La quantità di nitrati ottenuta dopo 28 giorni nei campioni trattati, espressa in mg di nitrati/kg di suolo (peso secco), viene comparata con quella riscontrata nei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x. Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza (p = 0,95) dei valori CE_x(10)(11)(12).

Le sostanze di prova che contengono elevate quantità di azoto possono contribuire alla quantità di nitrati che si forma nel corso del test. Se queste sostanze sono testate a concentrazioni elevate (come avviene ad es. per le sostanze chimiche per cui si prevedono applicazioni ripetute) il test deve prevedere adeguati controlli, ad esempio aggiungendo al suolo la sostanza di prova ma non la farina vegetale. I risultati dei controlli devono essere presi in considerazione nel calcolo dei valori CE_x.

▼B

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di formazione dei nitrati nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione dell'azoto nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}.

3. **RELAZIONE**

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

— coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);

— informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);

— destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);

— profondità del campionamento (cm);

— contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);

— pH (in acqua);

— contenuto di carbonio organico (% peso secco);

— contenuto di azoto (% peso secco);

— concentrazione iniziale di nitrati (mg di nitrati/kg peso secco);

— capacità di scambio cationico (mmol/kg);

— biomassa microbica (in termini di percentuale del carbonio organico totale);

— indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;

— tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;

— informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

Sostanza di prova:

— natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Substrato:

— origine del substrato;

— composizione (farina di erba medica, farina di erba medica verde);

— contenuto di carbonio e di azoto (% peso secco);

— dimensione delle maglie del setaccio (mm).

▼B

Condizioni del test:

— informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;

— numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;

— informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;

— temperatura di incubazione;

— contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;

— metodo di incubazione del suolo (campione globale o serie di sottocampioni);

— numero di repliche dei campioni;

— tempi di campionamento;

— metodi utilizzati per l'estrazione dei nitrati dal suolo.

Risultati:

— procedure analitiche e strumenti utilizzati per l'analisi dei nitrati;

— tabelle dei risultati, con i valori singoli ed i valori medi della misurazione dei nitrati;

— variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;

— giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;

— scarto percentuale tra i tassi di formazione dei nitrati per ciascun campionamento o, se opportuno, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 %, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;

— trattamento statistico dei risultati;

— altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.

(10) Litchfield, J.T. e Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DEL CARBONIO

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 217 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare i potenziali effetti a lungo termine di un'unica esposizione a prodotti fitosanitari e possibilmente ad altre sostanze chimiche sull'attività di trasformazione del carbonio ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura *(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft)* (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti *(Environmental Protection Agency)* (3), e dal SETAC (4). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (5). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (6) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate.

Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinarne gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione del carbonio viene effettuato per determinare gli effetti di tali sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

▼B

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una data sostanza sul processo di trasformazione del carbonio nei suoli aerobici superficiali. Il test è sensibile alle variazioni di dimensione e di attività delle comunità microbiche responsabili della trasformazione del carbonio in quanto sottopone tali comunità sia ad uno stress chimico che ad una carenza di carbonio. Viene utilizzato un suolo sabbioso con un basso contenuto di materia organica, che viene trattato con la sostanza di prova ed incubato in condizioni che consentono un rapido metabolismo microbico. In tali condizioni, le fonti di carbonio prontamente disponibile nel suolo si esauriscono rapidamente. Ciò provoca una carenza di carbonio, che da un lato provoca la morte delle cellule microbiche e dall'altro induce dormienza e/o sporulazione. Se il test prosegue per più di 28 giorni, la somma di queste reazioni può essere misurata nei campioni controllo (costituiti da suolo non trattato) come perdita progressiva di biomassa microbica metabolicamente attiva (7). Se nelle condizioni di esecuzione del test la biomassa del suolo sottoposto a stress da carenza di carbonio subisce la presenza di una sostanza chimica, è possibile che essa non riesca a tornare allo stesso livello del campione controllo, per cui si può dedurre che le perturbazioni provocate dalla sostanza di prova in un qualsiasi momento del test spesso dureranno fino alla fine del test.

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia il test non si limita alle sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili; cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può infatti essere utilizzato anche per altre sostanze chimiche, di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione del carbonio di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x, dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione del carbonio: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica, con formazione di un prodotto finale inorganico, l'anidride carbonica.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell'x per cento nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

CE_{50} (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

▼B

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo la setacciatura, una parte del suolo viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non è sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione, i campioni di suolo trattati con la sostanza di prova e i campioni controllo sono miscelati con glucosio e per 12 ore consecutive vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio, espressi in termini di anidride carbonica emessa (mg di anidride carbonica/kg di suolo peso secco/ora) o di ossigeno consumato (mg di ossigeno/kg di suolo/ora). Il tasso di respirazione medio dei campioni di suolo trattato viene comparato con quello dei campioni controllo e viene calcolata la percentuale di scarto del campione trattato rispetto al campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 %, le misurazioni continuano ad intervalli di 14 giorni fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici, ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio (cioè la media delle quantità di anidride carbonica prodotta o di ossigeno consumato). I risultati dei test effettuati con una serie di concentrazioni sono analizzati mediante un modello di regressione; infine vengono calcolati i valori CE_x (CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio ± 25 %) tra l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato nei (o dai) campioni di suolo trattato e nei controlli, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a ± 15 %.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di campioni singoli: cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili, devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Per determinare i tassi di respirazione indotta dal glucosio sono necessari sistemi di incubazione e strumenti per la misurazione della produzione di anidride carbonica o del consumo di ossigeno. La letteratura scientifica citata in bibliografia riporta alcuni esempi di sistemi e strumenti utilizzabili [cfr. (8) (9) (10) (11)].

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

— contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;

▼B

— pH: 5,5- 7,5;

— contenuto di carbonio organico: 0,5- 1,5 %;

— deve essere misurata la biomassa microbica (12)(13), il cui contenuto di carbonio deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo (ad es. i suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianammide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm). I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile l'uso di suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra - 18 °C e - 22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1- 0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rivestita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con la quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici o su altre sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni di prova. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm^3. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione.

Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

▼B

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta della sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione, bisogna evitare di compattare o di agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale, occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1. *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, viene comparata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e nei controlli. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e in quelli di controllo e vengono calcolati i valori CE_x.

▼B

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare i tassi di respirazione indotta dal glucosio nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei tassi di respirazione indotta dal glucosio viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di biomassa microbica metabolicamente attiva nel suolo (12).

1.7.2.2 *Misura dei tassi di respirazione indotta dal glucosio*

Ad ogni campionamento viene determinato il tasso di respirazione indotta dal glucosio in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I campioni di suolo vengono miscelati con una quantità di glucosio sufficiente a provocare una reazione respiratoria massima immediata. La quantità di glucosio necessaria per provocare una reazione respiratoria massima in un dato suolo può essere determinata in un test preliminare con una serie di concentrazioni della sostanza (14). Tuttavia, nel caso di suoli sabbiosi con un contenuto di carbonio organico compreso tra lo 0,5 e l'1,5 %, in genere è sufficiente una quantità di glucosio compresa tra 2 000 e 4 000 mg per chilogrammo di suolo (peso secco). Il glucosio può essere ridotto in polvere con sabbia di quarzo fine [10 g di sabbia/kg di suolo (peso secco)] e miscelato con il suolo in modo tale da assicurarne una distribuzione omogenea.

I campioni di suolo arricchiti con glucosio vengono incubati a 20 ± 2 °C in un apparecchio che consenta di misurare i tassi di respirazione in modo continuo, ogni ora, oppure ogni due ore (cfr. paragrafo 1.6.1). Per 12 ore consecutive vengono misurati l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato. Le misurazioni devono iniziare quanto prima, cioè entro 1-2 ore dall'aggiunta del glucosio. Dopo aver misurato la quantità totale di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nel corso delle 12 ore, vengono determinati i tassi medi di respirazione.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato di suolo e si riportano in una tabella i valori medi di tutti i campioni replicati. I risultati devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). I tassi di respirazione indotta dal glucosio sono espressi in mg di anidride carbonica/kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/suolo (peso secco)/ora. Il tasso medio di produzione di anidride carbonica o il tasso medio di consumo di ossigeno riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale fra i due campioni.

▼B

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per stimare i valori CE_x. I tassi di respirazione indotta dal glucosio riscontrati dopo 28 giorni nei campioni trattati [espressi in mg di anidride carbonica/kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/-suolo (peso secco)/ora] sono comparati con quelli dei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x. Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza ($p = 0,95$) dei valori CE_x (15)(16)(17).

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di respirazione nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione del carbonio nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

— coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);

— informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);

— destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);

— profondità del campionamento (cm);

— contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);

— pH (in acqua);

— contenuto di carbonio organico (% peso secco);

— contenuto di azoto (% peso secco);

— capacità di scambio cationico (mmol/kg);

— biomassa microbica iniziale (in termini di percentuale del carbonio organico totale);

— indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;

— tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;

— informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

▼B

Sostanza di prova:

— natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Condizioni del test:

— informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;

— numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;

— informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;

— temperatura di incubazione;

— contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;

— metodo di incubazione del suolo utilizzato (campione globale o serie di sottocampioni);

— numero di repliche dei campioni;

— tempi di campionamento.

Risultati:

— metodo e strumenti utilizzati per misurare i tassi di respirazione;

— tabelle dei risultati, con i valori singoli e i valori medi delle quantità di anidride carbonica o di ossigeno;

— variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;

— giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;

— scarto percentuale tra i tassi di respirazione indotta dal glucosio registrati in ciascun campionamento o, se del caso, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 %, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;

— trattamento statistico dei risultati, ove opportuno;

— altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2ndeds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38:113-120.

(15) Litchfield, J.T. — Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEL SUOLO

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 307 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Il presente metodo di test è basato sulle linee guida esistenti (1)(2)-(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Il metodo descritto è progettato per determinare la trasformazione aerobica ed anaerobica delle sostanze chimiche nel suolo. Gli esperimenti eseguiti hanno l'obiettivo di determinare: i) la velocità di trasformazione della sostanza di prova e ii) la natura e la velocità di formazione e di diminuzione dei prodotti di trasformazione ai quali possono essere esposti piante ed organismi del suolo. Tali studi sono necessari per le sostanze chimiche che vengono applicate direttamente sul suolo o che abbiano probabilità di raggiungere l'ambiente del suolo. I risultati di questi studi di laboratorio possono essere utilizzati anche per sviluppare protocolli di campionamento e di analisi per studi correlati sul campo.

Per la valutazione delle vie di trasformazione sono in genere sufficienti gli studi aerobici ed anaerobici con un solo tipo di suolo (8)(10)(11). I tassi di trasformazione vanno determinati in almeno altri tre suoli (8)(10).

Un workshop dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenutosi a Belgirate nel 1995 (10), ha definito, in particolare, il numero e i tipi di suoli da usarsi in questo test. I tipi di suoli esaminati devono essere rappresentativi delle condizioni ambientali in cui la sostanza verrà usata o rilasciata. Per esempio, le sostanze chimiche che potrebbero essere rilasciate in climi subtropicali e tropicali vanno testate utilizzando Ferrasols o Nitosols (sistema FAO). Il workshop ha inoltre espresso raccomandazioni circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei campioni, sulla base delle linee guida ISO (15). Questo metodo prevede anche l'uso di suoli per risaia.

1.2 DEFINIZIONI

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO_2 e i prodotti che si trovano in residui non estraibili.

Residui non estraibili: i «residui non estraibili» sono sostanze nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o dei suoi metaboliti o prodotti di trasformazione. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole le sostanze stesse o la struttura della matrice. La natura del legame può essere in parte chiarita mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Fino ad oggi, ad esempio, in questo modo sono stati identificati i legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, oltre alle catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce significativamente la bioaccessibilità e la biodisponibilità (12) [modificato da IUPAC 1984 (13)].

Trasformazione aerobica: reazioni che hanno luogo in presenza di ossigeno molecolare (14).

▼B

Trasformazione anaerobica: reazioni che hanno luogo in assenza di ossigeno molecolare (14).

Suolo: miscela di costituenti chimici organici e inorganici (questi ultimi contengono sostanze ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevato peso molecolare), contenente organismi vitali di piccole dimensioni (soprattutto microrganismi). Il suolo può essere manipolato in due stati:

a) indisturbato, come si è sviluppato nel tempo, in strati caratteristici di diversi tipi di suolo;

b) disturbato, come si trova generalmente nei campi arabili o come si riscontra quando ne vengono prelevati campioni mediante scavo, che vengono utilizzati in questo metodo di test (14).

Mineralizzazione: completa degradazione di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di test, quando si utilizza una sostanza marcata al ^{14}C, per mineralizzazione si intende una prolungata degradazione durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato con rilascio della corretta quantità di $^{14}CO_2$ (14).

Tempo di dimezzamento: $\mathbf{t_{0,5}}$, è il tempo necessario per una trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; è indipendente dalla concentrazione.

DT_{50} (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 50 %; è diverso dal tempo di dimezzamento $t_{0,5}$ quando la trasformazione non segue la cinetica di primo ordine.

DT_{75} (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 75 %.

DT_{90} (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici si utilizzano sostanze di riferimento.

1.4 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze chimiche (non marcate o radiomarcate) per le quali è disponibile un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. È applicabile a sostanze lievemente volatili, non volatili, idrosolubili e non idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche altamente volatili dal suolo (ad es. fumiganti, solventi organici) che non possono essere tenute all'interno del suolo nelle condizioni sperimentali necessarie per questo test.

▼B

1.5 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile usare una sostanza di prova non marcata o marcata. Il materiale marcato è necessario per lo studio della via di trasformazione e per definire un bilancio di massa. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C, sebbene possa essere utile anche l'uso di altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Per quanto possibile, la marcatura va applicata alla parte o alle parti più stabili della molecola ([1]). La purezza della sostanza di prova deve essere almeno del 95 %.

Prima di eseguire un test sulla trasformazione aerobica ed anaerobica nel suolo, devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua (Metodo A.6)

b) solubilità in solventi organici;

c) tensione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A. 8);

e) stabilità chimica al buio (idrolisi) (Metodo C.7);

f) pK_a se una molecola è soggetta a protonazione o deprotonazione (Linee guida OCSE 112) (16).

Altre informazioni utili possono essere costituite da dati sulla tossicità della sostanza di prova per i microrganismi del suolo (Metodi di test C.21 e C.22) (16).

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi metodi per l'estrazione e di depurazione) per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione.

1.6 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

I campioni di suolo vengono trattati con la sostanza di prova e incubati al buio in contenitori per biometria o in sistemi a flusso continuo in condizioni controllate di laboratorio (a temperatura e umidità costante del suolo). Dopo adeguati intervalli di tempo, i campioni di suolo vanno estratti e analizzati alla ricerca della sostanza progenitrice e dei prodotti di trasformazione. Mediante adeguati dispositivi di assorbimento vengono raccolti anche i prodotti volatili e sottoposti ad analisi. Impiegando materiale ^{14}C-marcato è possibile misurare i tassi di mineralizzazione della sostanza di prova intercettando il $^{14}CO_2$ evoluto e determinare un bilancio di massa, compresa la formazione di residui non estraibili.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di suolo almeno duplicati, immediatamente dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per le fasi successive degli esperimenti sono determinate dai rispettivi bilanci di massa e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (8) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate (3).

([1]) Per esempio, se la sostanza di prova contiene un solo anello, è necessario marcare tale anello; se la sostanza contiene due anelli o più, possono risultare necessari studi separati per valutare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

▼B

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo di analisi**

La ripetibilità del metodo di analisi (esclusa l'efficienza di estrazione iniziale) per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata duplicando l'analisi dello stesso estratto di suolo, incubato sufficientemente a lungo perché si formino prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo di analisi per la sostanza di prova e per i prodotti di trasformazione deve essere di almeno 0,01 mg kg^{-1} di suolo (come sostanza di prova) o dell'1 % della dose applicata (scegliere il dato inferiore). Il limite di quantificazione va anch'esso specificato.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati circa l'affidabilità della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica di pseudo primo ordine) o i valori DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90}.

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.8.1 **Apparecchiature e reagenti chimici**

I sistemi di incubazione sono costituiti da sistemi statici chiusi o adeguati sistemi a flusso continuo (7)(17). Le figure 1 e 2 mostrano rispettivamente esempi di apparecchi di flusso adatti all'incubazione del suolo e contenitori per biometria. Entrambi i tipi di sistemi di incubazione presentano vantaggi e limiti (7)(17).

È necessario disporre di un'attrezzatura standard da laboratorio, e in particolare:

— strumentazione analitica quale apparecchi per GLC, HPLC, TLC, compresi adeguati sistemi di rilevazione per l'analisi di sostanze radiomarcate e non radiomarcate, o il metodo di diluizione isotopica inversa;

— strumenti di identificazione (ad esempio: MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN, ecc.);

— rivelatore a scintillazione a liquido;

— ossidatore per la combustione del materiale radioattivo;

— centrifuga;

— apparecchio per l'estrazione (per esempio tubi da centrifuga per l'estrazione a freddo ed estrattore di Soxhlet per l'estrazione continua sotto riflusso);

— strumentazione per la concentrazione di soluzioni ed estratti (ad es. evaporatore a rotazione);

— bagnomaria;

— apparecchio per miscelatura meccanica (ad es. impastatrice, miscelatore a rotazione).

▼B

I reagenti chimici usati sono, ad esempio:

— NaOH, grado analitico, 2 mol· dm^{-3}, o un'altra base adeguata (ad es. KOH, etanolammina);

— H_2SO_4, grado analitico, 0,05 mol· dm^{-3};

— glicole etilenico, grado analitico;

— materiali assorbenti solidi, quali calce sodata e tappi in poliuretano;

— solventi organici, grado analitico, quali acetone, metanolo, ecc.;

— liquido per scintillazione.

1.8.2 **Applicazione della sostanza di prova**

Per introdurre e distribuire la sostanza di prova nel suolo la si può sciogliere in acqua (distillata o deionizzata) o, se necessario, in minime quantità di acetone o di altri solventi organici (6) nei quali la sostanza di prova sia sufficientemente solubile e stabile. La quantità di solvente scelto non deve però esercitare un'influenza significativa sull'attività microbica del suolo (vedi sezioni 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Va evitato l'impiego di solventi che inibiscono l'attività microbica, quali il cloroformio, il diclorometano e altri solventi alogenati.

La sostanza di prova può essere aggiunta anche in forma solida, ad es. mista a sabbia quarzosa (6) o in un piccolo sottocampione del suolo sperimentale che sia stato asciugato all'aria e sterilizzato. Se la sostanza di prova viene aggiunta con l'ausilio di un solvente, occorre permettere al solvente di evaporare prima di aggiungere il sottocampione arricchito al campione di suolo originale non sterile.

Per le sostanze chimiche generiche, che entrano nel suolo soprattutto attraverso i fanghi delle acque di scarico e le pratiche agricole, la sostanza di prova va prima aggiunta al fango, che viene poi introdotto nel campione di suolo (vedi sezioni 1.9.2 e 1.9.3).

Di norma non si consiglia l'impiego di prodotti formulati, che possono però costituire una valida alternativa, ad esempio, per le sostanze di prova scarsamente solubili.

1.8.3 **Suoli**

1.8.3.1 *Selezione del suolo*

Per determinare la via di trasformazione è possibile usare un suolo rappresentativo; è consigliabile impiegare un limo sabbioso, un limo fangoso, un limo glaciale o una sabbia limosa [secondo la classificazione FAO e USDA (18)] con un pH di 5,5-8,0, un contenuto di carbonio organico dello 0,5-2,5 % e una biomassa microbica pari ad almeno l'1 % del carbonio organico totale (10).

Per gli studi dei tassi di trasformazione occorre usare almeno tre suoli aggiuntivi che rappresentino una gamma di suoli attinenti. I suoli devono differire tra loro in quanto a contenuto di carbonio organico, pH, contenuto di argilla e biomassa microbica (10).

▼B

Tutti i suoli devono essere caratterizzati per lo meno per quanto concerne struttura (% di sabbia, % di limo, % di argilla) [secondo la classificazione FAO e USDA (18)], pH, capacità di scambio dei cationi, carbonio organico, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica ([1]) e biomassa microbica (solo per gli studi aerobici). Per l'interpretazione dei risultati possono essere utili ulteriori informazioni sulle proprietà del suolo. Per determinare le caratteristiche del suolo è possibile usare i metodi raccomandati nelle voci bibliografiche (19)(20)(21)(22)(23). La biomassa microbica va determinata utilizzando il metodo della respirazione indotta dal substrato (25)(26) o metodi alternativi (20).

1.8.3.2 *Raccolta, manipolazione e conservazione dei suoli*

Occorre fornire possibilmente informazioni dettagliate circa la storia del sito da cui è stato raccolto il suolo per il test. Tali dettagli comprendono il luogo esatto, la copertura vegetale, i trattamenti con sostanze chimiche, i trattamenti con fertilizzanti organici e inorganici, l'aggiunta di materiali biologici e altri tipi di contaminazione. I suoli trattati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nei precedenti quattro anni non vanno usati per gli studi sulla trasformazione (10)(15).

Il suolo deve essere raccolto di fresco sul campo (dall'orizzonte A o dallo strato superficiale di 20 cm) ad un tasso di umidità tale da facilitarne la setacciatura. Per suoli diversi da quelli provenienti dalle risaie, occorre evitare la raccolta di campioni durante o immediatamente dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità, gelo o inondazione (14). I campioni vanno trasportati in modo da ridurre al minimo l'alterazione del tasso di umidità del suolo e vanno tenuti al buio ma, per quanto possibile, con libero passaggio dell'aria. A tale scopo risulta generalmente adeguata una busta di polietilene con l'apertura allentata.

Il suolo deve essere trattato appena possibile dopo il campionamento. Occorre asportare la vegetazione, la fauna di maggiori dimensioni e le pietre, prima di passare il suolo attraverso un setaccio di 2 mm che rimuova le pietre, la fauna e i detriti delle piante di piccole dimensioni. Occorre evitare di essiccare e rompere eccessivamente il suolo prima della setacciatura (15).

Quando in inverno il campionamento sul campo risulta difficoltoso (suolo gelato o coperto da strati di neve), il campione può essere prelevato da un lotto di suolo conservato in serra sotto copertura vegetale (ad es. erba o miscugli erba-trifoglio). Sono di gran lunga preferibili gli studi con suoli appena raccolti dal campo, ma dovendo conservare il suolo raccolto e trattato prima di poter avviare lo studio, le condizioni di conservazione devono essere adeguate e limitate nel tempo (4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi) per mantenere l'attività microbica ([2]). Istruzioni dettagliate circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei suoli da usarsi per gli esperimenti di biotrasformazione sono reperibili in (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) La caratteristica della ritenzione idrica di un suolo può essere misurata come capacità di campo, come capacità idrica di ritenuta o come tensione di aspirazione dell'acqua (pF). Per le spiegazioni, cfr. l'allegato 1. Nella relazione è necessario riferire se le caratteristiche di ritenzione idrica e il peso specifico apparente dei suoli sono stati determinati in campioni di campi indisturbati o in campioni disturbati (lavorati)

([2]) I risultati di recenti ricerche indicano che i suoli delle zone temperate possono essere conservati anche a - 20 °C per oltre tre mesi (28)(29) senza perdita significativa dell'attività microbica.

▼B

Prima che il suolo trattato venga usato per questo test, deve essere pre-incubato per consentire la germinazione e la rimozione dei semi, e per ristabilire l'equilibrio del metabolismo microbico successivamente al passaggio dalle condizioni di campionamento o conservazione alle condizioni di incubazione. Generalmente è ritenuto adeguato un periodo di pre-incubazione di 2-28 giorni in cui ci si avvicina alle condizioni di temperatura e umidità del test vero e proprio (15). Il tempo di conservazione e di pre-incubazione non deve superare complessivamente i tre mesi.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST

1.9.1 **Condizioni**

1.9.1.1 *Temperatura*

Durante tutto il periodo del test, i suoli vanno incubati al buio a una temperatura costante rappresentativa delle condizioni climatiche del luogo in cui verranno usati o rilasciati. Una temperatura di 20 ± 2 ºC è consigliata per tutte le sostanze sperimentali che possono raggiungere il suolo in climi temperati. La temperatura va monitorata.

Per le sostanze chimiche applicate o rilasciate in climi più freddi (ad es. nei paesi settentrionali, durante il periodo autunnale o invernale), occorre incubare anche altri campioni di suolo a una temperatura inferiore (ad es. 10 ± 2 ºC).

1.9.1.2 *Tenore di umidità*

Per i test di trasformazione in condizioni aerobiche, il tenore di umidità del suolo ([1]) deve essere regolato e mantenuto a un pF compreso fra 2,0 e 2,5 (3). Il tenore di umidità del suolo si esprime come massa di acqua per massa di suolo secco e va controllato regolarmente (ad es. a intervalli di 2 settimane) mediante pesatura dei contenitori di incubazione; eventuali perdite di acqua vanno compensate con un'aggiunta di acqua (preferibilmente acqua corrente filtrata in condizioni sterili). Nel fare questo occorre prestare attenzione in modo da prevenire o ridurre al minimo le perdite di sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione per volatilizzazione e/o fotodegradazione.

Per i test di trasformazione in condizioni anaerobiche e in risaia, il suolo va saturato di acqua mediante inondazione.

1.9.1.3 *Condizioni aerobiche di incubazione*

Nei sistemi a flusso continuo le condizioni aerobiche sono mantenute mediante afflusso intermittente o ventilazione continua con aria umidificata. Nei contenitori per studi biometrici, lo scambio dell'aria viene mantenuto per diffusione.

1.9.1.4 *Condizioni aerobiche sterili*

Per ottenere informazioni sulla rilevanza della trasformazione abiotica di una sostanza di prova, i campioni di suolo possono essere sterilizzati (per i metodi di sterilizzazione, cfr. i riferimenti bibliografici 16 e 29), trattati con sostanza di prova sterile (ad es. aggiunta di soluzione attraverso un filtro sterile) e aerati con aria sterile umidificata come descritto nella sezione 1.9.1.3. Per i terreni da risaia, suolo e acqua vanno sterilizzati e l'incubazione va effettuata come descritto nella sezione 1.9.1.6.

([1]) Per areare e nutrire adeguatamente la microflora del suolo, il suolo non deve essere né troppo umido né troppo secco. I tenori di umidità raccomandati per una crescita microbica ottimale sono compresi fra il 40 e il 60 % della capacità idrica di ritenuta e fra 0,1 e 0,33 bar (6). Quest'ultima gamma di valori equivale a una gamma pF di 2,0-2,5. Nell'allegato 2 sono indicati i tenori di umidità tipici di vari tipi di suoli.

▼B

1.9.1.5 *Condizioni anaerobiche di incubazione*

Per ottenere e mantenere condizioni anaerobiche, il suolo trattato con la sostanza di prova e incubato in condizioni aerobiche per 30 giorni o un tempo di dimezzamento o DT_{50} (il tempo più breve) viene successivamente impregnato d'acqua (strato di acqua di 1-3 cm) e il sistema di incubazione viene sommerso con un gas inerte (ad es. azoto o argon) ([1]). Il sistema di prova deve consentire di effettuare anche misurazioni ad es. del pH, della concentrazione di ossigeno e del potenziale di ossidoriduzione e comprendere dispositivi di cattura dei prodotti volatili. Il sistema a biometro deve essere chiuso in modo da evitare l'ingresso di aria per diffusione.

1.9.1.6 *Condizioni di incubazione in risaia*

Per studiare la trasformazione nei suoli allagati da risaia, il suolo viene allagato con uno strato di acqua di circa 1-5 cm e la sostanza di prova viene applicata alla fase acquosa (9). Si raccomanda che il suolo sia profondo almeno 5 cm. Il sistema è ventilato con aria in condizioni aerobiche. pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione dello strato acquoso vanno monitorati e indicati nella relazione. Prima di iniziare gli studi sulla trasformazione il suolo va tenuto in preincubazione per almeno due settimane (cfr. sezione 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Durata del test*

Gli studi sulla velocità e la via di trasmissione non dovrebbero di norma superare i 120 giorni ([2]) (3)(6)(8), poiché, superato questo lasso di tempo, è molto probabile che in un sistema artificiale di laboratorio, isolato dalla naturale ricostituzione, si verifichi una riduzione dell'attività microbica. Se necessario, per caratterizzare la diminuzione della sostanza di prova e la formazione e la diminuzione dei principali prodotti di trasformazione, è possibile continuare gli studi per periodi più lunghi (ad es. 6 o 12 mesi) (8). In caso di prolungamento dei tempi di incubazione occorre dare motivazione nella relazione, aggiungendo i dati delle misurazioni della biomassa durante e alla fine dei periodi di incubazione.

1.9.2 **Esecuzione del test**

In ciascun contenitore per incubazione si sistemano circa 50-200 g di suolo (peso a secco) (cfr. figure 1 e 2 nell'allegato 3), che viene trattato con la sostanza di prova utilizzando uno dei metodi descritti nella sezione 1.8.2. Se si impiegano solventi organici per l'applicazione della sostanza di prova, è necessario eliminarli dal suolo per evaporazione. Il suolo va poi miscelato accuratamente con una spatola e/o scuotendo il contenitore. Se si conduce lo studio in condizioni di risaia, occorre miscelare accuratamente acqua e suolo dopo l'applicazione della sostanza di prova. Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) dei suoli trattati. Per un metodo alternativo, cfr. sotto.

([1]) Le condizioni aerobiche sono dominanti nei suoli superficiali e anche negli strati sotto la superficie, come dimostrato dal progetto di ricerca sponsorizzato dall'UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Condizioni anaerobiche possono verificarsi solo occasionalmente durante l'inondazione dei suoli dopo forti piogge o quando le risaie vengono sommerse.

([2]) Gli studi aerobici possono essere conclusi molto prima di 120 giorni, a condizione che al momento della conclusione siano state raggiunte con certezza la via definitiva di trasformazione e la massima mineralizzazione. È possibile concludere il test dopo 120 giorni o quando almeno il 90 % della sostanza di prova è trasformata, ma solo se si è formato almeno il 5 % di CO_2.

▼B

Il tasso di concentrazione delle sostanze per il trattamento deve corrispondere al tasso più elevato di applicazione di un prodotto fitosanitario indicato nelle istruzioni per l'uso e con incorporazione uniforme a una profondità adeguata nel terreno del campo (ad es. strato superficiale di 10 cm ([1]) di suolo). Per esempio, per le sostanze chimiche da applicare sul fogliame o sul suolo senza incorporazione, la profondità corretta per calcolare quanta sostanza chimica occorre aggiungere a ciascun contenitore è 2,5 cm. Per le sostanze chimiche da incorporare nel suolo, la profondità corretta è la profondità di incorporazione specificata nelle istruzioni per l'uso. Per le sostanze chimiche generiche, il tasso di applicazione va calcolato sulla base della via di somministrazione più rilevante; per esempio, quando la principale via di somministrazione nel suolo sono i fanghi di acque reflue, la sostanza chimica va dosata nel fango ad una concentrazione che rispecchi il normale carico di fanghi nei suoli agricoli. Se tale concentrazione non è sufficientemente elevata per identificare i principali prodotti di trasformazione, può essere utile l'incubazione di campioni di suolo separati con tenore più elevato, ma è importante evitare di eccedere nelle quantità per non avere reazioni che influiscono sulle funzioni microbiche (cfr. sezioni 1.5 e 1.8.2).

In alternativa è possibile trattare con la sostanza di prova un lotto più esteso (ad es. di 1-2 kg), accuratamente mescolato in un miscelatore adeguato e poi diviso in porzioni più piccole di 50-200 g nei contenitori per l'incubazione (per esempio usando inquartatori di campioni). Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) del lotto di suolo trattato. Una procedura di questo tipo è preferibile, in quanto consente una distribuzione più uniforme della sostanza di prova nel suolo.

Anche i campioni di suolo non trattati vengono incubati nelle stesse condizioni (aerobiche) dei campioni trattati con la sostanza di prova. Tali campioni sono usati per le misurazioni della biomassa durante e alla fine degli studi.

Quando la sostanza di prova viene applicata al suolo disciolta in uno o più solventi organici, occorre incubare anche campioni di suolo trattati con la stessa quantità di solvente/i mantenendo le stesse condizioni (aerobiche) utilizzate per i campioni trattati con la sostanza di prova. I campioni trattati vengono usati per le misurazioni della biomassa all'inizio, durante e alla fine degli studi per controllare gli eventuali effetti del/i solvente/i sulla biomassa microbica.

I contenitori con il suolo trattato vengono collegati al sistema a flusso continuo descritto nella figura 1 o chiusi con la colonna di assorbimento di cui alla figura 2 (cfr. allegato 3).

([1]) Calcolo della concentrazione iniziale su una base d'area usando la seguente equazione:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^6[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^4[m^2/ha]\cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = concentrazione iniziale nel suolo [mg· kg]

A = tasso di applicazione [kg· ha^{-1}]; l = spessore dello strato di suolo nel campo [m]; d = peso specifico apparente secco del suolo [kg· m^{-3}].

Di massima, con un tasso di applicazione di 1 kg· ha^{-1} si ottiene una concentrazione nel suolo di circa 1 mg· kg^{-1} in uno strato di 10 cm (presupponendo un peso specifico apparente di 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Campionamento e misurazione**

I contenitori doppi per l'incubazione vengono rimossi ad opportuni intervalli di tempo per estrarre i campioni di suolo con solventi appropriati di diversa polarità che vengono poi analizzati alla ricerca della sostanza di prova e/o di prodotti di trasformazione. Uno studio ben disegnato prevede un numero sufficiente di contenitori per consentire di sacrificare due contenitori durante ciascun campionamento. Inoltre, le soluzioni di assorbimento o i materiali solidi di assorbimento vengono rimossi a vari intervalli di tempo (intervalli di 7 giorni durante il primo mese e, successivamente, a intervalli di 17 giorni) durante e alla fine dell'incubazione di ciascun campione e analizzati alla ricerca di prodotti volatili. Oltre a un campione di suolo prelevato subito dopo l'applicazione (campione del giorno 0) occorre prevedere almeno altri 5 momenti di campionamento. Gli intervalli di tempo vanno scelti in modo da poter stabilire una costante di diminuzione della sostanza di prova e costanti di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione (ad es. giorni 0, 1, 3, 7; settimane 2, 3; mesi 1, 2, 3, ecc.).

Quando si utilizza una sostanza di prova ^{14}C-marcata, la radioattività non estraibile verrà quantificata per combustione e per ogni intervallo di campionamento verrà calcolato un bilancio di massa.

Nel caso di incubazione anaerobica e in risaia, le fasi di suolo e d'acqua vengono analizzate insieme per ricercare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione, oppure separate per filtrazione o centrifugazione prima dell'estrazione e dell'analisi.

1.9.4 **Test opzionali**

Studi aerobici, non sterili, ad altre temperature e diverse concentrazioni di umidità del suolo possono risultare utili per stimare gli effetti della temperatura e dell'umidità del suolo sulla velocità di trasformazione di una sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione nel suolo.

È possibile tentare un'ulteriore caratterizzazione della radioattività non estraibile usando, ad esempio, l'estrazione fluida supercritica.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Le quantità delle sostanza di prova, dei prodotti di trasformazione e delle sostanze volatili (solo in %) e non estraibili vanno indicate come % della concentrazione iniziale applicata e, ove pertinente, in $mg \cdot kg^{-1}$ di suolo (in base al peso secco del suolo) per ciascun intervallo di campionamento. È necessario indicare in percentuale l'equilibrio di massa della concentrazione iniziale applicata per ciascun intervallo di campionamento. La presentazione grafica delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo consentirà una stima del suo tempo di dimezzamento o DT_{50} di trasformazione. È inoltre necessario identificare i principali prodotti di trasformazione, rappresentandone graficamente le concentrazioni in funzione del tempo per evidenziarne la velocità di formazione e di diminuzione. Per principale prodotto di trasformazione si intende qualsiasi prodotto che rappresenti $\geq$ 10 % della dose applicata in qualsiasi momento nel corso dello studio.

I prodotti volatili intrappolati forniscono una certa indicazione del potenziale di volatilità di una sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione dal suolo.

▼B

È possibile calcolare in modo più accurato i tempi di dimezzamento o i valori DT_{50} e, se pertinente, i valori DT_{75} e DT_{90} utilizzando adeguati modelli cinetici. Il tempo di dimezzamento e i valori DT_{50} vanno riportati nella relazione insieme alla descrizione del modello usato, dell'ordine della cinetica e del coefficiente di determinazione (r^2). Si preferisce la cinetica di primo ordine, a meno che $r^2 < 0,7$. Se del caso, i calcoli vanno applicati anche ai principali prodotti di trasformazione. Nei riferimenti bibliografici da 31 a 35 sono descritti esempi di modelli adeguati.

Nel caso di studi sulla velocità eseguiti a diverse temperature, le velocità di trasformazione vanno descritte come funzione della temperatura all'interno della gamma di temperature sperimentali, usando il rapporto di Arrhenius della formula:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

dove ln A e B sono costanti di regressione, rispettivamente, dall'intercetta e dalla pendenza di una retta best fit generata dalla regressione lineare di ln k rispetto a 1/T, k è la velocità costante alla temperatura T e T è la temperatura in Kelvin. Occorre prestare attenzione alla gamma limitata di temperature in cui il rapporto di Arrhenius sarà valido nel caso la trasformazione sia governata dall'azione microbica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sebbene gli studi vengano eseguiti in un sistema artificiale di laboratorio, i risultati consentiranno di stimare la velocità di trasformazione della sostanza di prova, oltre che il tasso di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione in condizioni paragonabili a quelle di campo (36)(37).

Lo studio della via di trasformazione di una sostanza di prova fornisce informazioni sul modo in cui la sostanza applicata viene modificata strutturalmente nel suolo da reazioni chimiche e microbiche.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni specifiche:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura [indicante la(e) posizione(i) della(e) marcatura(e) quando si utilizza materiale radiomercato] e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sezione 1.5);

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività specifica (ove pertinente).

Sostanze di riferimento:

— nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento usate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Suoli sperimentali:

— particolari riguardanti il sito di raccolta;

— data e procedura di campionamento dei suoli;

▼B

— proprietà dei suoli, quali pH, contenuto di carbonio organico, tessitura (% sabbia, % limo, % argilla), capacità di scambio dei cationi, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica e biomassa microbica;

— durata della conservazione del suolo e condizioni di conservazione (se pertinente).

Condizioni del test:

— date di esecuzione degli studi;

— quantità di sostanza di prova applicata;

— solventi usati e metodo di applicazione per la sostanza di prova;

— peso del suolo trattato inizialmente e campionato a ciascun intervallo per essere analizzato;

— descrizione del sistema di incubazione;

— tassi di flusso dell'aria (solo per i sistemi a flusso continuo);

— temperatura dell'ambiente sperimentale;

— tasso di umidità del suolo durante l'incubazione;

— biomassa microbica all'inizio, durante e alla fine degli studi aerobici;

— pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione all'inizio, durante e alla fine degli studi anaerobici e in risaia;

— metodo/i di estrazione;

— metodi per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei principali prodotti di trasformazione nel suolo e nei materiali di assorbimento;

— numero di replicati e numero di controlli.

Risultati:

— risultato della determinazione dell'attività microbica;

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici usati;

— tassi di recupero (i valori % per uno studio valido sono indicati nella sezione 1.7.1);

— tabelle dei risultati espressi in % della dose iniziale applicata e, ove pertinente, in $mg \cdot kg^{-1}$ di suolo (base di peso secco);

— bilancio di massa durante e alla fine degli studi;

— caratterizzazione della radioattività o dei residui non estraibili nel suolo;

— quantificazione del CO^2 e di altre sostanze volatili rilasciate;

— grafici delle concentrazioni nel suolo in funzione del tempo riferiti alla sostanza di prova e, ove pertinente, ai principali prodotti di trasformazione;

— tempo di dimezzamento o DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, ove pertinente, dei principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza;

▼B

— stima della velocità di degradazione abiotica in condizioni sterili;

— una valutazione della cinetica di trasformazione per la sostanza di prova e, ove pertinente, per i principali prodotti di trasformazione;

— vie di trasformazione proposte, ove pertinente;

— discussione e interpretazione dei risultati;

— dati originali (cioè cromatogrammi campione, calcoli campione dei tassi di trasformazione e metodi usati per identificare i prodotti di trasformazione).

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Unione europea (UE) (1995). Direttiva 95/36/CE della Commissione, del 14 luglio 1995, che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. Allegato II, parte A ed allegato III, parte A: Destino e comportamento nell'ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality — Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Allegato V della direttiva 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33,47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24,1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

ALLEGATO 1

TENSIONE DELL'ACQUA, CAPACITÀ DI CAMPO (FC) E CAPACITÀ DI RITENUTA IDRICA (WHC) [1]

Altezza della colonna d'acqua [cm]	pF [a]	bar [b]	Note
10^7	7	10^4	Suolo secco
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Punto di appassimento
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Gamma della capacità di campo [d] imazione)
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approssimazione)
1	0	0,001	Suolo saturato d'acqua

[a] pF = log di cm di colonna d'acqua.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Corrisponde a un contenuto idrico approssimativo del 10 % in sabbia, 35 % in limo e 45 % in argilla.
[d] La capacità di campo non è costante ma varia con il tipo di suolo fra pF 1,5 e 2,5.

La *tensione dell'acqua* si misura in cm di colonna d'acqua o in bar. A motivo dell'ampia gamma di tensione di aspirazione viene espressa semplicemente come valore pF, che è equivalente al logaritmo di cm di colonna d'acqua.

La *capacità di campo* si definisce come la quantità d'acqua che può essere conservata contro la gravità da parte di un suolo naturale 2 giorni dopo un periodo di pioggia prolungato o dopo irrigazione sufficiente. Viene determinata in suolo indisturbato in situ nel campo. La misurazione, pertanto, non è applicabile ai campioni di suolo disturbati di laboratorio. I valori FC determinati in suoli disturbati possono presentare notevoli varianze sistematiche.

La *capacità di ritenuta idrica* (WHC) si definisce in laboratorio con suolo indisturbato e disturbato saturando una colonna di suolo con acqua per trasporto capillare. È particolarmente utile per i suoli disturbati e può essere fino al 30 % superiore alla capacità di campo (1). Inoltre, sperimentalmente è più semplice da determinare rispetto ai valori affidabili diFC.

Note

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

ALLEGATO 2

CONTENUTO DI UMIDITÀ DEL SUOLO (g di acqua per 100 g di suolo secco) DI VARI TIPI DI SUOLO DA DIVERSI PAESI

Tipo di suolo	Paese	Contenuto di umidità del suolo a		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Sabbia	Germania	28,7	8,8	3,9
Sabbia limosa	Germania	50,4	17,9	12,1
Sabbia limosa	Svizzera	44,0	35,3	9,2
Limo fangoso	Svizzera	72,8	56,6	28,4
Limo argilloso	Brasile	69,7	38,4	27,3
Limo argilloso	Giappone	74,4	57,8	31,4
Limo sabbioso	Giappone	82,4	59,2	36,0
Limo fangoso	USA	47,2	33,2	18,8
Limo sabbioso	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Capacità di ritenuta idrica.

▼B

ALLEGATO 3

Figura 1

Esempio di apparecchio a flusso continuo per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo ([1]) ([2])

1: valvola ad ago

2: bottiglia di lavaggio contenente acqua

3: ultramembrana (solo condizioni sterili), dimensione dei pori 0,2 µm

4: contenitore per metabolismo del suolo (impregnato d'acqua solo per le condizioni anaerobiche e di risaia;)

5: trappola a etilenglicole per composti organici volatili

6: trappola ad acido solforico per composti volatili alcalini

7, 8: trappola a idrossido di sodio per CO_2 e altre sostanze volatili acide

9: flussometro.

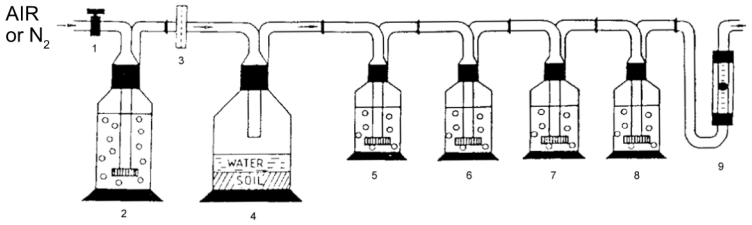
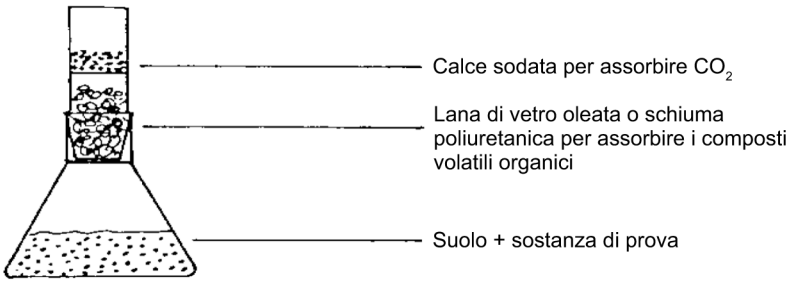


Figura 2

Esempio di contenitori per sistemi a biometro per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEI SISTEMI SEDIMENTOSI ACQUATICI

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 308 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Le sostanze chimiche possono penetrare nelle acque superficiali, basse o profonde, per applicazione diretta, deriva di sostanze nebulizzate, deflusso, drenaggio, smaltimento di rifiuti, effluenti industriali, domestici o agricoli e deposizione atmosferica. Questo metodo di prova descrive un metodo di laboratorio per determinare la trasformazione aerobica e anaerobica di sostanze chimiche organiche nei sistemi sedimentosi acquatici. Esso si basa su linee guida esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6). Un gruppo di lavoro OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenuto a Belgirate nel 1995 (7), ha definito, in particolare, il numero e il tipo di sedimenti da usare per questo test e ha formulato alcune raccomandazioni sulla raccolta, la manipolazione e la conservazione di campioni di sedimento, sulla base di norme ISO (8). Questi studi sono necessari per esaminare le sostanze chimiche che sono direttamente introdotte nell'acqua o che hanno la possibilità di raggiungere l'ambiente acquatico tramite le vie sopra menzionate.

I sistemi sedimentosi acquatici naturali hanno speso condizioni aerobiche nella fase acquosa superiore. Lo strato superficiale del sedimento può essere aerobico o anaerobico, mentre il sedimento più profondo è solitamente anaerobico. Per tenere conto di tutte queste possibilità, il presente documento descrive prove sia aerobiche, sia anaerobiche. La prova aerobica simula una colonna d'acqua aerobica sopra uno strato di sedimento aerobico sotto il quale si trova un gradiente anaerobico. La prova anaerobica simula un sistema acqua-sedimento completamente anaerobico. Vi sono altri metodi utilizzabili in circostanze nelle quali occorre scostarsi significativamente da queste raccomandazioni, per esempio impiegando nuclei di sedimento intatti o sedimenti che potrebbero essere stati esposti alla sostanza di prova (9).

1.2 DEFINIZIONI

In tutti i casi vanno applicate le unità del sistema internazionale (SI).

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivate da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO_2 e i residui non estraibili.

Residui non estraibili: composti presenti nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o di uno o più dei suoi metaboliti. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole i composti stessi o la struttura della matrice. La natura del legame può essere chiarita, in parte, mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Finora, ad esempio, sono stati individuati in questo modo legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, come pure le catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce la bioaccessibilità e la biodisponibilità in maniera significativa (10) [modificato da IUPAC 1984 (11)].

▼B

Trasformazione aerobica: (ossidante): reazioni che si verificano in presenza di ossigeno molecolare (12).

Trasformazione anaerobica: (riducente): reazioni che si verificano in assenza di ossigeno molecolare (12).

Acque naturali: acque superficiali ottenute da laghi, fiumi, ruscelli, ecc.

Sedimento: miscela di costituenti chimici inorganici e organici, questi ultimi contenenti composti ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevata massa molecolare. Viene depositato dall'acqua naturale con cui forma un'interfaccia.

Mineralizzazione: degradazione completa di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di prova, quando viene impiegato un composto radiomarcato, la mineralizzazione rappresenta la degradazione di una molecola, durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato o ridotto in maniera quantitativa, con rilascio della quantità appropriata di $^{14}CO_2$ o $^{14}CH_4$, a seconda dei casi.

Tempo di dimezzamento: $t_{0,5}$: il tempo occorrente per la trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; essa è indipendente dalla concentrazione iniziale.

DT_{50} (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 50 %.

DT_{75} (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 75 %.

DT_{90} (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per identificare e determinare quantitativamente i prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici vengono utilizzate sostanze di riferimento.

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile utilizzare una sostanza di prova non marcata o marcata con isotopo, ma si preferisce il materiale marcato. Il materiale marcato è essenziale per lo studio delle vie di trasformazione e per determinare il bilancio di massa. È consigliata la marcatura con ^{14}C, ma possono anche rivelarsi utili altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. La marcatura va posizionata nei limiti del possibile nella parte o nelle parti più stabili della molecola ([1]). La purezza chimica e/o radiochimica della sostanza di prova deve essere almeno pari al 95 %.

Prima di eseguire la prova devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua (Metodo A.6);

b) solubilità in solventi organici;

c) pressione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;

([1]) Se, per esempio, la sostanza contiene un anello, la marcatura va effettuata su questo anello; se la sostanza di prova contiene due o più anelli, potrebbero rilevarsi necessari più studi per determinare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

▼B

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8);

e) coefficiente di adsorbimento (K_d, K_f o K_{oc}, a seconda dei casi) (Metodo C.18);

f) idrolisi (Metodo C.7);

g) costante di dissociazione (pK_a) [linee guida OCSE 112] (13);

h) struttura chimica della sostanza di prova ed eventuale posizione della marcatura isotopica.

Nota. Va indicata la temperatura alla quale vengono effettuate queste misurazioni.

Altre informazioni utili possono comprendere i dati sulla tossicità della sostanza di prova nei confronti di microrganismi, i dati sulla biodegradabilità rapida e/o intrinseca, e i dati sulla trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo.

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi i metodi di estrazione e depurazione) per l'identificazione e la determinazione quantitativa della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento (vedi sezione 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Il metodo descritto in questo test utilizza un sistema sedimentoso acquatico aerobico e uno anaerobico (vedi allegato 1) che consente:

i) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova in un sistema acqua-sedimento;

ii) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova nel sedimento,

iii) la misurazione della velocità di mineralizzazione della sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione (quando viene usata una sostanza di prova marcata con ^{14}C),

iv) l'identificazione e la determinazione quantitativa dei prodotti di trasformazione della fase acquosa e di quella sedimentosa, compreso il bilancio di massa (quando viene usata una sostanza di prova marcata),

v) la misurazione della distribuzione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione tra le due fasi durante il periodo di incubazione al buio (per evitare ad esempio la fioritura delle alghe) a temperatura costante. I tempi di dimezzamento e i valori di DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} vengono determinati quando i dati lo dovessero consigliare, ma non vanno estrapolati di molto oltre l'intervallo sperimentale (vedi sezione 1.2).

Per ciascuno degli studi aerobico e anaerobico occorrono almeno due sedimenti con le rispettive acque (7). In determinati casi occorre però utilizzare più di due sedimenti acquatici, ad esempio nel caso di una sostanza chimica che può essere presente in ambienti di acqua dolce e/o in ambienti marini.

▼B

1.6 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è generalmente applicabile alle sostanze chimiche (marcate o non marcate) per le quali è noto un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. Esso è applicabile a composti leggermente volatili, non volatili, idrosolubili o scarsamente idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche che presentano elevata volatilità in acqua (ad esempio fumiganti, solventi organici), che non possono pertanto essere tenute in acqua e/o nel sedimento nelle condizioni sperimentali del presente test.

Il metodo è stato applicato finora per studiare la trasformazione di sostanze chimiche in acque dolci e sedimenti, ma in linea di principio può anche essere applicato a sistemi estuariali o marini. Esso non è invece idoneo alla simulazione delle condizioni di acqua corrente (ad esempio nei fiumi) o di mare aperto.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di acqua e sedimento, perlomeno in duplicato, subito dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per gli stadi successivi degli esperimenti sono basate sui rispettivi bilanci di massa (quando viene usato materiale marcato) e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (6) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate.

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del metodo analitico (esclusa l'efficienza dell'estrazione iniziale) utilizzato per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata mediante un'analisi in duplicato dello stesso estratto dei campioni di acqua o sedimento, incubati sufficientemente a lungo per consentire la formazione di prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo analitico per la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione deve essere pari ad almeno 0,01 mg· kg^{-1} in acqua o sedimento (come sostanza di prova) o all'1 % della quantità iniziale applicata a un sistema di prova, se minore del precedente. Va anche specificato il limite di quantificazione.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati sull'accuratezza della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica del pseudo primo ordine) o i valori di DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90}.

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1 **Sistema di prova e attrezzatura**

Lo studio va eseguito in contenitori di vetro (ad esempio bottiglie, provette da centrifuga) salvo quando dati preliminari (quali il coefficiente di ripartizione n-ottanolo-acqua, i dati di assorbimento/-adsorbimento, ecc.) indicano che la sostanza di prova può aderire al vetro, nel qual caso potrebbe essere necessario prendere in considerazione un materiale alternativo (ad esempio teflon). Se è noto che la sostanza di prova aderisce al vetro, può essere possibile ovviare al problema mediante uno o più dei metodi seguenti:

▼B

— determinazione della massa della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione assorbiti sul vetro;

— lavaggio con solvente di tutta la vetreria al termine della prova;

— impiego di prodotti formulati (vedi anche sezione 1.9.2);

— uso di una quantità maggiore di cosolvente per l'aggiunta della sostanza di prova al sistema; l'eventuale cosolvente impiegato deve essere tale da non sottoporre a solvolisi la sostanza di prova.

Gli allegati 2 e 3 riportano esempi di attrezzature di prova tipiche, ossia, rispettivamente, a flusso continuo e con sistema a biometro (14). Altri sistemi ad incubazione utili sono descritti nel riferimento bibliografico 15. L'attrezzatura sperimentale deve essere progettata in modo tale da consentire lo scambio di aria o azoto e la cattura dei prodotti volatili. Le sue dimensioni devono essere tali da soddisfare i requisiti del test (vedi sezione 1.9.1). La ventilazione può essere garantita mediante un leggero gorgogliamento o mediante il passaggio di aria o azoto sopra la superficie dell'acqua. In quest'ultimo caso può essere consigliabile agitare leggermente l'acqua dall'alto, per migliorare la distribuzione dell'ossigeno o dell'azoto nell'acqua. Non va impiegata aria priva di CO_2 che potrebbe portare all'aumento del pH dell'acqua. In entrambi i casi è bene evitare se possibile di disturbare il sedimento. Le prove su sostanze chimiche leggermente volatili vanno effettuate in un sistema a biometro con leggera agitazione della superficie dell'acqua. Si possono anche usare recipienti chiusi con uno spazio di testa di aria atmosferica o azoto e fiale interne per la cattura dei prodotti volatili (16). Nella prova aerobica il gas contenuto nello spazio di testa va scambiato ad intervalli regolari per compensare il consumo di ossigeno ad opera della biomassa.

Come trappole idonee per la cattura di prodotti di trasformazione volatili si possono impiegare, senza però alcuna limitazione, soluzioni da 1 mol·dm^{-3} di idrossido di potassio o idrossido di sodio per l'anidride carbonica ([1]), e glicole etilenico, etanolammina o paraffina al 2 % in xilene per i composti organici. Le sostanze volatili formate in condizioni anaerobiche, quali metano, possono essere raccolte per esempio mediante setacci molecolari. Tali sostanze possono ad esempio essere bruciate per produrre CO_2 facendo passare il gas attraverso un tubo in quarzo riempito con CuO alla temperatura di 900 °C e catturando la CO_2 formata in un assorbitore contenente un alcale (17).

È necessaria una strumentazione da laboratorio per l'analisi chimica della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione [ad esempio cromatografia gas liquido (GLC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), spettroscopia di massa (MS), gas cromatografia-spettroscopia di massa (GC-MS), cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS), risonanza magnetica nucleare (NMR), ecc.], ivi compresi i sistemi di rilevamento per le sostanze chimiche radiomarcate o non marcate, a seconda dei casi. Quando si usa materiale radiomarcato occorrono inoltre un contatore a scintillazione a liquido e un ossidatore a combustione (per la combustione dei campioni di sedimento prima dell'analisi della radioattività).

Servono inoltre altre normali attrezzature da laboratorio per misurazioni fisico-chimiche e biologiche (vedi la tabella 1, sezione 1.8.2.2), vetreria, sostanze chimiche e reagenti, secondo necessità.

([1]) Poiché queste soluzioni di assorbimento alcaline assorbono anche l'anidride carbonica proveniente dall'aria di ventilazione e quella prodotta per respirazione negli esperimenti aerobici, esse vanno cambiate ad intervalli regolari per evitarne la saturazione con conseguente perdita di capacità assorbente.

▼B

1.8.2 **Selezione e numero dei sedimenti acquatici**

I siti di campionamento vanno selezionati in funzione delle finalità del test in ogni situazione sperimentale. Ai fini della selezione dei siti di campionamento occorre prendere in considerazione tutti gli eventuali apporti agricoli, industriali e domestici verificatisi nella zona interessata e nelle acque a monte. Non vanno impiegati sedimenti che sono stati contaminati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nel corso dei precedenti 4 anni.

1.8.2.1 *Selezione del sedimento*

Per gli studi aerobici vengono normalmente usati due sedimenti (7). I due sedimenti selezionati dovrebbero essere diversi in quanto a contenuto di carbonio organico e tessitura. Uno dei sedimenti dovrebbe avere contenuto elevato di carbonio organico (2,5-7,5 %) e tessitura fine, mentre l'altro sedimento dovrebbe avere basso contenuto di carbonio organico (0,5-2,5 %) e tessitura grossa. La differenza tra i contenuti di carbonio organico deve essere normalmente pari almeno al 2 %. Per «tessitura fine» si intende un contenuto di [argilla + limo] ([1]) > 50 %, e per «tessitura grossa» un contenuto di [argilla + limo] < 50 %. Di norma la differenza di contenuto di [argilla + limo] dei due sedimenti deve essere almeno pari al 20 %. Nei casi in cui la sostanza chimica potrebbe anche raggiungere le acque marine è necessario che almeno uno dei sistemi acqua-sedimento abbia origine marina.

Per lo studio strettamente anaerobico vanno prelevati due campioni di sedimento (comprese le rispettive acque) da zone anaerobiche dei corpi d'acqua superficiali (7). Entrambe le fasi sedimentose e acquose vanno maneggiate e trasportate con cura in ambiente privo di ossigeno.

Potrebbero esserci altri fattori importanti nella scelta dei sedimenti, che vanno presi in considerazione caso per caso. L'intervallo di pH dei sedimenti, ad esempio, assumerebbe notevole importanza qualora la trasformazione e/o l'assorbimento della sostanza chimica oggetto della prova dipendessero dal pH. La dipendenza dal pH dell'assorbimento potrebbe riflettersi nel pK_a della sostanza di prova.

1.8.2.2 *Caratterizzazione dei campioni acqua-sedimento*

Nella tabella seguente sono riassunti i parametri principali da misurare e documentare (con riferimento al metodo utilizzato) sia per l'acqua, sia per il sedimento, con indicazione delle fasi del test in cui tali parametri vanno determinati. Per ulteriori informazioni sui metodi per la determinazione di questi parametri si rimanda ai riferimenti bibliografici (18)(19)(20)(21).

Potrebbe inoltre essere necessario misurare e documentare altri parametri, a seconda dei casi [ad esempio, per acqua dolce: particelle, alcalinità, durezza, conduttività, NO_3/PO_4 (rapporto e valori singoli); per i sedimenti: capacità di scambio cationico, capacità di trattenimento dell'acqua, carbonato, azoto e fosforo totali; per sistemi marini: salinità]. Per valutare le condizioni di ossido-riduzione potrebbe inoltre rivelarsi utile l'analisi di nitrato, solfato, ferro biodisponibile ed eventualmente altri accettori elettronici nell'acqua e nei sedimenti, soprattutto in relazione alla trasformazione anaerobica.

([1]) [Argilla + limo] è la frazione inorganica del sedimento con particelle di dimensione < 50 μm.

▼B

Rilevamento dei parametri per la caratterizzazione dei campioni acqua-sedimento (7)(22)(23)

Parametro	Fase del test					
	campionatura sul campo	post-manipolazione	inizio dell'acclimatazione	inizio della prova	durante la prova	termine della prova
Acqua						
Origine/fonte	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Concentrazione di O_2 (*)	x		x	x	x	x
Potenziale Redox (*)			x	x	x	x
Sedimento						
Origine/fonte	x					
Profondità dello strato	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzione della dimensione delle particelle		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa microbica (**)		x		x		x
Potenziale Redox (*)	Osservazione (colore/odore)		x	x	x	x

(*) Studi recenti hanno mostrato che le misurazioni delle concentrazioni dell'ossigeno in acqua e dei potenziali redox non hanno valore meccanicistico né predittivo sulla crescita e lo sviluppo di popolazioni microbiche in acque superficiali (24)(25). La determinazione della domanda biochimica d'ossigeno (BOD, in corrispondenza della campionatura sul campo, dell'inizio e del termine della prova) e delle concentrazioni dei micro/macro nutrienti Ca, Mg e Mn (all'inizio e alla fine della prova) in acqua, nonché la misurazione dell'N totale e del P totale nei sedimenti (in corrispondenza della campionatura sul campo e al termine della prova) possono rivelarsi più adatte per l'interpretazione e la valutazione delle velocità e delle vie di biotrasformazione aerobica.

(**) Metodo della velocità di respirazione microbica (26), metodo di fumigazione (27) o conteggi in piastra (ad esempio batteri, attinomiceti, funghi e colonie totali) per gli studi aerobici; velocità di metanogenesi per gli studi anaerobici.

1.8.3 **Raccolta, manipolazione e conservazione**

1.8.3.1 *Raccolta*

Per la campionatura del sedimento va utilizzata la bozza di linea guida ISO sulla campionatura dei sedimenti depositati sul fondo (8). I campioni di sedimento vanno prelevati dall'intero strato superiore del sedimento, avente spessore di 5-10 cm. Le relative acque vanno raccolte nello stesso sito o ubicazione da cui viene prelevato il sedimento e nello stesso istante. Per gli studi anaerobici il prelievo e il trasporto del sedimento e dell'acqua relativa vanno effettuati in assenza di ossigeno (28) (vedi sezione 1.8.2.1). Alcuni dispositivi di campionatura sono descritti in bibliografia (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Manipolazione*

Il sedimento viene dapprima separato dall'acqua per filtrazione e poi setacciato a umido con un setaccio da 2 mm impiegando un eccesso di acqua locale, che viene poi gettata. Successivamente si mescolano quantità note di sedimenti e acqua nei rapporti desiderati (vedi sezione 1.9.1) utilizzando palloni di incubazione, le quali vengono poi preparate per il periodo di acclimatazione (vedi sezione 1.8.4). Per lo studio anaerobico tutte le operazioni di manipolazione vanno effettuate in assenza di ossigeno (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Conservazione*

Si raccomanda vivamente di utilizzare sedimento e acqua campionati di fresco, ma se vi fossero necessità di conservazione occorre setacciare il sedimento e l'acqua come sopra descritto e conservarli insieme, coperti da uno strato d'acqua di 6-10 cm, al buio, a 4 ± 2 °C[4] per un massimo di 4 settimane (7)(8)(23). I campioni da utilizzare per gli studi aerobici vanno conservati all'aria (ad esempio in contenitori aperti), mentre per gli studi anaerobici occorre eliminare la presenza di ossigeno. I campioni non vanno congelati e il sedimento non va lasciato asciugare durante il trasporto e la conservazione.

1.8.4 **Preparazione dei campioni di sedimento/acqua per il test**

Prima dell'aggiunta della sostanza di prova occorre prevedere un periodo di acclimatazione, ponendo ciascun campione di sedimento/acqua nel recipiente di incubazione che verrà poi utilizzato per il test principale; l'acclimatazione va eseguita esattamente nelle stesse condizioni dell'incubazione di prova (vedi sezione 1.9.1). Il periodo di acclimatazione serve per raggiungere sufficiente stabilità nel sistema, valutata in base al pH, alla concentrazione di ossigeno nell'acqua, al potenziale redox di sedimento e acqua e alla separazione macroscopica delle fasi. Il periodo di acclimatazione è di norma compreso tra una e due settimane e comunque non supera le quattro settimane. I risultati delle determinazioni effettuate durante questo periodo vanno documentati.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST

1.9.1 **Condizioni**

Il test va effettuato nell'attrezzatura di incubazione (vedi sezione 1.8.1) con rapporto volumetrico acqua/sedimento compreso tra 3:1 e 4:1 e strato del sedimento di 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Per ogni recipiente di incubazione si raccomanda una quantità minima di sedimento pari a 50 g (peso secco).

Il test va condotto al buio, a temperatura costante compresa tra 10 e 30 °C. La temperatura ideale è 20 ± 2 °C. In casi particolari può essere necessario eseguire un test anche a temperatura inferiore (ad esempio 10 °C), in funzione dei dati che si vogliono raccogliere. La temperatura d'incubazione va sottoposta a monitoraggio e documentata.

([1]) Alcuni studi recenti hanno dimostrato che la conservazione a 4 °C può comportare una diminuzione del contenuto in carbonio organico del sedimento, che potrebbe forse portare alla diminuzione dell'attività microbica (34).

▼B

1.9.2 **Trattamento e applicazione della sostanza di prova**

Viene utilizzata una sola concentrazione di prova della sostanza chimica ([1]). Per le sostanze fitosanitarie applicate direttamente ai corpi d'acqua, la dose massima riportata sull'etichetta rappresenta il tasso di applicazione massimo calcolato sulla base dell'area superficiale dell'acqua nel recipiente di prova. In tutti gli altri casi la concentrazione da utilizzare va basata su previsioni derivate dalle emissioni ambientali. La concentrazione delle sostanze di prova applicate va studiata con cura al fine di caratterizzare la via di trasformazione, nonché la formazione e la diminuzione dei prodotti di trasformazione. Può essere necessario applicare dosi più elevate (ad esempio 10 volte maggiori) in situazioni in cui le concentrazioni delle sostanze di prova sono vicine ai limiti di rilevamento all'inizio della prova, e/o nei casi in cui alcuni importanti prodotti di trasformazione non potrebbero venire facilmente determinati se presenti in quantità pari al 10 % del tasso di applicazione della sostanza di prova. Se però vengono impiegate concentrazioni di prova più elevate, queste non devono avere significativi effetti avversi sull'attività microbica del sistema acqua-sedimento. Al fine di ottenere una concentrazione costante della sostanza di prova in recipienti di dimensione diversa, va presa in considerazione l'opportunità di modificare la quantità del materiale applicato sulla base della profondità della colonna d'acqua nel recipiente rispetto alla profondità dell'acqua sul campo (presunta pari a 100 cm, ma possono essere usate altre profondità). Un esempio di calcolo è riportato nell'allegato 4.

Nel caso ideale la sostanza di prova va applicata alla fase acquosa del sistema di prova sotto forma di soluzione acquosa. È ammesso, nei casi in cui ciò sia inevitabile, l'uso di piccole quantità di solventi miscibili in acqua (ad es. acetone, etanolo) per l'applicazione e la distribuzione della sostanza di prova, senza tuttavia superare l'1 % v/v ed evitando in ogni caso il rischio di produrre effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova. La soluzione acquosa della sostanza di prova va preparata con cautela; per garantire un'omogeneità completa può rivelarsi utile l'impiego di colonne di generazione e di premiscelazione. Dopo l'aggiunta della soluzione acquosa al sistema di prova si raccomanda di miscelare leggermente la fase acquosa, disturbando il meno possibile il sedimento.

L'uso di prodotti formulati non è consigliato in condizioni normali, perché gli ingredienti della formulazione possono influire sulla distribuzione della sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione tra le fasi acquosa e sedimentosa. Nel caso di sostanze di prova scarsamente idrosolubili l'impiego di materiale formulato può rappresentare però un'alternativa appropriata.

Il numero di recipienti di incubazione dipende dal numero dei tempi di campionatura (vedi sezione 1.9.3). Il numero dei sistemi di prova deve essere sufficiente a consentire il sacrificio di due sistemi per ciascun tempo di campionatura. Se si impiegano unità di controllo per ciascun sistema sedimentoso acquatico, esse non vanno trattate con la sostanza di prova. Le unità di controllo possono essere usate per determinare la biomassa microbica del sedimento e il carbonio organico totale di acqua e sedimento al termine dello studio. Due unità di controllo (cioè un'unità di controllo per ciascun sedimento acquatico) possono essere utilizzate per monitorare i parametri richiesti nel sedimento e nell'acqua durante il periodo di acclimatazione (vedi tabella in sezione 1.8.2.2). Vanno incluse due unità di controllo aggiuntive nel caso in cui la sostanza di prova venga applicata mediante un solvente in modo da poter misurare gli effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova.

([1]) Per sostanze chimiche che raggiungono le acque superficiali per vie d'ingresso diverse, comportanti concentrazioni significativamente diverse, potrebbero rivelarsi utili prove con una seconda concentrazione, a condizione che la concentrazione inferiore possa essere analizzata con accuratezza sufficiente.

▼B

1.9.3 **Durata del test e campionatura**

La durata dell'esperimento non deve normalmente eccedere 100 giorni (6) e dovrebbe continuare fino alla determinazione delle vie di degradazione e delle caratteristiche di distribuzione acqua/-sedimento, oppure fino alla dissipazione del 90 % della sostanza di prova a seguito di trasformazione e/o volatilizzazione. I tempi di campionatura devono essere almeno sei (tempo zero compreso), ricorrendo opzionalmente ad uno studio preliminare (vedi sezione 1.9.4) per determinare un regime di campionatura appropriato e la durata del test, salvo quando esistano dati sufficienti sulla sostanza di prova ottenuti da studi precedenti. Per sostanze di prova idrofobiche potrebbero rivelarsi necessari punti di campionatura aggiuntivi durante il periodo iniziale dello studio, allo scopo di determinare la velocità di distribuzione tra le fasi acquosa e sedimentosa.

In corrispondenza dei tempi di campionatura accuratamente selezionati si rimuovono i recipienti di incubazione interi (in duplicato) da sottoporre all'analisi. Il sedimento e l'acqua soprastante vengono analizzati separatamente ([1]). L'acqua superficiale va rimossa con attenzione, disturbando il meno possibile il sedimento. L'estrazione e la caratterizzazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione devono rispettare le procedure analitiche del caso. Va rimosso con attenzione l'eventuale materiale adsorbito nei recipienti di incubazione o nei tubi di interconnessione utilizzati per catturare le sostanze volatili.

1.9.4 **Prova preliminare opzionale**

Se la durata e il regime di campionatura non possono essere stimati sulla base di altri studi effettuati sulla sostanza di prova, può essere utile svolgere una prova preliminare opzionale, che va in tal caso effettuata alle stesse condizioni di prova proposte per lo studio definitivo. Le condizioni sperimentali e i risultati dell'eventuale prova preliminare vanno documentati brevemente.

1.9.5 **Misurazioni e analisi**

È necessario misurare e riportare la concentrazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento in corrispondenza di ciascun tempo di campionatura (espressa come concentrazione e come percentuale della sostanza applicata). In via generale, per ciascun tempo di campionatura vanno identificati i prodotti di trasformazione rilevati a $\geq$ 10 % della radioattività applicata al sistema totale acqua-sedimento, a meno che vi siano motivi ragionevoli che consiglino altrimenti. Va inoltre presa in considerazione l'opportunità di identificare i prodotti di trasformazione le cui concentrazioni aumentano in modo continuativo durante lo studio, pur non eccedendo i limiti sopra riportati, poiché tale aumento può essere indicativo di persistenza. Questi aspetti vanno affrontati caso per caso, motivando nella relazione le soluzioni adottate.

I risultati ottenuti dai sistemi per la cattura di gas e sostanze volatili (CO_2 e altri, cioè sostanze organiche volatili) vanno riportati per ciascun tempo di campionatura. Le velocità di mineralizzazione vanno anch'esse riportate. I residui non estraibili (legati) nel sedimento vanno riportati per ciascun punto di campionatura.

([1]) In casi in cui può verificarsi facilmente una rapida riossidazione dei prodotti di trasformazione anaerobici occorre mantenere le condizioni anaerobiche durante tutta la campionatura e l'analisi.

▼B

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Per ciascun tempo di campionatura si calcolano il bilancio di massa totale o il recupero (vedi sezione 1.7.1) della radioattività aggiunta. I risultati vanno espressi come percentuale della radioattività aggiunta. La distribuzione della radioattività tra acqua e sedimento va espressa come concentrazione e in percentuale, per ciascun tempo di campionatura.

Il tempo di dimezzamento, il DT_{50} ed eventualmente il DT_{75} e il DT_{90} della sostanza di prova vanno calcolati con i rispettivi intervalli di confidenza (vedi sezione 1.7.3). I dati sulla velocità di dissipazione della sostanza di prova nell'acqua e nel sedimento possono essere ricavati mediante opportuni strumenti di valutazione. Essi possono comprendere l'applicazione di cinetiche dello pseudo primo ordine, tecniche empiriche di interpolazione con curve che applicano soluzioni grafiche o numeriche, e valutazioni più complesse, tra cui modelli a compartimento singolo o multiplo. Per maggiori dettagli si rimanda alle rispettive pubblicazioni (35)(36)(37).

Tutte le tecniche hanno punti forti e punti deboli e possono variare notevolmente in quanto a complessità. L'ipotesi di una cinetica del primo ordine può semplificare eccessivamente i processi di degradazione e distribuzione, ma in determinati casi essa consente di disporre di un valore (la costante di velocità o il tempo di dimezzamento) che può essere compreso facilmente ed è utile nei modelli di simulazione e nei calcoli di previsione delle concentrazioni ambientali. Le soluzioni empiriche o le trasformazioni lineari possono fornire interpolazioni più aderenti e consentire pertanto una stima migliore dei tempi di dimezzamento, del DT_{50} ed eventualmente dei DT_{75} e DT_{90}. L'uso delle costanti così derivate è però limitato. I modelli a compartimento possono dare luogo a diverse costanti utili ai fini della valutazione dei rischi, per descrivere la velocità di degradazione in compartimenti diversi e la distribuzione delle sostanze chimiche. Essi vanno inoltre utilizzati per stimare le costanti di velocità per la formazione e la degradazione dei prodotti di trasformazione principali. In tutti i casi il metodo prescelto va motivato e lo sperimentatore deve dimostrare graficamente e/o statisticamente la bontà dell'interpolazione.

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (indicante la posizione della marcatura o delle marcature quando si utilizzano materiali radiomarcati) e proprietà fisicochimiche rilevanti;

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività molare (nei casi opportuni).

▼B

Sostanze di riferimento:

— nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento utilizzate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Sedimenti e acque di prova:

— ubicazione e descrizione dei siti di campionatura dei sedimenti acquatici, precisando se possibile i casi di contaminazione che si sono verificati;

— tutte le informazioni riguardanti il prelievo, l'eventuale conservazione e l'acclimatazione dei sistemi acqua-sedimento;

— caratteristiche dei campioni acqua-sedimento come riportato nella tabella in sezione 1.8.2.2.

Condizioni del test:

— sistema di prova utilizzato (ad esempio flusso, biometro, modalità di ventilazione, metodo di agitazione, volume d'acqua, massa del sedimento, spessore degli strati acquoso e sedimentoso, dimensione dei recipienti di prova, ecc.);

— applicazione della sostanza di prova al sistema di prova: concentrazione di prova utilizzata, numero dei replicati e dei controlli, modalità di applicazione della sostanza di prova (ad esempio eventuale uso di solvente), ecc.;

— temperatura di incubazione;

— tempi di campionatura;

— metodi di estrazione e relative efficienze, oltre ai metodi analitici e ai limiti di rivelabilità;

— metodi di caratterizzazione/identificazione dei prodotti di trasformazione;

— deviazioni dai protocolli di prova o dalle condizioni di prova durante lo studio.

Risultati:

— dati grezzi delle analisi rappresentative (tutti i dati grezzi vanno conservati nell'archivio GLP);

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici utilizzati;

— tassi di recupero (i valori percentuali per la validità dello studio sono riportati nella sezione 1.7.1);

— tabelle dei risultati, espressi come percentuale della dose applicata e in $mg \cdot kg^{-1}$ in acqua, sedimento e sistema totale (percentuale soltanto) per la sostanza di prova e, se appropriato, per i prodotti di trasformazione e la radioattività non estraibile;

— bilancio di massa durante gli studi e al termine degli studi;

— rappresentazione grafica della trasformazione nelle frazioni acquosa e sedimentosa e nel sistema totale (mineralizzazione compresa);

— velocità di mineralizzazione;

▼B

— tempo di dimezzamento, DT_{50} ed eventualmente DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, se del caso, per i principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza in acqua, nel sedimento e nel sistema totale;

— valutazione delle cinetiche di trasformazione della sostanza di prova e, se del caso, dei principali prodotti di trasformazione;

— via di trasformazione proposta, se del caso;

— discussione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

ALLEGATO 1

LINEE GUIDA SUI SISTEMI DI PROVA AEROBICI E ANAEROBICI

Sistema di prova aerobico

Il sistema di prova aerobico descritto in questo metodo di prova consiste di uno strato di acqua aerobico (concentrazioni di ossigeno tipiche comprese tra 7 e 10 $mg \cdot l^{-1}$) e uno strato sedimentoso aerobico in superficie e anaerobico sotto la superficie [potenziali redox (E_h) medi tipici nella zona anaerobica del sedimento compresi tra - 80 e - 190 mV]. Dell'aria inumidita viene fatta passare sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere una quantità sufficiente di ossigeno nello spazio di testa.

Sistema di prova anaerobico

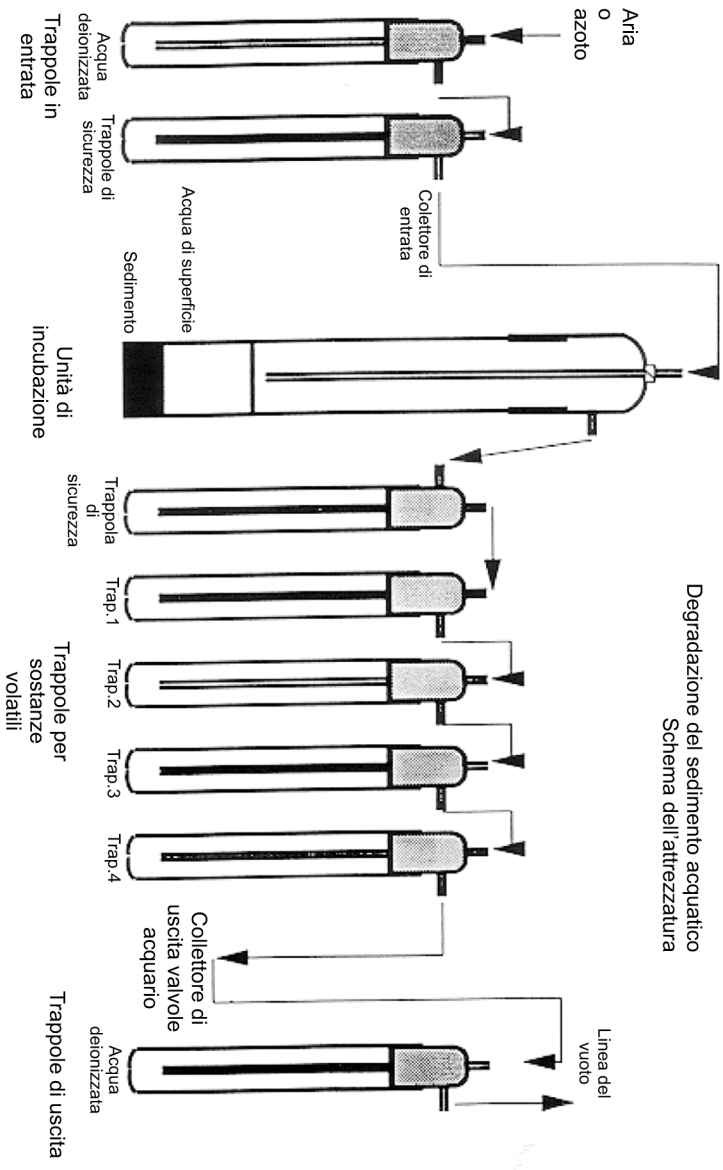
Per il sistema di prova anaerobico la procedura di prova è sostanzialmente uguale a quella delineata per il sistema aerobico, con la differenza che viene fatto passare dell'azoto inumidito sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere uno spazio di testa di azoto. Il sedimento e l'acqua vengono considerati anaerobici se il potenziale redox (E_h) è minore di - 100 mV.

Nella prova anaerobica la valutazione della mineralizzazione comprende la misurazione dell'anidride carbonica e del metano prodotti.

▼B

ALLEGATO 2

ESEMPIO DI UN ATTREZZATURA A FLUSSO CONTINUO

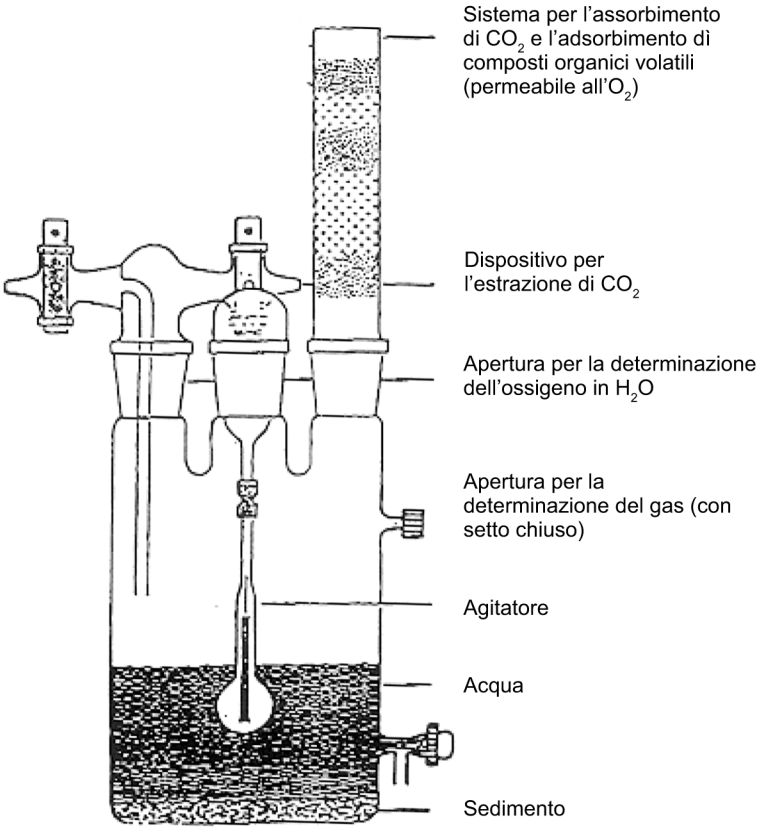


Trappola di sicurezza vuota
Trappola 1:
Etilenglicole per catturare sostanze organiche volatili
Trappola 2:
Acido solforico 0,1 M per catturare sostanze volatili alcaline
Trappole 3 e 4:
Sodio idrossido 2M per catturare CO_2 e altre sostanze volatili acide

▼B

ALLEGATO 3

ESEMPIO DI UN'ATTREZZATURA A BIOMETRO



▼B

ALLEGATO 4

ESEMPIO DI CALCOLO PER LA DOSE DI APPLICAZIONE NEI RECIPIENTI DI PROVA

Diametro interno del cilindro:	= 8 cm
Profondità della colonna d'acqua, sedimento escluso:	= 12 cm
Area di superficie: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Tasso di applicazione: 500 g di sostanza di prova/ha corrispondente a 5 $\mu g/cm^2$	
Totale µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Regolazione della quantità in relazione ad una profondità di 100 cm:	
$12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volume della colonna d'acqua: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentrazione in acqua: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml oppure 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZZAZIONE AEROBICA DELLE ACQUE DI SUPERFICIE — SAGGIO DI SIMULAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE

1. METODO

Questo metodo è equivalente al metodo dell'OCSE TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZIONE

Questo saggio serve a misurare i tempi di biodegradazione di una sostanza di prova a bassa concentrazione in acque naturali aerobiche e a quantificare i risultati sotto forma di espressioni delle velocità cinetiche. Questo saggio di simulazione è realizzato in discontinuo (batch) in flaconi collocati in un agitatore per determinare la biodegradazione aerobica di sostanze organiche in campioni di acque di superficie naturali (dolci, salmastre o marine). È basato sulla norma ISO/DIS 14592-1 (2) e comprende anche elementi dei metodi di prova C.23 e C.24 (3)(4). In via facoltativa, con tempi di prova prolungati, un procedimento semi-continuo può sostituire il procedimento in discontinuo per evitare di deteriorare il microcosmo di prova. L'obiettivo principale del saggio di simulazione è la possibilità di determinare la mineralizzazione della sostanza di prova nelle acque di superficie, che rappresenta la base per esprimere la cinetica della degradazione. Un obiettivo secondario e facoltativo del saggio è quello di ottenere informazioni sulla degradazione primaria e sulla formazione dei principali prodotti di trasformazione (metaboliti). L'identificazione dei prodotti di trasformazione e l'eventuale quantificazione delle rispettive concentrazioni sono dati particolarmente importanti per le sostanze che vengono mineralizzate molto lentamente (per esempio che presentano tempi di dimezzamento per il ^{14}C totale residuo superiori a 60 giorni). Per l'individuazione e la quantificazione dei principali metaboliti in genere si dovrebbero utilizzare concentrazioni più elevate della sostanza di prova (per esempio, > 100 μg/l) a causa dei limiti analitici.

Nell'ambito di questo saggio per «bassa concentrazione» s'intende una concentrazione abbastanza bassa (per esempio inferiore a 1 μg/l e fino a 100 μg/l) da garantire che la cinetica di biodegradazione ottenuta durante il saggio rispecchi quelle che si possono attendere nell'ambiente naturale. Rispetto alla massa totale dei substrati di carbonio biodegradabili presenti nelle acque naturali utilizzate per il saggio, la sostanza di prova a bassa concentrazione fungerà da substrato secondario. Ciò implica che la cinetica di biodegradazione prevista è del 1º ordine (cinetica di «non crescita») e che la sostanza di prova può essere degradata per «co-metabolismo». Nella cinetica del 1º ordine la velocità di degradazione (mg/L/giorno) è proporzionale alla concentrazione di substrato che diminuisce nel tempo. Nel caso di una vera cinetica del 1º ordine la costante di velocità di degradazione specifica, k, è indipendente dal tempo e dalla concentrazione. In altri termini, la costante k non varia molto nel corso di un esperimento e non varia con le concentrazioni aggiunte tra un esperimento e l'altro. Per definizione la costante di velocità di degradazione specifica è uguale al cambiamento relativo di concentrazione per il tempo: $k = (1/C)\cdot(dC/dt)$. Anche se in genere, nelle condizioni descritte, è verosimile attendersi una cinetica del 1º ordine, in alcuni casi altre cinetiche possono rivelarsi più adatte. Deviazioni rispetto alla cinetica del 1º ordine possono, per esempio, essere osservate se fenomeni di trasferimento di massa come la velocità di diffusione piuttosto che la velocità di reazione biologica sono un fattore limitante della velocità di biotrasformazione. Tuttavia, è quasi sempre possibile descrivere i dati con una cinetica di psuedo-1º ordine, accettando una costante di velocità dipendente dalla concentrazione.

▼M1

Le informazioni sulla biodegradabilità della sostanza di prova a concentrazioni più elevate (desunte, per esempio, da saggi di screening standard) e le informazioni sulla degradabilità abiotica, sui metaboliti e sulle rispettive proprietà fisico-chimiche devono essere disponibili prima dell'inizio del saggio per poterlo pianificare e interpretarne i risultati. L'uso di sostanze di prova marcate con ^{14}C e la determinazione della distribuzione di fase del ^{14}C al termine del saggio permettono di determinare la biodegradabilità completa. Se si utilizzano sostanze non marcate, la biodegradazione completa si può stimare solo se il saggio è eseguito a concentrazione più elevata e se sono noti tutti i principali metaboliti.

1.2. DEFINIZIONI

Biodegradazione primaria: modifica strutturale (trasformazione) di una sostanza chimica da parte di microrganismi risultante nella perdita dell'identità chimica.

Biodegradazione funzionale: modifica strutturale (trasformazione) di una sostanza chimica da parte di microrganismi risultante nella perdita di una proprietà specifica.

Biodegradazione aerobica completa: scomposizione di una sostanza chimica da parte di microrganismi in presenza di ossigeno e formazione di biossido di carbonio, acqua e sali minerali di qualsiasi altro elemento presente (mineralizzazione) e produzione di nuova biomassa e prodotti organici per biosintesi microbica.

Mineralizzazione: scomposizione di una sostanza chimica o di materia organica da parte di microrganismi in presenza di ossigeno e formazione di biossido di carbonio, acqua e sali minerali di qualsiasi altro elemento presente.

Fase di latenza: tempo intercorso dall'inizio del saggio fino all'adattamento dei microrganismi di degradazione e all'aumento del livello di degradazione di una sostanza chimica o materia organica fino al limite rilevabile (per esempio 10 % o meno della biodegradazione teorica massima, in funzione dell'accuratezza della tecnica di misura).

Livello massimo di biodegradazione: livello di biodegradazione di una sostanza chimica o di materia organica nel corso del saggio, espresso in percentuale, al di sopra del quale non c'è ulteriore biodegradazione durante il saggio.

Substrato primario: collezione di fonti naturali di carbonio e di energia che garantiscono la crescita e il mantenimento della biomassa microbica.

Substrato secondario: componente del substrato presente in una concentrazione talmente bassa che, con la biodegradazione, fornisce solo quantitativi insignificanti di carbonio ed energia ai microrganismi competenti, rispetto al carbonio e all'energia forniti dalla degradazione dei componenti del substrato principale (substrati primari).

Costante di velocità di degradazione: costante di velocità cinetica del 1º ordine o pseudo-1º ordine, k (giorni^{-1}), che indica la velocità dei processi di degradazione. Per un esperimento in discontinuo la costante k è stimata a partire dalla parte iniziale della curva di degradazione ottenuta dopo la fase di latenza.

▼M1

Tempo di emivita, $t_{1/2}$ (giorni): termine usato per indicare la velocità di una reazione di 1º ordine. Corrisponde all'intervallo di tempo necessario perché la concentrazione diminuisca del 50 %. La relazione tra il tempo di emivita e la costante di velocità di degradazione è rappresentata dalla seguente equazione $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Tempo di dimezzamento di degradazione, DT_{50} (giorni): espressione utilizzata per quantificare l'esito dei saggi di biodegradazione. Corrisponde all'intervallo di tempo, compresa la fase di latenza, necessario per raggiungere il 50 % della biodegradazione.

Limite di rilevabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ): il limite di rilevabilità (LOD) è la concentrazione di una sostanza al di sotto della quale non è possibile distinguerla dagli artefatti della tecnica di analisi utilizzata. Il limite di quantificazione (LOQ) è la concentrazione di una sostanza al di sotto della quale non è possibile determinare la concentrazione con un'accuratezza accettabile.

Carbonio organico disciolto (DOC): frazione del carbonio organico contenuto in un campione d'acqua che non può essere eliminato con una separazione di fase, per esempio per centrifugazione a 40 000 ms^{-2} per 15 minuti o con membrana filtrante con pori di 0,2 μm-0,45 μm di diametro.

Attività totale del ^{14}C organico (TOA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico.

Attività del ^{14}C organico disciolto (DOA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico disciolto.

Attività del ^{14}C organico particellato (POA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico particellato.

1.3. APPLICABILITÀ DEL SAGGIO

Il saggio di simulazione è applicabile a sostanze organiche non volatili o leggermente volatili testate a basse concentrazioni. Se si utilizzano flaconi non ermetici (per esempio chiusi con tappi in cotone idrofilo), le sostanze che presentano costanti di Henry inferiori a circa 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (circa 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) nella pratica possono essere considerate non volatili. Se si utilizzano flaconi chiusi con uno spazio libero nella parte superiore, è possibile sottoporre al saggio sostanze leggermente volatili (con costanti di Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ o < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) senza perdite dal sistema di saggio. Vi può essere perdita di sostanze marcate con ^{14}C in assenza di precauzioni adeguate, quando avviene lo strippaggio del CO_2. In tal caso può essere necessario intrappolare il CO_2 in un assorbente alcalino interno oppure utilizzare un sistema esterno di assorbimento del CO_2 (per la determinazione diretta del $^{14}CO_2$ cfr. appendice 3). Per determinare la cinetica di biodegradazione, le concentrazioni della sostanza di prova devono essere inferiori alla solubilità della sostanza in acqua. Occorre tuttavia rilevare che i valori della solubilità in acqua indicati in letteratura possono essere molto più elevati della solubilità della sostanza di prova nelle acque naturali. In via facoltativa, è possibile stabilire la solubilità di sostanze di prova scarsamente solubili in acqua utilizzando le acque naturali oggetto del saggio.

Questo metodo può essere utilizzato per simulare la biodegradazione in acque di superficie che non presentano grosse particelle (saggio pelagico) oppure in acque di superficie torbide che si possono, per esempio, trovare nei pressi di un'interfaccia acque/sedimenti (saggio con sedimento in sospensione).

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio viene eseguito in discontinuo (batch) incubando la sostanza di prova unicamente con acqua superficiale (saggio pelagico) oppure con acqua superficiale addizionata con solidi/sedimento in sospensione di peso a secco compreso tra 0,01 e 1 g/l (saggio con sedimento in sospensione) per simulare un corpo idrico con solidi in sospensione o sedimenti in risospensione. In genere, nella maggior parte delle acque superficiali la concentrazione dei solidi/sedimenti sospesi si colloca nella fascia bassa di questo intervallo. I flaconi utilizzati per il saggio sono incubati al buio a temperatura ambiente in condizioni aerobiche e agitati. Per determinare la cinetica di degradazione è necessario utilizzare almeno due concentrazioni diverse della sostanza di prova. Le concentrazioni devono differenziarsi tra loro di un fattore compreso tra 5 e 10 e devono rappresentare l'intervallo di concentrazioni che si possono attendere nell'ambiente naturale. La concentrazione massima della sostanza di prova non deve superare 100 μg/l, ma è preferibile utilizzare concentrazioni massime inferiori a 10 μg/l per garantire che la biodegradazione presenti una cinetica del 1º ordine. La concentrazione più bassa non deve superare 10 μg/l, ma è preferibile utilizzare concentrazioni pari a 1-2 μg/l o inferiori a 1 μg/l. In genere è possibile procedere ad un'analisi adeguata di tali basse concentrazioni con l'utilizzo della sostanze marcate con ^{14}C reperibili in commercio. A causa dei limiti analitici, spesso risulta impossibile misurare la concentrazione della sostanza di prova con la dovuta accuratezza se la sostanza presenta una concentrazione ≤ 100 μg/l (cfr. punto 1.7.2, secondo paragrafo). È possibile utilizzare concentrazioni più elevate della sostanza di prova (> 100 μg/l e a volte > 1 mg/l) per identificare e quantificare i principali metaboliti o se non è disponibile un metodo di analisi specifico con un limite di rilevabilità basso. Se vengono testate concentrazioni elevate della sostanza, può non essere possibile utilizzare i risultati per stimare la costante di degradazione del 1º ordine e l'emivita, perché è probabile che la degradazione non segua una cinetica del 1º ordine.

Il processo di degradazione deve essere verificato a intervalli di tempo adeguati, misurando il ^{14}C residuo o la concentrazione residua della sostanza di prova se si utilizza un'analisi chimica specifica. La marcatura della parte più stabile della molecola con ^{14}C consente di determinare la mineralizzazione totale, mentre la marcatura con ^{14}C della parte meno stabile della molecola e l'impiego di analisi specifiche permettono di valutare solo la biodegradazione primaria. La parte più stabile non include, però, necessariamente la frazione rilevante sotto il profilo funzionale della molecola (che può essere correlata ad una proprietà specifica come la tossicità, il bioaccumulo ecc.). In tal caso può essere opportuno utilizzare una sostanza di prova, marcata con ^{14}C, nella parte funzionale per verificare l'eliminazione della proprietà specifica.

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per questo saggio è possibile utilizzare sostanze radiomarcate e non. La tecnica di marcatura che utilizza il ^{14}C è quella raccomandata e in genere la marcatura deve avvenire nella o nelle parti più stabili della molecola (cfr. anche il punto 1.4). Per le sostanze che contengono più di un anello aromatico, è preferibile marcare con il ^{14}C uno o più atomi di carbonio in ciascun anello. È inoltre preferibile marcare con ^{14}C uno o più atomi di carbonio situati su entrambi i lati dei legami facilmente degradabili. La sostanza deve presentare una purezza chimica e/o radiochimica > 95 %. Per le sostanze radiomarcate è preferibile un'attività specifica di circa 50 μCi/mg (1,85 MBq) o superiore per facilitare la misurazione del ^{14}C durante i saggi effettuati a basse concentrazioni iniziali. È necessario disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

▼M1

— solubilità in acqua (Metodo A.6),

— solubilità in solventi organici (sostanze applicate con solvente o a bassa solubilità in acqua),

— costante di dissociazione (pKa) se la sostanza è soggetta a protonazione o deprotonazione (OCSE TG 112) (5),

— pressione di vapore (Metodo A.4) e costante di Henry,

— stabilità chimica nell'acqua e al buio (idrolisi) (Metodo C.7).

Quando sostanze scarsamente solubili in acqua vengono testate in acqua di mare, può essere utile conoscere la costante di Setschenow (o «costante di salting-out») K^s, definita dalla seguente espressione: $\log (S/S') = K^s C_m$, dove S e S' sono la solubilità della sostanza in acque dolci e in acque marine, rispettivamente, e C_m è la concentrazione molare di sale.

Se viene eseguito il «saggio con sedimento in sospensione» è necessario disporre anche dei seguenti dati:

— coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8),

— coefficiente di adsorbimento (Metodo C.18).

Altri dati utili possibili:

— concentrazione ambientale (conosciuta o stimata),

— tossicità della sostanza di prova per i microrganismi (Metodo C.11),

— biodegradabilità pronta e/o intrinseca [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OCSE TG 302 (5)],

— biodegradabilità aerobica o anaerobica negli studi di trasformazione nel suolo e in sedimenti/acqua (Metodi C.23, C.24).

1.6. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Come sostanza di riferimento deve essere utilizzata una sostanza che in genere si degrada facilmente in condizioni aerobiche (per esempio l'anilina o il benzoato di sodio). L'intervallo di tempo atteso per la degradazione dell'anilina e del benzoato di sodio è in genere inferiore a due settimane. Le sostanze di riferimento servono a garantire che l'attività microbica delle acque di prova rientri entro determinati limiti (cioè che l'acqua contenga una popolazione microbica attiva).

▼M1

1.7. CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1. **Recupero**

Subito dopo aver aggiunto la sostanza di prova è necessario verificare ogni concentrazione iniziale di prova misurando l'attività del ^{14}C, oppure procedendo ad analisi chimiche se non vengono utilizzate sostanze marcate, almeno su due campioni uguali. In questo modo si ottengono informazioni sull'applicabilità e sulla ripetibilità del metodo di analisi e sull'omogeneità della distribuzione della sostanza di prova. In genere nelle analisi successive dei dati si utilizza l'attività iniziale del ^{14}C misurata o la concentrazione della sostanza di prova piuttosto che la concentrazione nominale perché in questo modo vengono compensati le perdite dovute all'assorbimento-adsorbimento e gli errori di dosaggio. Per una sostanza di prova marcata con ^{14}C, il livello di recupero al termine dell'esperimento è dato dal bilancio di massa (cfr. ultimo paragrafo del punto 1.8.9.4). Idealmente il bilancio di massa di una sostanza radiomarcata dovrebbe oscillare tra il 90 % e il 110 %, mentre l'accuratezza dell'analisi dovrebbe dare un recupero iniziale compreso tra il 70 % e il 110 % per le sostanze di prova non marcate. Questi intervalli devono intendersi come obiettivi e non devono essere utilizzati come criteri di accettazione del saggio. In via facoltativa, l'accuratezza dell'analisi può essere determinata per una sostanza di prova a una concentrazione più bassa rispetto alla concentrazione iniziale e per i principali metaboliti.

1.7.2. **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del metodo analitico (compresa l'efficienza dell'estrazione iniziale) per quantificare la sostanza di prova ed eventualmente i metaboliti deve essere verificata con cinque analisi replicate dei singoli estratti delle acque superficiali.

Il limite di rilevabilità (LOD) del metodo analitico per la sostanza di prova e i metaboliti deve essere, se possibile, pari ad almeno l'1 % del quantitativo iniziale applicato al sistema di saggio. Il limite di quantificazione (LOQ) deve essere uguale o inferiore al 10 % della concentrazione applicata. Le analisi chimiche di molte sostanze organiche e dei loro metaboliti spesso impongono che la sostanza di prova sia applicata ad una concentrazione relativamente elevata, cioè > 100 µg/l.

1.8. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.8.1. **Apparecchiature**

Il saggio può essere eseguito in flaconi conici o cilindrici di capacità adeguata (per esempio 0,5 o 1 litro) chiusi con tappi di silicone o di gomma, oppure in flaconi di siero con coperchi ermetici al CO_2 (per esempio dotati di tappi in gomma di butile). In alternativa è possibile eseguire il saggio utilizzando flaconi multipli e prelevare flaconi interi (almeno due), per ogni intervallo di campionamento (cfr. ultimo paragrafo del punto 1.8.9.1). Per le sostanze di prova non volatili che non sono state radiomarcate, non sono necessari coperchi o tappi ermetici; bastano invece tappi in cotone che impediscano la contaminazione con aria (cfr. punto 1.8.9.1, secondo paragrafo). Le sostanze leggermente volatili devono essere testate in un sistema tipo biometro con leggera agitazione dell'acqua superficiale. Per evitare qualsiasi tipo di contaminazione batterica, prima dell'uso è possibile sterilizzare i recipienti riscaldandoli o in autoclave. Vengono inoltre impiegate le seguenti apparecchiature di laboratorio standard:

— tavola vibrante o agitatori magnetici per l'agitazione continua dei flaconi di prova,

▼M1

— centrifuga,

— misuratore di pH,

— turbidimetro per misure nefelometriche della torbidità,

— forno o forno a microonde per determinare il peso a secco,

— apparecchio di filtrazione a membrana,

— autoclave o forno per sterilizzare i recipienti in vetro,

— strutture per la manipolazione delle sostanze marcate con ^{14}C,

— apparecchiature per quantificare l'attività del ^{14}C in campioni ricavati da soluzioni che intrappolano il CO_2 e, se necessario, da campioni di sedimento,

— apparecchiatura di analisi per determinare la sostanza di prova (e di riferimento) se viene utilizzata un'analisi chimica specifica (come il gascromatografo o il cromatografo liquido ad alta pressione).

1.8.2. **Soluzioni madre della sostanza di prova**

Per preparare le soluzioni madre delle sostanze di prova e di riferimento si utilizza acqua deionizzata (cfr. punto 1.8.7, primo paragrafo). Nell'acqua deionizzata non devono essere presenti sostanze che possono risultare tossiche per i microrganismi; il carbonio organico disciolto (DOC) non deve essere superiore a 1 mg/l (6).

1.8.3. **Prelievo e trasporto dell'acqua superficiale**

Il sito di campionamento dove prelevare l'acqua superficiale deve essere scelto in funzione dell'obiettivo del saggio in una determinata situazione. Nella scelta dei siti occorre considerare la storia dei possibili apporti di origine agricola, industriale o domestica. Se è risaputo che un ambiente acquatico è stato contaminato dalla sostanza di prova o da analoghi strutturali nei quattro anni precedenti, non deve essere utilizzato per il prelievo dell'acqua di prova, a meno che la finalità esplicita del ricercatore non sia proprio l'esame della velocità di degradazione in siti già esposti. Il pH e la temperatura dell'acqua vanno misurati sul sito di prelievo. Occorre inoltre rilevare la profondità del campionamento e l'aspetto del campione di acqua (per esempio, colore e torbidità) (cfr. punto 3). È necessario misurare la concentrazione di ossigeno e il potenziale di ossido-riduzione nell'acqua e nello strato superficiale del sedimento per verificare le condizioni aerobiche, a meno che non risultino evidenti dall'aspetto e dall'esperienza acquisita con il sito. L'acqua superficiale deve essere trasportata in un contenitore perfettamente pulito. La temperatura durante il trasporto non deve superare di molto la temperatura utilizzata per il saggio; se il trasporto supera le 2-3 ore si consiglia di portare la temperatura a 4 °C. Il campione di acqua non deve tuttavia essere congelato.

▼M1

1.8.4. **Stoccaggio e preparazione dell'acqua di superficie**

Il saggio deve preferibilmente iniziare entro un giorno dal prelievo del campione. Se è necessario stoccare l'acqua, il periodo di stoccaggio deve essere ridotto al minimo e in ogni caso non può superare 4 settimane. Il campione di acqua va mantenuto ad una temperatura di 4 °C con aerazione fino al momento dell'utilizzo. Prima dell'impiego, occorre eliminare le particelle più grosse, per esempio per sedimentazione o per filtrazione con filtro in nylon con maglie di circa 100 μm o con un filtro grossolano in carta.

1.8.5. **Preparazione di acqua addizionata con sedimento (facoltativo)**

Per il saggio con sedimento in sospensione, il sedimento superficiale viene aggiunto nei flaconi contenenti acqua naturale (prefiltrata per eliminare le particelle più grossolane secondo quanto descritto al punto 1.8.4) per ottenere una sospensione. La concentrazione dei solidi sospesi deve essere compresa tra 0,01 e 1 g/l. Il sedimento superficiale deve provenire dallo stesso sito da cui è stato prelevato il campione di acqua. In funzione dell'ambiente acquatico specifico, il sedimento superficiale può essere caratterizzato da un elevato tenore di carbonio organico (2,5-7,5 %) e da una consistenza fine oppure da un basso tenore di carbonio organico (0,5-2,5 %) e da una consistenza più grossa (3). Preparazione del sedimento superficiale: estrarre varie carote di sedimento con un tubo di plastica trasparente, tagliare gli strati aerobici superiori (a partire dalla superficie fino ad una profondità massima di 5 mm) subito dopo il campionamento e riunirli. Il campione di sedimento che ne risulterà deve essere trasportato in un contenitore con un grande spazio libero superiore per mantenerlo in condizioni aerobiche (conservarlo a 4 °C se il trasporto dura più di 2-3 ore). Il campione di sedimento deve essere sospeso nell'acqua di prova con un rapporto di 1:10 e deve essere mantenuto a 4 °C con aerazione fino al momento dell'utilizzo. Se è necessario stoccare il sedimento, il periodo di stoccaggio deve essere ridotto al minimo e in ogni caso non può superare 4 settimane.

1.8.6. **Procedimento semi-continuo (facoltativo)**

Può essere necessario procedere ad un'incubazione prolungata (di vari mesi) se si verifica una fase di latenza lunga prima che si possa misurare una degradazione significativa della sostanza di prova. Se questa condizione è già nota da precedenti saggi eseguiti sulla sostanza, è possibile iniziare il saggio con un procedimento semi-continuo, che permette di rinnovare periodicamente una parte dell'acqua o della sospensione utilizzata nel saggio (cfr. appendice 2). In alternativa, il normale saggio in discontinuo può diventare una prova semi-continua se non viene rilevata alcuna degradazione della sostanza di prova per circa 60 giorni con il procedimento in discontinuo (cfr. punto 1.8.8.3, secondo paragrafo).

1.8.7. **Aggiunta della sostanza di prova (o di riferimento)**

Per le sostanze ad elevata solubilità in acqua (> 1 mg/l) e a bassa volatilità (costanti di Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ o < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), si può preparare una soluzione madre (stock solution) in acqua deionizzata (cfr. punto 1.8.2) e aggiungerne il volume adeguato ai recipienti di prova fino ad ottenere la concentrazione desiderata. Il volume dell'eventuale soluzione madre addizionata deve essere mantenuto al livello minimo raggiungibile (< 10 % del volume liquido finale, se possibile). Un'altra possibilità consiste nel dissolvere la sostanza di prova in una quantità maggiore di acqua di prova: questa alternativa permette di non utilizzare solventi organici.

▼M1

Se non è possibile evitarlo, si devono preparare soluzioni madre di sostanze non volatili e scarsamente solubili in acqua utilizzando un solvente organico volatile; il solvente aggiunto non deve, tuttavia, superare l'1 % v/v e non deve presentare effetti negativi sull'attività microbica. Il solvente non deve incidere sulla stabilità della sostanza di prova nell'acqua. Deve inoltre essere strippato in una quantità estremamente limitata in modo da non incrementare in maniera significativa la concentrazione del DOC dell'acqua o della sospensione utilizzata per il saggio. Questa situazione viene verificata con un'analisi specifica della sostanza o, se possibile, ad un'analisi del DOC (6). È necessario limitare la quantità di solvente trasferita allo stretto necessario e garantire che la quantità di sostanza di prova possa dissolversi nel volume finale di acqua di prova. È possibile utilizzare altre tecniche per introdurre la sostanza di prova nei recipienti di prova, come descritto nei riferimenti 7 e 8. Se viene utilizzato un solvente organico per applicare la sostanza di prova i controlli con solvente contenenti l'acqua di prova (senza aggiunte) e l'acqua di prova con la sostanza di riferimento addizionata devono essere trattati come recipienti di prova attivi addizionati con la sostanza di prova in un vettore solvente. I controlli con solvente servono a verificare eventuali effetti negativi causati dal solvente alla popolazione microbica evidenziati dalla degradazione della sostanza di riferimento.

1.8.8. **Condizioni di prova**

1.8.8.1. *Temperatura di prova*

L'incubazione deve avvenire (preferibilmente) al buio o in presenza di luce diffusa a una temperatura controllata (± 2 °C), che può essere la temperatura sul campo o una temperatura standard di 20-25 °C. Per temperatura sul campo si può intendere o la temperatura effettiva del campione al momento del campionamento o la temperatura media sul campo nel sito di campionamento.

1.8.8.2. *Agitazione*

Per mantenere le particelle e i microrganismi in sospensione è necessario agitarli o mescolarli continuamente. L'agitazione agevola anche il trasferimento dell'ossigeno dallo spazio libero superiore al liquido per mantenere adeguatamente le condizioni aerobiche. Collocare i flaconi su una tavola vibrante (agitazione pari a circa 100 gpm) o utilizzare un agitatore magnetico. L'agitazione deve essere continua ma il più delicata possibile e deve riuscire a mantenere la sospensione omogenea.

1.8.8.3. *Durata del saggio*

In genere il saggio non dovrebbe durare più di 60 giorni, a meno di non utilizzare la procedura semi-continua rinnovando periodicamente la sospensione di prova (cfr. punto 1.8.6 e appendice 2). La durata del saggio in discontinuo può tuttavia essere prolungata fino ad un massimo di 90 giorni se la degradazione della sostanza ha avuto inizio entro i primi 60 giorni. La degradazione è monitorata a intervalli di tempo adeguati, determinando l'attività residua del ^{14}C o il $^{14}CO_2$ formatosi (cfr. punto 1.8.9.4) e/o procedendo ad analisi chimica (punto 1.8.9.5). Il tempo di incubazione deve essere sufficientemente lungo da permettere di valutare il processo di degradazione. La degradazione dovrebbe preferibilmente essere superiore al 50 %; per le sostanze a degradazione lenta l'entità della degradazione deve essere sufficiente (in genere superiore al 20 %) a stimare la costante cinetica di velocità di degradazione.

▼M1

È necessario effettuare misure periodiche del pH e della concentrazione di ossigeno nel sistema di saggio, a meno che esperienze precedenti derivate da saggi analoghi con campioni di acqua e di sedimento prelevati dallo stesso sito non le rendano superflue. In presenza di determinate condizioni, il metabolismo dei substrati primari a concentrazioni molto più elevate nell'acqua o nel sedimento può portare ad una formazione di CO_2 e ad una riduzione di ossigeno tali da modificare sensibilmente le condizioni sperimentali del saggio.

1.8.9. **Procedimento**

1.8.9.1. *Preparazione dei flaconi per il saggio pelagico*

Trasferire un volume adeguato di acqua di prova nei flaconi (massimo un terzo del volume del flacone, ma non meno di 100 ml circa). Se si utilizzano flaconi multipli (per raccogliere flaconi interi ad ogni campionamento) il volume giusto di acqua di prova è ancora pari a circa 100 ml, perché volumi ridotti possono influenzare la durata della fase di latenza. La sostanza di prova addizionata proviene da una soluzione madre (cfr. punti 1.8.2 e 1.8.7.). Per determinare la cinetica di degradazione e calcolare la costante cinetica di velocità di degradazione è necessario utilizzare la sostanza di prova ad almeno due diverse concentrazioni che si differenziano di un fattore compreso tra 5 e 10. Le due concentrazioni prescelte devono essere inferiori a 100 µg/l e comprese, preferibilmente, nell'intervallo < 1-10 µg/l.

Chiudere i flaconi con tappi o coperchi ermetici all'aria e al CO_2. Per le sostanze chimiche di prova non volatili e non marcate con ^{14}C si consiglia di utilizzare tappi di cotone idrofilo per impedire la contaminazione con aria (cfr. punto 1.8.1) purché si sappia con certezza che gli eventuali prodotti di degradazione principali non siano volatili e si proceda alla determinazione indiretta del CO_2 (cfr. appendice 3).

Incubare i flaconi alla temperatura prescelta (cfr. punto 1.8.8.1). Ritirare i campioni per procedere all'analisi chimica o alla misura del ^{14}C all'inizio del saggio (cioè prima che inizi la biodegradazione; cfr. punto 1.7.1) e successivamente ad intervalli di tempo adeguati per tutta la durata del saggio. Il campionamento può avvenire per rimozione di sotto-campioni (per esempio aliquote di 5 ml) da ciascun campione replicato o prelevando i flaconi interi ad ogni campionamento. La mineralizzazione della sostanza di prova può essere determinata direttamente o indirettamente (cfr. appendice 3). Di solito sono necessari almeno cinque punti di campionamento durante la fase di degradazione (cioè al termine della fase di latenza) per stimare una costante di velocità affidabile, a meno che non si riesca a dimostrare che tre punti di campionamento sono sufficienti per le sostanze a degradazione rapida. Per le sostanze a degradazione lenta è facile effettuare più misure durante la fase di degradazione e pertanto si devono utilizzare più punti di dati per stimare la costante k. Non è possibile stabilire tempi fissi per il campionamento vista la variabilità della velocità di biodegradazione; se la degradazione è lenta, si raccomanda tuttavia un campionamento a settimana. Se invece la sostanza di prova è a degradazione rapida, si deve effettuare un campionamento al giorno per i primi tre giorni e successivamente a giorni alterni o ogni due giorni. In alcuni casi, per esempio per le sostanze che idrolizzano molto rapidamente, può essere necessario effettuare campionamenti a intervalli orari. Prima del saggio si raccomanda di procedere a uno studio preliminare per determinare gli intervalli di campionamento adatti. Se servono campioni per effettuare altre analisi specifiche, si consiglia di prelevarne di più e di scegliere quali sottoporre ad analisi al termine dell'esperimento secondo una strategia a ritroso: in altri termini, gli ultimi campioni sono analizzati per primi (per indicazioni sulla stabilità dei campioni in fase di stoccaggio cfr. il punto 1.8.9.5, secondo paragrafo).

▼**M1**

1.8.9.2. *Numero di flaconi e di campioni*

Preparare un numero sufficiente di flaconi in modo da avere a disposizione:

— flaconi per la prova; almeno flaconi replicati per ciascuna concentrazione della sostanza di prova (preferibilmente almeno 3) o flaconi multipli per ogni concentrazione se vengono raccolti flaconi interi a ciascun campionamento (contrassegnati dal simbolo F_T),

— flaconi per il calcolo del bilancio di massa; almeno flaconi replicati per ciascuna concentrazione di prova (contrassegnati dal simbolo F_M),

— controllo in bianco, nessuna sostanza di prova: almeno un flacone in bianco contenente solo l'acqua di prova (contrassegnato dal simbolo F_B),

— controllo di riferimento; flaconi replicati con la sostanza di riferimento (per esempio anilina o benzoato di sodio a 10 µg/l) (contrassegnati dal simbolo F_C). Il controllo di riferimento serve a confermare una minima attività microbica. Se conveniente è possibile utilizzare una sostanza di riferimento radiomarcata, anche nel caso in cui la degradazione della sostanza di prova sia monitorata con analisi chimica,

— controllo sterile; uno o due flaconi contenenti acqua di prova sterilizzata per esaminare l'eventuale degradazione abiotica o un altro tipo di eliminazione non biologica della sostanza di prova (contrassegnati dal simbolo F_S). L'attività biologica può essere interrotta ponendo l'acqua di prova in autoclave (a 121 °C per 20 min) oppure aggiungendo un tossico [per esempio sodio azide (NaN_3) a 10-20 g/l, cloruro di mercurio ($HgCl_2$) a 100 mg/l o formalina a 100 mg/l] o ancora con radiazioni gamma. Se si utilizza $HgCl_2$ deve essere smaltito come rifiuto tossico. Se all'acqua viene aggiunto un ingente quantitativo di sedimento non è semplice ottenere condizioni di sterilità; in tal caso si raccomanda di ripetere l'operazione di sterilizzazione in autoclave (per esempio tre volte). Si consideri che le caratteristiche di assorbimento-adsorbimento del sedimento possono risultare alterate da questa operazione,

— controlli con solvente, contenenti acqua di prova e acqua di prova con sostanza di riferimento; flaconi replicati trattati con la stessa quantità di solvente e seguendo lo stesso procedimento utilizzato per l'applicazione della sostanza di prova. In questo modo s'intende verificare gli eventuali effetti negativi del solvente determinando la degradazione della sostanza di riferimento.

Nel concepire il saggio il ricercatore deve considerare l'importanza relativa di una maggiore replicazione sperimentale rispetto all'aumento del numero dei momenti di campionamento. Il numero esatto di flaconi necessari dipenderà dal metodo utilizzato per misurare la degradazione (cfr. punto 1.8.9.1, terzo paragrafo, punto 1.8.9.4 e appendice 3).

▼M1

Per ciascun momento di campionamento da ciascun flacone devono essere prelevati due sottocampioni (per esempio aliquote di 5 ml). Se vengono impiegati flaconi multipli per prelevare i flaconi interi, almeno due flaconi devono essere sacrificati per ciascun momento di campionamento (cfr. punto 1.8.9.1, primo paragrafo).

1.8.9.3. *Preparazione dei flaconi per il saggio con sedimento in sospensione [facoltativo]*

Aggiungere, se richiesto, i volumi necessari di acqua di prova e sedimento ai recipienti utilizzati nel saggio (cfr. punto 1.8.5). Preparare i flaconi per il saggio con sedimento in sospensione seguendo lo stesso procedimento del saggio pelagico (cfr. punti 1.8.9.1 e 1.8.9.2). Utilizzare preferibilmente bottiglie di siero o flaconi di forma analoga. Collocare i flaconi chiusi su un agitatore in posizione orizzontale. I flaconi aperti per le sostanze non marcate con ^{14}C e non volatili devono essere naturalmente collocati in posizione verticale; in questo caso si consiglia di procedere all'agitazione magnetica utilizzando barre magnetiche rivestite di vetro. Se necessario, aerare le bottiglie per conservare le condizioni aerobiche necessarie.

1.8.9.4. *Determinazione radiochimica*

Il $^{14}CO_2$ che si forma può essere misurato direttamente o indirettamente (cfr. appendice 3). Per via indiretta viene misurato determinando la differenza tra l'attività iniziale del $^{14}CO_2$ nell'acqua di prova o nella sospensione e l'attività residua totale al momento del campionamento misurata dopo l'acidificazione del campione (fino a ottenere un pH 2-3) e lo strippaggio del CO_2. Il carbonio inorganico viene così eliminato e l'attività residua misurata è data dal materiale organico. Non si procede alla determinazione indiretta del $^{14}CO_2$ se durante la trasformazione della sostanza di prova si formano notevoli metaboliti volatili (cfr. appendice 3). Se possibile la formazione di $^{14}CO_2$ deve essere misurata direttamente (appendice 3) al momento di ciascun campionamento in almeno un flacone di prova; con questo procedimento è possibile verificare il bilancio di massa e il processo di biodegradazione, ma solo nei saggi che utilizzano flaconi chiusi.

In caso di misurazione diretta del $^{14}CO_2$ nel corso del saggio, è necessario preparare un maggior numero di flaconi a tal fine all'inizio del saggio stesso. È consigliabile misurare il $^{14}CO_2$ per via diretta se durante la trasformazione della sostanza di prova si formano notevoli metaboliti volatili. In ciascun punto di misurazione i flaconi supplementari vengono acidificati (pH 2-3) e il $^{14}CO_2$ viene raccolto in un assorbitore interno o esterno (cfr. appendice 3).

In via facoltativa è possibile determinare la concentrazione della sostanza di prova marcata con ^{14}C e i principali metaboliti con la tecnica della radiocromatografia (per esempio cromatografia su strato sottile o TLC, la cromatografia RAD-TLC) o della cromatografia HPLC con rivelatore radiochimico.

È inoltre facoltativo determinare la distribuzione di fase della radioattività rimanente (cfr. appendice 1) e la sostanza di prova e i metaboliti residui.

▼M1

Al termine del saggio il bilancio di massa deve essere determinato con la misurazione diretta del $^{14}CO_2$ utilizzando flaconi separati dai quali nel corso del saggio non è stato prelevato alcun campione (cfr. appendice 3).

1.8.9.5. *Analisi chimica specifica*

Se è disponibile un metodo analitico specifico sensibile, è possibile determinare la biodegradazione primaria misurando la concentrazione residua totale della sostanza di prova, senza ricorrere alle tecniche di radiomarcatura. Se viene utilizzata una sostanza di prova radiomarcata (per misurare la mineralizzazione totale), parallelamente è possibile effettuare analisi chimiche specifiche che offrono utili informazioni supplementari e permettono di verificare il procedimento. Le analisi chimiche specifiche possono essere utili anche per misurare i metaboliti che si formano durante la degradazione della sostanza di prova: questo procedimento è consigliabile per le sostanze mineralizzate con tempi di emivita superiori a 60 giorni. È necessario misurare la concentrazione della sostanza di prova e i metaboliti al momento di ciascun campionamento e riferire i dati ottenuti (sotto forma di concentrazione e di percentuale della sostanza applicata). In generale, i metaboliti rilevati in percentuale $\geq$ 10 % della concentrazione applicata al momento del campionamento devono essere identificati, a meno di fondate ragioni per non farlo. Occorre valutare la possibilità di identificare anche i metaboliti le cui concentrazioni aumentano continuamente nel corso dello studio, anche se tali concentrazioni non superano il limite indicato precedentemente, perché questo elemento potrebbe essere indice di persistenza. Occorre valutare la possibilità di procedere all'analisi dei metaboliti in controlli sterili se si ritiene possibile una trasformazione abiotica rapida della sostanza di prova (per esempio nel caso dell'idrolisi). È necessario valutare caso per caso se sia necessario quantificare e identificare i metaboliti, motivando le scelte nella relazione. Le tecniche di estrazione con solvente organico devono essere applicate secondo le indicazioni fornite nel rispettivo procedimento analitico.

Tutti i campioni devono essere stoccati a 2-4 °C e in condizioni ermetiche se l'analisi viene effettuata nel giro di 24 ore (ipotesi da privilegiare). Se lo stoccaggio si prolunga, i campioni devono essere congelati a temperature inferiori a – 18 °C o devono essere conservati chimicamente. Non è consigliabile procedere all'acidificazione per conservare i campioni, perché in quel caso i campioni possono risultare instabili. Se i campioni non sono analizzati entro 24 ore e devono essere stoccati più a lungo, è necessario svolgere uno studio sulla stabilità allo stoccaggio per dimostrare la stabilità delle sostanze chimiche interessate ad una temperatura di stoccaggio inferiore a – 18 °C o in condizioni di conservazione. Se il metodo di analisi prevede l'estrazione con solvente o l'estrazione in fase solida (SPE), l'estrazione deve avvenire immediatamente dopo il campionamento o lo stoccaggio del campione refrigerato per un massimo di 24 ore.

In base alla sensibilità del metodo di analisi potrebbe essere necessario utilizzare campioni di volume superiore a quello indicato al paragrafo 1.8.1. Il saggio può essere svolto facilmente con volumi di prova di un litro in flaconi da 2-3 litri, che permettono di prelevare campioni di circa 100 ml.

▼M1

2. **DATI E RELAZIONI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

2.1.1. **Rappresentazione dei dati**

Arrotondare i tempi di campionamento ad un numero intero di ore (a meno che la sostanza non si degradi in maniera consistente in un periodo variabile tra minuti e ore), ma non ad un numero intero di giorni. Indicare le stime dell'attività residua della sostanza di prova (per le sostanze marcate con ^{14}C) o la concentrazione residua (per le sostanze non marcate), rispetto al tempo in un grafico lineare e in un grafico semi-logaritmico (cfr. figure 1a e 1b). Se è avvenuta la degradazione, comparare i risultati dei flaconi F_T con quelli dei flaconi F_S. Se le medie dei risultati ricavati dai flaconi con la sostanza di prova (F_T) e dai flaconi sterili (F_S) divergono di meno del 10 %, si può ritenere che la degradazione osservata è prevalentemente abiotica. Se la degradazione nei flaconi F_S è inferiore, i risultati possono essere utilizzati per correggere quelli ottenuti con i flaconi F_T (per sottrazione) per stimare l'entità della degradazione. Nel caso in cui vengano effettuate analisi facoltative per i principali metaboliti, oltre al grafico relativo alla scomparsa della sostanza di prova, è necessario fornire i grafici relativi alla formazione e alla scomparsa dei metaboliti.

Stimare la durata della fase di latenza t_L dalla curva di degradazione (grafico semi-logaritmico) estrapolando la parte lineare fino alla degradazione zero o, in alternativa, determinando il tempo necessario per ottenere circa il 10 % della degradazione (cfr. figure 1a e 1b). In base al grafico semi-logaritmico, stimare la costante di velocità del 1º ordine, k, e l'errore standard con la regressione lineare di ln (attività residua del ^{14}C o concentrazione della sostanza di prova) rispetto al tempo. In particolare con le misure del ^{14}C utilizzare solo i dati che appartengono alla parte lineare iniziale della curva dopo la fase di latenza e, di preferenza, selezionare pochi dati rappresentativi piuttosto che una grande quantità di dati più incerti. In questo caso l'incertezza comprende errori inerenti all'uso diretto raccomandato delle attività residue del ^{14}C rilevate (cfr. sotto). A volte può essere utile calcolare due diverse costanti di velocità se la degradazione segue un modello bifasico. A tal fine vengono definite due diverse fasi della curva di degradazione. Effettuare il calcolo della costante k e dell'emivita $t_{½} = \ln 2/k$ per ciascuno dei singoli flaconi replicati quando dallo stesso flacone vengono prelevati sottocampioni, oppure applicando i valori medi quando sono raccolti interi flaconi per ciascun momento di campionamento (cfr. l'ultimo paragrafo del punto 1.8.9.2). Se si utilizza la prima procedura è necessario riportare la costante di velocità e l'emivita per ciascuno dei singoli flaconi replicati e un valore medio con un errore standard. Se sono state utilizzate concentrazioni elevate della sostanza di prova, la curva di degradazione può discostarsi notevolmente da una retta (grafico semi-logaritmico) e la cinetica del 1º ordine può non risultare valida. In tal caso non ha senso definire un'emivita. Tuttavia, per un intervallo di dati limitato, è possibile applicare una cinetica di pseudo-1º ordine e stimare il tempo di dimezzamento DT_{50} (cioè il tempo necessario a raggiungere una degradazione del 50 %). Occorre tuttavia ricordare che, utilizzando il DT_{50}, non è possibile prevedere la durata della degradazione oltre l'intervallo di dati selezionato, perché il DT_{50} non è altro che un descrittore di una determinata serie di dati. Gli strumenti analitici che agevolano il calcolo statistico e l'aggiustamento della curva sono facilmente disponibili e si raccomanda pertanto di utilizzare questo tipo di software.

▼M1

Se si effettuano analisi chimiche specifiche, stimare le costanti di velocità e i tempi di emivita per la degradazione primaria come indicato in precedenza nel caso della mineralizzazione totale. Se la degradazione primaria è il processo limitante, talvolta è possibile utilizzare i punti di dati dell'intera degradazione, perché le misure sono dirette, al contrario di quanto avviene con le misure dell'attività del ^{14}C.

Se si utilizzano sostanze marcate con ^{14}C il bilancio di massa deve essere espresso in percentuale della concentrazione iniziale applicata, almeno alla fine del saggio.

2.1.2. **Attività residua**

Quando la parte marcata con ^{14}C di una sostanza organica è biodegradata, la parte più consistente del ^{14}C è convertita in $^{14}CO_2$, mentre un'altra parte è utilizzata per la crescita di biomassa e/o per la sintesi di metaboliti extra-cellulari. La biodegradazione «completa» di una sostanza non produce pertanto una conversione al 100 % del carbonio in $^{14}CO_2$. Il ^{14}C integrato nei prodotti formatisi per biosintesi è successivamente rilasciato lentamente sotto forma di $^{14}CO_2$ a causa della «mineralizzazione secondaria». Per questi motivi la rappresentazione grafica dell'attività residua del ^{14}C organico (misurata dopo strippaggio del CO_2) o del $^{14}CO_2$ prodotto rispetto al tempo indicherà un fenomeno di «coda» (tailing) dopo che la biodegradazione sarà ultimata. Questa situazione rende più complessa l'interpretazione cinetica dei dati e, a tal fine, in genere per stimare la costante di velocità di degradazione si deve utilizzare solo la parte iniziale della curva (dopo la conclusione della fase di latenza e prima che sia raggiunto il 50 % circa della degradazione). Se la sostanza di prova è degradata, l'attività totale residua del ^{14}C organico è sempre più elevata dell'attività del ^{14}C associata alla sostanza di prova che rimane intatta. Se la sostanza di prova è degradata con una reazione del 1º ordine e una frazione costante α è mineralizzata in CO_2, la pendenza iniziale della curva di scomparsa del ^{14}C (^{14}C organico totale rispetto al tempo) sarà α volte la pendenza della corrispondente curva della concentrazione della sostanza di prova (o, più precisamente, della parte della sostanza di prova marcata con ^{14}C). Se si utilizzano le misure dell'attività totale del ^{14}C organico senza correzioni, la costante di velocità di degradazione calcolata risulterà espressa per difetto. Le procedure per stimare le concentrazioni della sostanza di prova dalle attività radiochimiche misurate sulla base di varie ipotesi semplificatrici sono state descritte nei riferimenti 2, 9, 10, 11. Tali procedure sono applicabili più facilmente nel caso di sostanze a degradazione rapida.

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se risulta che k non è funzione della concentrazione addizionata (cioè se la costante k calcolata è indicativamente uguale a concentrazioni diverse della sostanza di prova) si può ipotizzare che la costante di velocità del 1º ordine è rappresentativa delle condizioni di prova impiegate, cioè la sostanza di prova, il campione di acqua e la temperatura di prova. Un giudizio esperto deve valutare se i risultati possono essere generalizzati o estrapolati ad altri sistemi. Se si utilizza una concentrazione elevata della sostanza di prova e dunque la degradazione non segue una cinetica del 1º ordine, non è possibile utilizzare i dati per la stima diretta di una costante di velocità del 1º ordine o un'emivita corrispondente. Tuttavia, i dati ricavati da una prova a concentrazioni elevate della sostanza di prova possono comunque essere utilizzati per stimare la mineralizzazione totale e/o per rilevare e quantificare i metaboliti.

▼M1

Se si conoscono le velocità di altri processi di perdita diversi dalla biodegradazione (per esempio l'idrolisi o la volatilizzazione), questi valori possono essere sottratti dalla velocità netta della perdita osservata durante il saggio e ottenere una stima approssimativa della velocità di biodegradazione. I dati relativi all'idrolisi possono essere ottenuti, per esempio, da un controllo sterile o da una prova parallela applicando una concentrazione più elevata della sostanza di prova.

La determinazione diretta e indiretta del $^{14}CO_2$ (punto 1.8.9.4 e appendice 3) può essere utilizzata solo per misurare l'entità della mineralizzazione della sostanza di prova in CO_2. La radiocromatografia (RAD-TLC) o l'HPLC possono essere utilizzate per analizzare le concentrazioni della sostanza di prova marcata con ^{14}C e la formazione dei principali metaboliti (punto 1.8.9.4, terzo paragrafo). Per una stima diretta dell'emivita è necessario che non siano presenti importanti metaboliti (definiti come quelli che rappresentano una percentuale ≥ 10 % della quantità applicata di sostanza di prova). Se sono presenti metaboliti nella quantità indicata nella definizione, occorre una valutazione dettagliata dei dati, che può comprendere la ripetizione del saggio e/o l'individuazione dei metaboliti (cfr. punto 1.8.9.5, primo paragrafo), a meno che non si possa ragionevolmente determinare il destino dei metaboliti in base all'esperienza (per esempio con informazioni sulla via di degradazione). Poiché la proporzione di carbonio presente nella sostanza di prova che viene convertita in CO_2 è variabile (soprattutto in funzione della concentrazione della sostanza di prova e di altri substrati disponibili, delle condizioni della prova e della comunità microbica), questo saggio non consente di stimare direttamente la biodegradazione completa come avviene nel saggio con esaurimento del carbonio organico disciolto (DOC die-away test), ma il risultato è analogo a quello ottenuto mediante test respirometrico. Il grado di mineralizzazione sarà pertanto uguale o simile al livello minimo di biodegradazione completa. Per avere un quadro più completo della biodegradazione completa (mineralizzazione e incorporazione nella biomassa) l'analisi della distribuzione di fase del ^{14}C deve avvenire al termine del saggio (cfr. appendice 1). Il ^{14}C nel pool del particolato sarà dato dal ^{14}C incorporato nella biomassa batterica e dal ^{14}C adsorbito o assorbito nelle particelle organiche.

2.3. VALIDITÀ DEL SAGGIO

Se la sostanza di prova non viene degradata nell'intervallo di tempo previsto (per l'anilina e il benzoato di sodio si tratta, in genere, di meno di due settimane) la validità del saggio deve ritenersi dubbia e deve essere ulteriormente verificata; in alternativa, è necessario ripetere il saggio con un nuovo campione d'acqua. In una prova interlaboratorio (ring-test) ISO del metodo al quale hanno partecipato sette laboratori di tutta Europa, le costanti di velocità di degradazione adattate per l'anilina variavano da 0,3 a 1,7 giorni^{-1} con una media di 0,8 $g^{-1\ a\ 20\ °C}$ e un errore standard di ± 0,4 g^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 giorni). I tempi di latenza tipici variavano tra 1 e 7 giorni. Le acque esaminate presentavano una biomassa batterica di 10^3-10^4 unità formanti colonie (CFU) per ml. Le velocità di degradazione nelle acque dell'Europa centrale, ricche in nutrienti, erano superiori a quelle delle acque oligotrofiche dell'Europa settentrionale: questo dato può essere dovuto al diverso stato trofico delle acque o a una precedente esposizione a sostanze chimiche.

Il recupero totale (bilancio di massa) al termine dell'esperimento dovrebbe oscillare tra il 90 % e il 110 % per le sostanze radiomarcate, mentre il recupero iniziale all'inizio dell'esperimento dovrebbe essere compreso tra il 70 % e il 110 % per le sostanze non marcate. Questi intervalli devono tuttavia essere interpretati come obiettivi e non essere considerati dei criteri per l'accettazione del saggio.

▼M1

3. **RELAZIONE DI PROVA**

Nella relazione di prova deve essere indicato chiaramente il tipo di studio condotto, cioè saggio pelagico o con sedimento in sospensione, oltre che le informazioni minime riportate di seguito.

Sostanza di prova e sostanza(e) di riferimento:

— denominazioni comuni, nomi chimici (si raccomanda di indicare le denominazioni IUPAC e/o CAS), numeri CAS, formule di struttura (indicando la posizione del ^{14}C se si utilizzano sostanze radiomarcate) e le pertinenti proprietà fisico-chimiche della sostanza di prova e della sostanza di riferimento (cfr. punti 1.5 e 1.6),

— nomi chimici, numeri CAS, formule di struttura (indicando la posizione del ^{14}C se si utilizzano sostanze radiomarcate) e le pertinenti proprietà fisico-chimiche delle sostanze utilizzate come standard per l'identificazione e la quantificazione dei metaboliti,

— purezza (impurità) delle sostanze di prova e di riferimento,

— purezza radiochimica della sostanza marcata e attività specifica (se pertinente).

Acqua superficiale:

Per il campione di acqua prelevato è necessario fornire le seguenti informazioni minime:

— ubicazione e descrizione del sito di campionamento e, se possibile, cronistoria della contaminazione,

— data e ora in cui è stato prelevato il campione,

— nutrienti (N totale, ammonio, nitriti, nitrati, P totale, ortofosfato disciolto),

— profondità alla quale è stato prelevato il campione,

— aspetto del campione (per esempio, colore e torbidità),

— DOC e TOC,

— BOD,

— temperatura e pH nel luogo e al momento del prelievo,

— ossigeno o potenziale di ossido-riduzione (obbligatorio solo se le condizioni aerobiche non sono evidenti),

— salinità o conduttività (in caso di acque di mare o salmastre),

— solidi in sospensione (se il campione è torbido),

— eventualmente, altre informazioni attinenti sul punto di campionamento al momento del prelievo (per esempio dati effettivi o storici sulla portata dei fiumi o sulle correnti marine, sulle principali fonti di emissioni/scarichi eventualmente presenti nelle vicinanze e sui tipi di scarichi, sulle condizioni meteorologiche verificatesi prima del campionamento).

In via facoltativa è possibile indicare le seguenti informazioni:

— biomassa microbica (per esempio conteggio diretto con arancioacridina o unità formanti colonie),

▼M1

— carbonio inorganico,

— concentrazione di clorofilla *a* utilizzata per la stima specifica della biomassa algale.

Se viene eseguito il saggio con sedimento in sospensione devono essere fornite le seguenti informazioni sul sedimento:

— profondità a cui è stato prelevato il sedimento,

— aspetto del sedimento (colorato, fangoso, limoso o sabbioso),

— consistenza (per esempio % di sabbia grossa, sabbia fine, limo e argilla),

— peso secco in g/l di solidi in sospensione, concentrazione di TOC o perdita di peso alla combustione come indicazione del contenuto di materia organica,

— pH,

— ossigeno o potenziale di ossido-riduzione (obbligatorio solo se le condizioni aerobiche non risultano evidenti).

Condizioni della prova:

— tempo intercorso tra il prelievo del campione e l'utilizzo nel saggio in laboratorio, stoccaggio e pretrattamento del campione, date di esecuzione degli studi,

— quantità di sostanza applicata, concentrazione di prova e sostanza di riferimento,

— metodo di applicazione della sostanza di prova, compreso l'eventuale uso di solventi,

— volume di acqua superficiale utilizzata e di sedimento (eventuale) e volume campionato ad ogni intervallo ai fini dell'analisi,

— descrizione del sistema di saggio applicato,

se il saggio non avviene al buio, fornire informazioni sulle condizioni di «luce diffusa»,

— informazioni sul o sui metodi utilizzati per procedere a controlli sterili (per esempio temperatura, tempo e numero di sterilizzazioni in autoclave),

— temperatura di incubazione,

— informazioni sulle tecniche di analisi e sui metodi utilizzati per le misure radiochimiche e per il controllo del bilancio di massa e la misura della distribuzione di fase (se effettuata),

— numero di misure replicate.

Risultati:

— percentuali di recupero (cfr. punto 1.7.1),

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici applicati, compreso il limite di rilevabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) (cfr. punto 1.7.2),

▼M1

— tutti i dati misurati (comprese le ore dei campionamenti) e i valori calcolati in formato tabulare e le curve di degradazione; per ogni concentrazione di prova e flacone replicato riportare il coefficiente di correlazione lineare per la pendenza del grafico logaritmico, la fase di latenza stimata e una costante di velocità del 1° ordine o di pseudo-1° ordine (se possibile), nonché il corrispondente tempo di dimezzamento di degradazione (o emivita, t_{50}),

— riportare i valori pertinenti sotto forma di medie dei risultati osservati nei singoli campioni replicati, per esempio la lunghezza della fase di latenza, la costante di velocità di degradazione e il tempo di dimezzamento di degradazione (o il t_{50}),

— classificare il sistema come non adattato o adattato in base all'andamento della curva di degradazione e della possibile influenza della concentrazione di prova,

— i risultati del controllo finale del bilancio di massa e i risultati delle eventuali misure della distribuzione di fase,

— la frazione di ^{14}C mineralizzata e, in caso di analisi specifiche, il livello finale di degradazione primaria,

— l'identificazione, la concentrazione molare e la percentuale di prodotti applicati e dei principali metaboliti (cfr. punto 1.8.9.5, primo paragrafo), se del caso,

— eventualmente, una possibile via di trasformazione,

— un commento sui risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999), *Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions*.

3. Metodo di prova C.23. Trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo.

4. Metodo di prova C.24. Trasformazione aerobica e anaerobica nei sistemi sedimentosi acquatici.

5. OCSE (1993), *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OCSE, Parigi.

6. ISO 8245 (1999), *Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)*.

7. ISO 10634 (1995), *Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium*.

8. OCSE progetto (2000), *Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment*, n. 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. e Alexander, M. (1984), «Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density», *Appl. Environ. Microbiol*. n. 47, pagg. 394-401.

10. Ingerslev, F. e N. Nyholm, (2000), «Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems», *Ecotoxicol. Environ. Saf*. n. 45, pagg. 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999), *Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions*.

▼M1

Appendice 1

Distribuzione di fase del ^{14}C

Per verificare il procedimento, le misure di routine dell'attività totale residua del ^{14}C organico (TOA) devono essere integrate da misure del bilancio di massa con la determinazione diretta del $^{14}CO_2$ formatosi dopo intrappolamento in un assorbitore (cfr. appendice 3). Di per sé, una formazione di $^{14}CO_2$ costituisce una prova diretta della biodegradazione rispetto alla degradazione abiotica o ad altri meccanismi di perdita, come la volatilizzazione e l'assorbimento/adsorbimento. Altre informazioni utili che caratterizzano il comportamento di biodegradabilità si ottengono misurando la distribuzione della TOA tra stato disciolto (attività del ^{14}C organico disciolto, DOA) e stato particolato (attività del ^{14}C organico particolato, POA) dopo separazione del particolato per filtrazione a membrana o centrifugazione. La POA è data dalla sostanza di prova sorbita dalla biomassa microbica e da altre particelle oltre al carbonio della sostanza di prova utilizzato per la sintesi di nuovo materiale cellulare e dunque incorporato nella frazione particellare della biomassa. La formazione di materiale con ^{14}C organico disciolto può essere stimata come DOA al termine della biodegradazione (linea orizzontale sulla curva degradazione-tempo).

Stimare la distribuzione di fase del ^{14}C residuo in determinati campioni filtrandoli con un filtro a membrana con porosità di 0,22 μm o 0,45 μm realizzato con un materiale che non adsorba quantitativi ingenti di sostanza di prova (i filtri di policarbonato possono essere i più adatti). Se l'assorbimento/adsorbimento della sostanza di prova nel filtro è troppo consistente per essere ignorato (fattore da verificare prima del saggio), al posto della filtrazione è possibile utilizzare la centrifugazione ad alta velocità (2 000 g, 10 min).

Procedere con il filtrato o centrifugato secondo quanto descritto all'appendice 3 per i campioni non filtrati. Dissolvere i filtri a membrana in un fluido di scintillazione adeguato e procedere al conteggio secondo le modalità consuete, usando in genere solo il metodo del rapporto standard esterno per compensare il fenomeno del quenching (attenuazione) oppure usare un ossidante del campione. Se è stata utilizzata la centrifugazione, rimettere in sospensione il pellet formato dalla frazione di particolato in 1-2 ml di acqua distillata e trasferirlo in una fiala da scintillazione. Successivamente, procedere a un doppio lavaggio con 1 ml di acqua distillata e trasferire l'acqua di lavaggio nella fiala. Se necessario, la sospensione può essere incorporata in un gel per il conteggio in scintillazione liquida.

▼M1

Appendice 2

Procedimento semi-continuo

Per raggiungere una degradazione sufficiente di sostanze recalcitranti può essere necessaria un'incubazione prolungata che può durare fino a vari mesi. In genere il saggio non dovrebbe durare più di 60 giorni, a meno che non si riesca a mantenere le caratteristiche del campione di acqua originario rinnovando la sospensione di prova. La durata del saggio può tuttavia essere prolungata fino ad un massimo di 90 giorni senza rinnovo della sospensione di prova se la degradazione della sostanza di prova è iniziata entro i primi 60 giorni.

Se l'incubazione si prolunga per lungo tempo, la diversità della comunità microbica può diminuire a causa di vari meccanismi di perdita e alla possibile riduzione di nutrienti essenziali e dei substrati di carbonio primari presenti nel campione di acqua. Per determinare la velocità di degradazione di sostanze a degradazione lenta si raccomanda pertanto di procedere ad un saggio semi-continuo. Il saggio deve iniziare con un procedimento semi-continuo se, in base ad esperienze precedenti, si ritiene che sarà necessario un periodo di incubazione di tre mesi per raggiungere una degradazione della sostanza pari al 20 %. In alternativa, il normale saggio in discontinuo potrà essere trasformato in un saggio semi-continuo se nel giro di circa 60 giorni di saggio con la procedura in discontinuo non c'è stata degradazione. La procedura semi-continua può essere arrestata e il saggio può continuare in discontinuo quando si registra una degradazione notevole (per esempio > 20 %).

Nel saggio semi-continuo ogni due settimane circa un terzo del volume della sospensione di prova viene sostituito da acqua appena prelevata alla quale è addizionata la sostanza di prova alla concentrazione iniziale. Analogamente, se viene eseguito il saggio facoltativo con sedimento in sospensione, viene aggiunto anche sedimento all'acqua di sostituzione alla concentrazione iniziale (compresa tra 0,01 e 1 g/l). Nell'esecuzione del saggio con sedimenti solidi in sospensione, è importante mantenere un sistema completamente in sospensione anche quando l'acqua viene rinnovata; inoltre, il tempo di residenza deve essere lo stesso per i solidi e per l'acqua, altrimenti si può perdere la similarità con il sistema acquatico omogeneo, senza fasi fisse, che si intende riprodurre. Per questo motivo, nel caso della procedura semi-continua, è preferibile che la concentrazione iniziale dei sedimenti in sospensione si attesti nell'intervallo più basso indicato.

L'aggiunta di sostanza di prova che viene richiesta implica che la concentrazione iniziale della sostanza di prova non deve essere superata dal rinnovo parziale della sospensione di prova e, dunque, che si deve evitare l'adattamento, che si riscontra di frequente in presenza di concentrazioni elevate della sostanza di prova. Poiché la procedura comprende sia la re-inoculazione che la compensazione per la riduzione dei nutrienti e dei substrati primari, la diversità microbica originaria viene ripristinata e la durata del saggio può essere prolungata, in teoria, all'infinito. In caso di procedura semi-continua è importante ricordare che la concentrazione residua della sostanza di prova deve essere corretta in funzione dei quantitativi di sostanza di prova addizionati o eliminati nel corso di ciascuna procedura di rinnovo. La concentrazione totale e la concentrazione della sostanza di prova disciolta possono essere utilizzate in maniera intercambiabile per i composti con basso grado di assorbimento/adsorbimento. L'assorbimento/-adsorbimento è insignificante (< 5 %) alle condizioni indicate (0,1-1 g solidi/l) per le sostanze con log Kow < 3 (valido per composti neutri, lipofilici), come si può notare dal seguente esempio. 0,1 g/l di solidi corrispondono a circa 10 mg di carbonio per litro (frazione di carbonio, $f_C = 0{,}01$). Se:

Log K_{ow} (della sostanza di prova) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Coefficiente di partizione, $K_d = f_C \times K_{oc}$

la frazione disciolta della concentrazione totale [C-acqua (C_w)/C-totale (C_t)] pari a:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \text{ x } 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Appendice 3

Determinazione del $^{14}CO_2$

Determinazione indiretta del $^{14}CO_2$

Per le misure di routine, il metodo indiretto è in genere quello che richiede meno tempo e il più preciso se la sostanza di prova non è volatile e non si trasforma in metaboliti volatili. È sufficiente trasferire campioni non filtrati (per esempio di 5 ml) in fiale da scintillazione. All'inizio un'attività adeguata nei campioni è compresa tra 5 000 dpm e 10 000 dpm (80-170 Bq) e l'attività iniziale minima è pari a circa 1 000 dpm. Il CO_2 deve essere strippato dopo acidificazione (pH 2-3) con 1 o 2 gocce di H_3PO_4 o di HCl concentrato. Lo strippaggio del CO_2 può essere eseguito insufflando aria per circa ½-1 ora. In alternativa, è possibile agitare vigorosamente le fiale per 1-2 ore (per esempio su un agitatore a micropiastre) oppure procedere ad un'agitazione più delicata per tutta una notte. È necessario verificare l'efficienza dello strippaggio del CO_2 (prolungando l'aerazione o l'agitazione). Successivamente aggiungere un liquido di scintillazione adatto a conteggiare i campioni acquosi; omogeneizzare il campione in miscelatore rotante e determinare la radioattività tramite conteggio in scintillazione liquida e sottraendo l'attività di fondo riscontrata nei bianchi di prova (F_B). A meno che l'acqua di prova non sia molto colorata o contenga concentrazioni elevate di particelle, in genere i campioni presenteranno un quenching (attenuazione) uniforme e sarà sufficiente apportare correzioni all'attenuazione utilizzando uno standard esterno. Se l'acqua di prova è molto colorata, può essere necessario procedere alla correzione con uno standard interno. Se la concentrazione delle particelle è elevata, potrebbe non essere possibile ottenere una soluzione o un gel omogenei, oppure la variazione di attenuazione tra un campione e l'altro potrebbe essere notevole. In tal caso si può utilizzare il metodo di conteggio descritto per i fanghi. Se il saggio viene effettuato sotto forma di saggio con sedimento in sospensione, si può misurare indirettamente il $^{14}CO_2$ prendendo un campione omogeneo di 10 ml dell'acqua/sospensione di prova e separarne le fasi per centrifugazione a velocità adeguata (per esempio 40 000 m/s^2 per 15 min). La fase acquosa deve successivamente essere trattata come descritto in precedenza. L'attività del ^{14}C organico particolato — POA — deve essere determinata mediante ri-sospensione del sedimento in poca acqua distillata, che deve essere successivamente trasferita nelle fiale da scintillazione con l'aggiunta di liquido di scintillazione per formare un gel (a tal fine esistono in commercio liquidi speciali). In base al tipo di particelle (per esempio al loro contenuto di materiale organico) può essere fattibile digerire il campione in una notte con un solubilizzatore in tessuto e successivamente procedere all'omogeneizzazione in un miscelatore rotante prima di aggiungere il liquido di scintillazione. In alternativa, la POA può essere determinata tramite combustione in eccesso di ossigeno utilizzando un ossidante del campione. Al momento del conteggio è sempre necessario includere standard interni e può essere necessario effettuare correzioni dell'attenuazione aggiungendo standard interni per ogni singolo campione.

Determinazione diretta del $^{14}CO_2$

Se il $^{14}CO_2$ formatosi viene misurato direttamente, occorre preparare vari flaconi all'inizio del saggio, prelevarli in ciascun punto di misura acidificandoli (pH 2-3) e raccogliendo il $^{14}CO_2$ in un assorbitore interno (collocato in ogni flacone di prova all'inizio del saggio) o esterno. Come mezzo di assorbimento è possibile utilizzare un mezzo alcalino (per esempio una soluzione di 1N di NaOH o un pellet di NaOH), etanolammina, un assorbitore a base di etanolammina oppure assorbitori reperibili sul mercato. Per la misurazione diretta del $^{14}CO_2$, i flaconi devono essere chiusi, per esempio con tappi in gomma di butile.

▼**M1**

Figura 1a

Esempio di rappresentazione aritmetica dei dati (attività residua rispetto al tempo)

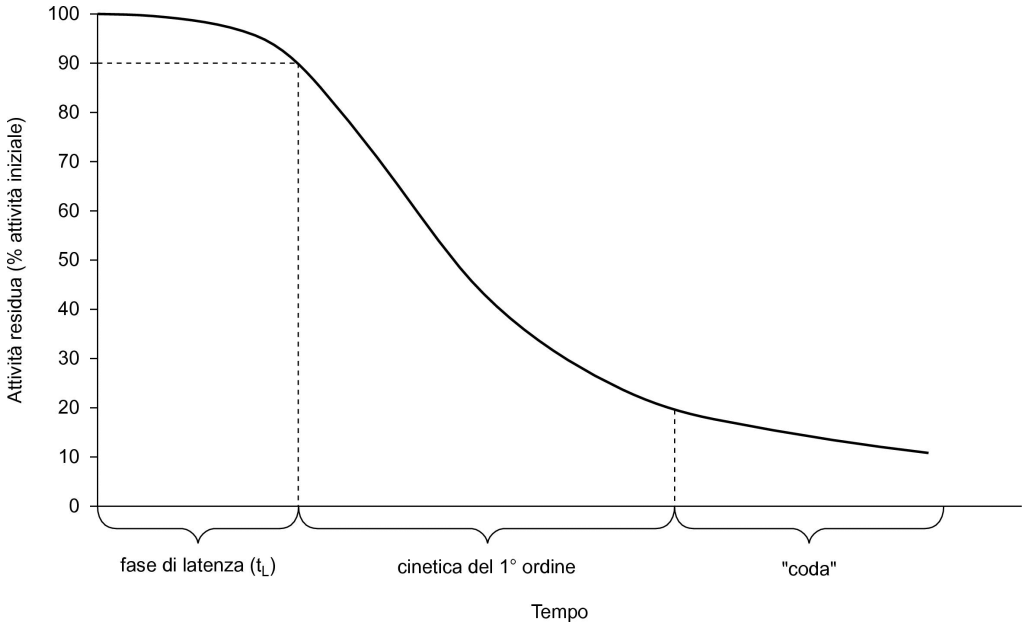
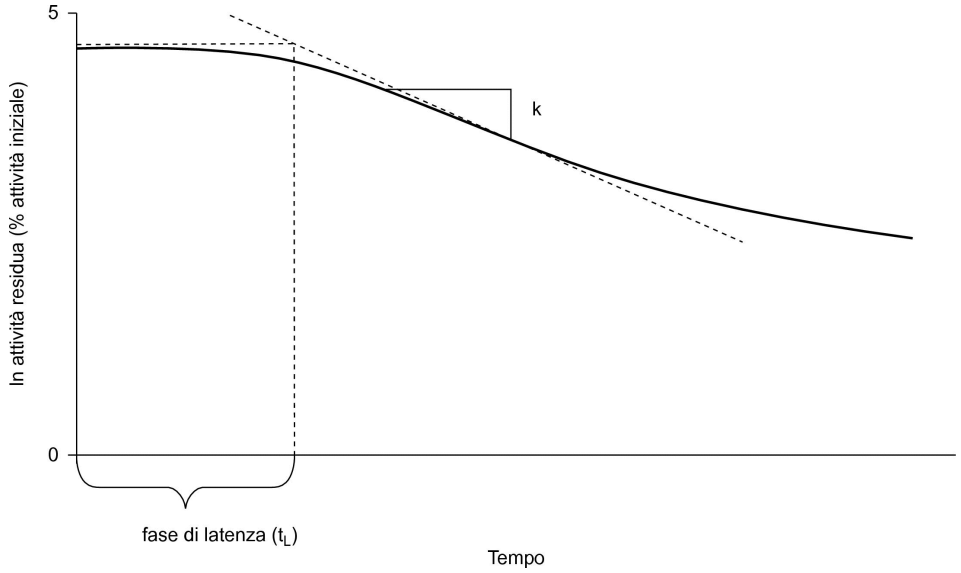


Figura 1b

Esempio di grafico semi-logaritmico (ln attività residua rispetto al tempo)



▼M1

C.26. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *LEMNA* SP.

1. METODO

Il presente metodo corrisponde alla linea guida TG 221 (2006) dell'OCSE. Esiste un ampio consenso da parte delle autorità UE sul fatto che il saggio con Lemna costituisce un'alternativa adeguata al saggio algale per le sostanze fortemente colorate (2, 3).

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è destinato a valutare la tossicità di sostanze nei confronti di piante acquatiche di acqua dolce del genere *Lemna* (lenticchia d'acqua). Si basa su linee direttici esistenti (4, 5, 6, 7, 8, 9) ma comprende modifiche apportate a questi metodi in modo da tenere conto degli ultimi progressi della ricerca e delle consulenze di esperti su una serie di aspetti fondamentali. Il metodo qui proposto è stato convalidato da una prova interlaboratorio (ring test) internazionale (10).

Il presente metodo di prova descrive delle prove di tossicità su *Lemna gibba* e *Lemna minor*, che sono state entrambe ampiamente studiate e oggetto delle norme summenzionate. La tassonomia di *Lemna* spp. è complessa ed è complicata dall'esistenza di numerosi fenotipi. Sebbene con *Lemna* possa verificarsi una variabilità genetica nella reazione alle sostanze tossiche, attualmente disponiamo di dati insufficienti su questa fonte di variabilità per raccomandare l'utilizzo di un clone specifico per questo metodo di prova. Occorre rilevare che la prova non viene effettuata in condizioni asettiche, ma che nel corso della procedura sono adottate misure per mantenere al minimo la contaminazione da parte di altri organismi.

Sono descritte dettagliatamente le procedure con rinnovo (semistatico e continuo) e senza rinnovo (statico) della soluzione di prova. In funzione degli obiettivi della prova e dei requisiti normativi si raccomanda di valutare l'uso di metodi semistatici e continui, per esempio per le sostanze che spariscono rapidamente dalla soluzione per volatilizzazione, fotodegradazione, precipitazione o biodegradazione. Ulteriori elementi sono contenuti nel riferimento 11.

1.2. DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo di prova sono usate le definizioni e le abbreviazioni seguenti:

Biomassa: il peso secco della sostanza vivente presente in una popolazione. Nel presente saggio, i surrogati della biomassa, come i conteggi delle fronde e l'area fogliare sono misurati come di norma e l'uso del termine «biomassa» si riferisce quindi anche a queste misure.

Clorosi: è l'ingiallimento del tessuto fogliare.

Clone: è un organismo o una cellula derivante da un singolo individuo per riproduzione asessuata. Gli individui dello stesso clone sono pertanto geneticamente identici.

Colonia: un aggregato di fronde madre e figlia (di norma da due a quattro) attaccate le une alle altre. A volte si utilizza il termine «pianta».

▼M1

CE_x: la concentrazione della sostanza di prova dissolta nel mezzo di prova che determina una riduzione dell'x % (per esempio, 50 %) della crescita di *Lemna* entro un periodo di esposizione definito (da citare esplicitamente se diverso dalla durata totale o normale della prova). Per indicare chiaramente se un valore CE si riferisce al tasso di crescita o al rendimento, si utilizzano le abbreviazioni «CE_r» per il tasso di crescita e «CE_y» per il rendimento; seguita dalla variabile di misura utilizzata «CE_r» (numero di fronde).

Continuo (flow-through): si riferisce ad una prova in cui le soluzioni sono rinnovate costantemente.

Fronda: struttura individuale/singola del tipo «a foglia» di una pianta di lenticchia d'acqua. Si tratta dell'unità più piccola (individuo) in grado di riprodursi.

Gibbosità: fronde che hanno un aspetto curvo o rigonfio.

Crescita: un aumento della variabile di misura, per esempio il numero di fronde, il peso secco, il peso umido o l'area fogliare nel corso del periodo di prova.

Tasso di crescita (**tasso di crescita specifico medio**): l'aumento logaritmico della biomassa durante il periodo di esposizione.

Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (***Lowest Observed Effect Concentration*** **— LOEC**): la concentrazione più bassa che produce un effetto di riduzione statisticamente significativo ($p < 0,05$) sulla crescita rispetto al campione di controllo, nel corso di un periodo di esposizione definito. Tutte le concentrazioni superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e pertanto la NOEC).

Variabili di misura: qualsiasi tipo di variabile che viene misurata per esprimere *l'endpoint* della prova utilizzando una o più variabili di risposta. Nella prova in questione il numero di fronde, l'area fogliare, il peso fresco e il peso secco sono variabili di misura.

Monocultura: coltura con una sola specie di pianta

Necrosi: tessuto fogliare morto (ossia bianco o rigonfio d'acqua).

Concentrazione senza effetti osservabili (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

Fenotipo: caratteristiche osservabili di un organismo, determinate dall'interazione dei suoi geni con l'ambiente.

Variabili di risposta: sono le variabili per la stima della tossicità dedotte da qualsiasi variabile di misura che descrive la biomassa mediante vari metodi di calcolo. In questo metodo, i tassi di crescita e il rendimento sono variabili di risposta dedotte da variabili di misura come il numero di fronde, l'area fogliare, il peso fresco e il peso secco.

Prova semistatica (di rinnovo): prova in cui la soluzione di prova è periodicamente sostituita a determinati intervalli nel corso della prova.

Prova statica: metodo di prova senza rinnovo della soluzione nel corso della prova.

▼**M1**

Endpoint della prova: indica il fattore generale che sarà modificato, rispetto al controllo, dalla sostanza chimica di prova. In questo metodo l'endpoint è l'inibizione della crescita che può essere espressa da più variabili di risposta dedotte da una o più variabili di misura.

Mezzo di prova: è il mezzo di crescita sintetico completo sui cui le piante di prova crescono mentre sono esposte alla sostanza di prova. La sostanza di prova è di norma disciolta nel mezzo di prova.

Rendimento: il valore di una variabile di misura per esprimere la biomassa al termine del periodo di esposizione meno il valore di tale variabile all'inizio del periodo di esposizione.

1.3. PRINCIPIO DELLA PROVA

Le colture a crescita esponenziale del genere *Lemna* possono crescere come monoculture esposte a varie concentrazioni della sostanza di prova per un periodo di sette giorni. L'obiettivo della prova è quantificare gli effetti della sostanza sulla crescita vegetativa nel corso di questo periodo, sulla base di valutazioni di determinate variabili di misura. Il numero di fronde è la principale variabile di misura. Viene misurata almeno un'altra variabile (area fogliare totale, peso secco o peso fresco), in quanto alcune sostanze possono avere un effetto più pronunciato su variabili di misura diverse dal numero di fronde. Per quantificare gli effetti della sostanza, la crescita nelle soluzioni di prova viene paragonata con quella che avviene nei campioni di controllo; la concentrazione che determina una percentuale specifica x di inibizione della crescita (per esempio 50 %) è determinata ed espressa come CE_x (per esempio CE_{50}).

L'endpoint della prova in questione è l'inibizione della crescita, espressa come l'aumento logaritmico della variabile di misura (tasso di crescita specifico medio) durante il periodo di esposizione. A partire dai tassi di crescita specifica medi registrati in una serie di soluzioni di prova, la concentrazione che determina un'inibizione x % specifica del tasso di crescita (per esempio 50 %) è determinata ed espressa come C_xE_r (per esempio $C_{50}E_r$).

Un'altra variabile di risposta utilizzata nel presente metodo di prova è il rendimento che può essere necessario per soddisfare requisiti normativi specifici in alcuni paesi. È definito come la differenza tra il valore delle variabili di misura al termine del periodo di esposizione e il valore delle variabili di esposizione all'inizio del periodo di esposizione. Dal rendimento registrato in una serie di soluzioni di prova, la concentrazione che determina un'inibizione specifica pari a x % del rendimento (per esempio 50 %) è calcolata ed espressa come C_xE_y (per esempio $C_{50}E_y$).

Inoltre la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate mediante un calcolo statistico.

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Occorre disporre di un metodo analitico con un'adeguata sensibilità per la quantificazione della sostanza nel mezzo di prova.

▼M1

Le informazioni sulla sostanza di prova, che possono essere utili per stabilire le condizioni di prova, comprendono la formula strutturale, la purezza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a, il K_{ow}, la pressione di vapore e la biodegradabilità. L'idrosolubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante della legge di Henry che indica se possono verificarsi perdite significative della sostanza di prova nel corso della prova. Tale calcolo consente di sapere se occorre adottare misure specifiche per tenere sotto controllo tali perdite. Quando le informazioni sulla solubilità e la stabilità della sostanza di prova sono incerte, si consiglia di verificarle nelle condizioni di prova, ossia nel mezzo di crescita, alla temperatura e con l'illuminazione che si utilizzeranno nella prova.

Quando il controllo del pH del mezzo di prova è particolarmente importante, ossia quando si saggiano metalli o sostanze idroliticamente instabili, si raccomanda di aggiungere un tampone al mezzo di crescita (cfr. primo paragrafo del punto 1.7.4). Al riferimento 11 sono forniti ulteriori orientamenti per le prove su sostanze le cui proprietà fisiochimiche rendono difficili le prove in questione.

1.5. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Le sostanze di riferimento, come il 3,5-diclorofenolo utilizzato nelle prove interlaboratorio (ring test) internazionali (10), possono essere sottoposte a prova per verificare la procedura di prova. Si consiglia di effettuare una prova con una sostanza di riferimento almeno due volte l'anno o, qualora la prova sia realizzata con una frequenza inferiore, parallelamente alla determinazione della tossicità della sostanza di prova.

1.6. VALIDITÀ DELLA PROVA

Affinché la prova sia valida, il tempo di raddoppio del numero di fronde nel campione di controllo deve essere inferiore a 2,5 giorni (60 ore), che corrisponde approssimativamente ad una moltiplicazione per sette in sette giorni e a un tasso di crescita specifica media di 0,275 giorni^{-1}. Utilizzando il mezzo e le condizioni di prova descritti nel metodo di prova, questo criterio può essere soddisfatto utilizzando un metodo di prova statico (8). Si parte dal principio che questo criterio può essere soddisfatto anche in condizioni di prova semistatiche o continue. Il calcolo del tempo di raddoppio è illustrato al punto 2.1.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO

1.7.1. **Apparecchiature**

Tutte le apparecchiature che entrano in contatto con i mezzi di prova devono essere di vetro o di un altro materiale chimicamente inerte. Le apparecchiature di vetro utilizzate per le colture e le prove devono essere esenti da contaminanti chimici che potrebbero penetrare nel mezzo di prova e devono essere sterili. I recipienti di prova devono essere sufficientemente ampi da consentire alle fronde delle diverse colonie nei recipienti di controllo di crescere senza sovrapporsi alla fine della prova. Le radici possono toccare il fondo dei recipienti, ma si consiglia di prevedere una profondità minima di 20 mm e un volume minimo di 100 ml in ciascun contenitore. La scelta dei recipienti di prova non riveste particolare importanza a condizione che si rispettino i suddetti requisiti. I beaker di vetro, i cristallizzatori o i piatti Petri di vetro di dimensioni adeguate si sono dimostrati adatti. I recipienti di prova devono essere coperti per minimizzare l'evaporazione e la contaminazione accidentale, pur consentendo il ricambio d'aria necessario. I recipienti di prova, e in particolari i loro coperchi, non devono creare zone d'ombra o alterare le caratteristiche spettrali della luce.

▼M1

Le colture e i recipienti di prova non devono essere conservati insieme; è opportuno utilizzare camere di crescita ambientali, incubatori o stanze separati. L'illuminazione e la temperatura devono essere regolabili e mantenute ad un livello costante (cfr. punto 1.7.8).

1.7.2. **Organismo di prova**

L'organismo utilizzato per questa prova è la *Lemna gibba* o la *Lemna minor*. L'appendice 1 contiene una breve descrizione delle specie di lenticchie d'acqua che sono state utilizzate per le prove di tossicità. Il materiale vegetale può essere ottenuto da una collezione di colture, da un altro laboratorio o essere raccolto sul terreno. In tal caso, le piante dovrebbero essere tenute nel mezzo che sarà utilizzato per le prove per almeno otto settimane prima di essere utilizzate. Le colture di partenza saranno prelevate solo su siti chiaramente esenti da fonti evidenti di inquinamento. Se le colture provengono da un altro laboratorio o da una collezione di colture, devono essere mantenute nelle stesse condizioni per almeno tre settimane. La fonte del materiale vegetale e la specie e il clone (se conosciuto) utilizzati per la prova devono sempre essere indicati.

Occorre utilizzare delle monoculture, chiaramente esenti da contaminazioni da parte di altri organismi come alghe e protozoi. Le piante sane di *L. minor* formano colonie comprendenti da due a cinque fronde, mentre le colonie sane di *L. gibba* possono comprendere fino a sette fronde.

La qualità e l'uniformità delle piante utilizzate per la prova avranno un impatto significativo sui risultati della stessa e dovrebbero pertanto essere selezionate con cura. Occorre utilizzare piante giovani, in rapida crescita, sprovviste di lesioni visibili e di parti scolorite (clorosi). Le colture di buona qualità presentano un elevato numero di colonie con almeno due fronde. Un elevato numero di fronde singole indica la presenza di uno stress ambientale, per esempio scarsità di nutrienti, e tale materiale non dovrebbe essere utilizzato per le prove in questione.

1.7.3. **Colture**

Per ridurre la frequenza delle operazioni di manutenzione (per esempio, se per un certo periodo, non si prevedono prove sulle *Lemna*), le colture possono essere conservate ad un'illuminazione e una temperatura ridotte (4-10 °C). Informazioni dettagliate sulla coltura sono riportate nell'appendice 2. In caso di segni evidenti di contaminazione da parte di alghe o altri organismi occorrerà effettuare una sterilizzazione superficiale di un sottocampione di fronde di *Lemna*, e in seguito trasferirlo in un mezzo nuovo (cfr. appendice 2). In tal caso la coltura contaminata rimanente dovrebbe essere eliminata.

Almeno sette giorni prima della prova, un numero sufficiente di colonie è trasferito in modo asettico in un mezzo sterile nuovo e coltivato per 7-10 giorni nelle condizioni previste per la prova.

1.7.4. **Mezzo di prova**

I vari mezzi raccomandati per *Lemna minor* e *Lemna gibba* sono descritti qui di seguito. Occorre prestare particolare attenzione all'aggiunta di un tampone pH nel mezzo di prova [MOPS (acido 4-morfolinopropanosulfonico, CAS n. 1132-61-2; EINECS n. 214-478-5) nel mezzo di *L. minor* e $NaHCO_3$ nel mezzo di *L. gibba*] qualora si pensi che questi possa reagire con la sostanza di prova e condizionare l'espressione della sua tossicità. Il mezzo di Steinberg (12) è accettabile a condizione che siano rispettati i criteri di validità.

▼M1

Per le colture e le prove con *L. minor* si raccomanda l'uso del mezzo di crescita standard svedese (SIS) modificato. La composizione di questo mezzo è riportata all'appendice 3.

Il mezzo di crescita 20X — AAP, descritto all'appendice 3, è consigliato per la coltura e le prove con *L. gibba*.

Il mezzo di Steinberg descritto all'appendice 3, è adatto a *L. minor*, ma può essere utilizzato anche per *L. gibba* a condizione che siano rispettati i criteri di validità.

1.7.5. **Soluzioni di prova**

Le soluzioni di prova sono generalmente preparate mediante diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madri sono solitamente preparate dissolvendo la sostanza nel mezzo di crescita.

La concentrazione più elevata della sostanza di prova non deve di norma superare l'idrosolubilità della sostanza nelle condizioni di prova. Va rilevato, tuttavia, che le specie *Lemna* galleggiano in superficie e rischiano di essere esposte a sostanze che si accumulano all'interfaccia acqua-aria (per esempio sostanze scarsamente solubili in acqua, sostanze idrofobe o tensioattivi). In tali circostanze, l'esposizione risulterà da sostanze diverse da quelle presenti nella soluzione, pertanto le concentrazioni di prova potrebbero, in funzione delle caratteristiche della sostanza di prova, eccedere la solubilità dell'acqua. Per le sostanze di prova a bassa idrosolubilità, potrà essere necessario preparare una soluzione madre concentrata o una dispersione della sostanza utilizzando un solvente organico o un additivo di dispersione al fine di agevolare l'aggiunta di quantità precise di sostanze di prova nel mezzo di prova e favorire la sua dispersione e dissoluzione. Occorre fare il possibile per evitare di utilizzare tali materiali. Non si deve verificare una fitotossicità dovuta a solventi o disperdenti. Tra i solventi di uso comune che non provocano fitotossicità a concentrazioni fino a 100 $\mu l \cdot l^{-1}$ ricordiamo l'acetone e il dimetilformammide. Se si utilizza un solvente o un disperdente, la sua concentrazione finale (ridotta al minimo, ossia $\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), deve essere comunicata e identica in tutti i recipienti trattati e di controllo. Ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti sono riportate al riferimento 11.

1.7.6. **Gruppi sperimentali e gruppi di controllo**

Informazioni sulla tossicità della sostanza di prova nei confronti di *Lemna*, per esempio sulla base di una prova per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni da usare, aiuterà a determinare le concentrazioni di prova adeguate. Nella prova di tossicità vera e propria di norma si dovrebbero prevedere almeno cinque concentrazioni che formano una serie geometrica. Il fattore di separazione tra le concentrazioni di prova non dovrebbe superare 3,2 ma si può utilizzare un fattore più elevato se la curva concentrazione-risposta è piatta. Qualora si utilizzino meno di cinque concentrazioni occorre fornire una giustificazione. Occorre realizzare almeno tre repliche per ogni concentrazione.

Nel fissare l'intervallo delle concentrazioni di prova (per determinare l'intervallo e/o la prova di tossicità finale), occorre tenere presente quanto segue:

▼M1

— per determinare la CE_x, le concentrazioni di prova dovrebbero essere intorno al valore CE_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Per esempio, quando si valuta la CE_{50}, la concentrazione di prova più elevata deve essere superiore al valore CE_{50}. Se il valore CE_{50} si trova al di fuori dell'intervallo delle concentrazioni di prova, i relativi intervalli di confidenza saranno ampi e si rischia di non poter valutare correttamente la validità dell'adeguamento statistico del modello.

— Quando la finalità è valutare la LOEC/NOEC, la concentrazione di prova più bassa deve essere sufficientemente ridotta affinché la sua crescita non sia notevolmente inferiore a quella dei controlli. Inoltre la concentrazione di prova più elevata deve essere sufficientemente alta affinché la sua crescita sia significativamente inferiore a quella del controllo. In caso contrario, occorrerà ripetere la prova utilizzando un intervallo di concentrazione diverso (a meno che la concentrazione più elevata raggiunga il limite di solubilità o la concentrazione limite superiore richiesta, per esempio 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Ogni prova deve prevedere controlli con mezzo nutriente, numero di fronde e colonie, condizioni ambientali e procedure (come i recipienti di prova) identici, ma senza la sostanza di prova. Qualora si utilizzi un solvente o un additivo di dispersione, occorre effettuare un ulteriore trattamento di controllo col solvente/disperdente nelle stesse concentrazioni utilizzate nei recipienti contenenti la sostanza di prova. Il numero di recipienti di controllo replicati (e di recipienti di solvente, se del caso) dovrebbero idealmente corrispondere al doppio dei recipienti di prova utilizzati per ciascuna concentrazione di prova.

Se la determinazione della NOEC non è necessaria, la prova può essere modificata in modo da aumentare il numero di concentrazioni e ridurre il numero di repliche per concentrazione. Tuttavia occorre prevedere almeno tre repliche di controllo.

1.7.7. **Esposizione**

Alcune colonie, composte da 2 a 4 fronde visibili, sono prelevate dalle colture dell'inoculo e ripartite a caso nei recipienti di prova in condizioni asettiche. Ciascun recipiente di prova contiene complessivamente da 9 a 12 fronde. Il numero di fronde e di colonie deve essere uguale in ciascun recipiente di prova. L'esperienza acquisita con questo metodo e i dati ottenuti con la prova interlaboratorio (ring-test) indicano che bastano tre repliche per trattamento (ciascuna replica contiene da 9 a 12 fronde inizialmente) per individuare differenze di crescita tra i trattamenti pari a circa da 4 a 7 % dell'inibizione, calcolate in base al tasso di crescita (e da 10 a 15 % se calcolata in base al rendimento) (10).

La disposizione casuale dei recipienti di prova nell'incubatore è necessaria per ridurre al minimo l'impatto delle differenze spaziali di intensità di luce o di temperatura. La disposizione dei recipienti quando si effettuano le osservazioni (o più spesso quando si rimettono a posto i recipienti) deve avvenire secondo un piano in blocchi o una procedura casuale.

▼M1

Se una prova di stabilità preliminare indica che la concentrazione della sostanza di prova non può essere mantenuta (ossia, la concentrazione misurata scende al di sotto dell'80 % della concentrazione misurata inizialmente) nel corso della prova (7 giorni), si raccomandano delle prove semistatiche. In tal caso, occorre esporre le colonie a soluzioni di prova e a soluzioni di controllo nuove almeno due volte nel corso della prova (per esempio, il 3° e il 5° giorno). La frequenza dell'esposizione al mezzo fresco dipenderà dalla stabilità della sostanza di prova; una frequenza più elevata può essere necessaria per mantenere concentrazioni pressoché costanti nel caso di sostanze ad elevata volatilità o instabilità. In alcuni casi può rivelarsi necessaria una procedura continua (11, 13).

L'esposizione mediante un'applicazione fogliare (polverizzazione) non è esaminata nel presente metodo di prova, il riferimento 14 contiene informazioni in proposito.

1.7.8. **Condizioni di incubazione**

Occorre applicare un'illuminazione continua a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa compresa tra 85 e 135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ quando è misurata in una radiazione fotosinteticamente attiva (da 400 a 700 nm) in punti situati alla stessa distanza dalla fonte luminosa delle fronde di *Lemna* (pari a 6 500-10 000 lux). Eventuali scarti rispetto all'intensità luminosa scelta non devono superare ± 15 % nell'area di prova. Il metodo di individuazione e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, inciderà sul valore misurato. I sensori sferici (che rilevano la luce proveniente da tutti gli angoli situati sopra e sotto il piano di misura) e i sensori «cosinusoidali» (che rilevano la luce da tutti gli angoli situati al di sopra del piano di misura) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.

La temperatura nei recipienti di prova è mantenuta a 24 ± 2 °C. Il pH del mezzo di controllo non deve aumentare di oltre 1,5 unità nel corso della prova. Uno scarto superiore a 1,5 unità non invalida la prova se il rispetto dei criteri di validità può essere dimostrato. Occorre prestare particolare attenzione alle variazioni del pH in alcuni casi specifici, in particolare quando si effettuano prove con sostanze instabili e metalli. Cfr. (11) per indicazioni supplementari in materia.

1.7.9. **Durata**

La prova termina sette giorni dopo il trasferimento delle piante nei recipienti di prova.

1.7.10. **Misure e determinazioni analitiche**

All'inizio della prova, si contano le fronde contenute nei recipienti di prova e si registrano questi valori, stando attenti a contare le fronde emergenti chiaramente visibili. Il numero di fronde che sembrano normali o anormali deve essere determinato all'inizio della prova, almeno una volta ogni tre giorni nel periodo di esposizione (ossia almeno due volte nel corso del periodo di sette giorni) e infine al termine della prova. Occorre prender nota anche delle modifiche nello sviluppo delle piante per quanto riguarda, per esempio, la dimensione e l'aspetto delle fronde, i segni di necrosi, clorosi e le gibbosità, la frammentazione delle colonie o la diminuzione della loro galleggiabilità, nonché la lunghezza e l'aspetto delle radici. Occorre prender nota anche delle caratteristiche salienti del mezzo di prova (per esempio la presenza di materie non disciolte, lo sviluppo di alghe nei recipienti di prova).

▼M1

Durante le prova, oltre a determinare il numero di fronde, si misurano gli effetti della sostanza di prova su una o più delle seguenti variabili:

i) area fogliare totale;

ii) peso secco;

iii) peso fresco.

L'area totale delle fronde presenta il vantaggio di potere essere stabilita per ciascun recipiente di prova e di controllo all'inizio e al termine della prova. Il peso secco o fresco è stabilito all'inizio della prova da un campione della coltura dell'inoculo rappresentativo del materiale utilizzato per avviare la prova e alla fine della prova col materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo. Se la superficie fogliare non è misurata, il peso secco va preferito al peso fresco.

L'area fogliare totale, il peso secco e il peso fresco posso essere determinati nel modo seguente:

i) area fogliare totale: l'area fogliare totale di tutte le colonie può essere determinata mediante l'analisi dell'immagine. Si può rilevare la sagoma del recipiente di prova e delle piante con una videocamera (ponendo il recipiente su un illuminatore) e si digitalizza l'immagine ottenuta. Una calibratura realizzata con forme piane di superficie conosciuta consente in seguito di determinare l'area fogliare totale in un recipiente di prova. Occorre fare in modo di evitare le interferenze con il bordo del recipiente di prova. Un metodo più elaborato consiste nel fotocopiare i recipienti di prova che contengono le piante, ritagliare la sagoma risultante dalle colonie e determinarne la superficie mediante un analizzatore della superficie fogliare o della carta millimetrata. Si possono utilizzare anche altre tecniche (per esempio il quoziente del peso della sagoma ritagliata nella carta per il peso di un pezzo di carta di superficie nota);

ii) peso secco: tutte le colonie sono prelevate in ciascun recipiente di prova e sciacquate con acqua distillata e deionizzata. Sono poi poste su della carta assorbente che ne assorbe l'eccesso di acqua ed asciugate a 60 °C fino a quando non raggiungono un peso costante. Eventuali frammenti di radici devono essere inclusi. Il peso secco deve essere espresso con una precisione di almeno 0,1 mg.

iii) peso fresco: tutte le colonie sono trasferite in tubi di polistirolo (o altro materiale inerte) tarati e bucati con piccoli fori (1 mm) nel fondo arrotondato. I tubi sono in seguito centrifugati a 3 000 gpm per 10 minuti a temperatura ambiente. I tubi contenenti le colonie asciugate sono nuovamente pesati e il preso fresco è calcolato per sottrazione dalla tara del tubo.

1.7.10.1. *Frequenza delle misurazioni e determinazioni analitiche*

Se si utilizza un procedimento statico, il pH di ciascun recipiente trattato deve essere misurato all'inizio e alla fine della prova. Se il procedimento è semistatico, il pH deve essere misurato in ciascun lotto di soluzione di prova «nuova», prima di ogni rinnovo e nelle soluzioni «utilizzate» corrispondenti.

▼M1

L'intensità luminosa è misurata nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza in dei punti situati alla stessa distanza della fonte luminosa delle fronde di *Lemna*. Tali misurazioni devono essere effettuate almeno una volta nel corso della prova. La temperatura del mezzo è misurata almeno una volta al giorno in un recipiente di prova supplementare conservato nelle stesse condizioni degli altri nella stanza di crescita, l'incubatore o la stanza.

Durante la prova, le concentrazioni della sostanza di prova sono determinate ad intervalli adeguati. Nelle prove statiche, occorre determinare le concentrazioni all'inizio e al termine della prova.

Nelle prove semistatiche, laddove si presume che la concentrazione della sostanza di prova non rimanga in un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale; è necessario analizzare tutte le soluzioni di prova appena preparate e le stesse soluzioni ad ogni rinnovo (cfr. terzo paragrafo del punto 1.7.7). Tuttavia, per le prove in cui la concentrazione della sostanza di prova misurata inizialmente non si situa in un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale, ma in cui un numero sufficiente di indizi indica che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (ossia nell'intervallo tra 80 e 120 % della concentrazione iniziale), si possono effettuare le analisi chimiche anche solo alle concentrazioni di prova più elevate e più basse. In ogni caso, la determinazione delle concentrazioni della sostanza di prova prima del rinnovo deve essere effettuata su un solo recipiente identico per ciascuna concentrazione di prova (o in un recipiente in cui si sarà mescolato il contenuto di tutti i recipienti trattati in modo identico).

Nel caso delle prove continue si può applicare un sistema di prelievo identico a quello descritto per le prove semistatiche, con un'analisi all'inizio, a metà e al termine della prova, ma senza l'analisi delle soluzioni «utilizzate» che in questo caso non è necessaria. In questo tipo di prova, il flusso del diluente e della sostanza di prova e della soluzione madre della sostanza di prova deve essere controllato giornalmente.

Se risulta che la concentrazione della sostanza di prova si è mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo ± 20 % della concentrazione nominale o misurata all'inizio, l'analisi dei risultati può basarsi sui valori nominali o quelli misurati all'inizio. Se lo scarto rispetto alla concentrazione nominale o quella misurata inizialmente è superiore a ± 20 %, l'analisi dei risultati dovrà basarsi sulla media geometrica della concentrazione rilevata nel corso dell'esposizione o su due modelli che descrivono il calo della concentrazione della sostanza di prova (11).

1.7.11. **Prova limite**

In determinate circostanze, per esempio quando una prova preliminare indica che la sostanza di prova non esercita nessun effetto tossico a concentrazioni fino a 100 $mg \cdot l^{-1}$ o al suo limite di solubilità nel mezzo di prova (a seconda del valore più basso), si potrà effettuare una prova limite che comporta il confronto tra le reazioni di un gruppo di controllo e un gruppo trattato (100 $mg \cdot l^{-1}$ o una concentrazione uguale al limite di solubilità). A supporto di questa prova, si raccomanda di effettuare un'analisi della concentrazione di esposizione. Tutti i criteri di validità e le condizioni sperimentali descritti precedentemente si applicano alla prova limite, eccezion fatta per il numero di recipienti trattati in modo identico, che deve essere raddoppiato. La crescita nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato può essere analizzata mediante una prova statistica che consenta di paragonare le medie, per esempio un t-test di Student.

▼M1

2. **DATI E RELAZIONI**

2.1. TEMPIO DI RADDOPPIO

Per determinare i tempi di raddoppio (T_d) del numero di fronde e verificare se lo studio rispetta questo criterio di validità (punto 1.6), si utilizza la formula seguente applicata con i dati risultanti dai recipienti di prova:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

in cui μ è il tasso di crescita specifica medio determinato conformemente al primo e al secondo paragrafo del punto 2.2.1.

2.2. VARIABILI DI RISPOSTA

Questa prova mira a determinare gli effetti della sostanza di prova sulla crescita vegetativa di *Lemna*. Il metodo di prova descrive due variabili di risposta, in quanto negli Stati membri esistono preferenze e requisiti normativi diversi. Affinché i risultati della prova siano accettabili in tutti gli Stati membri, gli effetti devono essere valutati in funzione delle due variabili di risposta (a) e (b) definite di seguito.

a) tasso di crescita specifico medio: questa variabile è calcolata in base alle modifiche dei logaritmi del numero di fronde e, d'altra parte, ai logaritmi di un altro parametro di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) nel corso del tempo (espresso in giorni) nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati. A volte viene definito «tasso di crescita relativo» (15).

b) Rendimento: questa variabile di risposta è calcolata in funzione dei cambiamenti del numero di fronde e di un altro parametro di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati.

Occorre rilevare che i valori di tossicità calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzato i risultati della prova. I valori della CE_x basati sul tasso di crescita specifico medio (C_xE_r) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento (C_xE_y), se le condizioni del presente metodo di prova sono rispettate, per via del fondamento matematico dei due approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non si tratta di una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame. Il concetto di tasso di crescita specifico medio si basa sullo schema generale di crescita esponenziale delle lenticchie d'acqua in colture non limitate, in cui la tossicità è valutata sulla base degli effetti sul tasso di crescita, senza tenere conto del livello assoluto del tasso di crescita specifico di controllo, della curva discendente concentrazione-risposta o della durata della prova. I risultati basati sulla variabile di rendimento dipendono invece da tutte queste altre variabili. Il C_xE_y dipende dal tasso di crescita specifico della specie di lenticchia d'acqua utilizzata in ogni prova e dal tasso di crescita specifico massimo che può variare da una specie all'altra, se non addirittura da un clone all'altro. Questa variabile non deve essere utilizzata per confrontare la sensibilità alle sostanze tossiche di specie diverse o addirittura di cloni diversi di lenticchie d'acqua. Pur essendo preferibile, da un punto di vista scientifico, valutare la tossicità in base al tasso di crescita specifico medio, il presente metodo di prova propone anche delle stime basate sul rendimento al fine di soddisfare i requisiti normativi vigenti in alcuni paesi.

▼M1

Le stime di tossicità devono basarsi sul numero di fronde nonché su un'altra variabile di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) perché alcune sostanze possono avere un effetto più marcato su una variabile diversa dal numero di fronde, che potrebbe non essere individuato calcolando unicamente il numero di fronde.

Si inseriscono in una tabella il numero di fronde e qualsiasi altra variabile di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) insieme alle concentrazioni della sostanza di prova risultanti da ogni misurazione. Le analisi seguenti, per esempio per stimare la LOEC, la NOEC o la CE_x devono basarsi sui valori di ogni replicato e non sulle medie calcolate per ciascun gruppo trattato.

2.2.1. **Tasso di crescita specifico medio**

Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'incremento logaritmico delle variabili di crescita — il numero di fronde e un'altra variabile di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) — utilizzando la formula riportata qui di seguito per ciascun replicato dei gruppi di controllo e dei gruppi trattati:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

in cui:

— μ_{i-j}: tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j

— N_i: variabile di misura nel recipiente di prova o di controllo nel momento i

— N_j: variabile di misura nel recipiente di prova o di controllo nel momento j

— t: periodo di tempo tra i e j

Per ciascun gruppo trattato e di controllo, calcolare un valore medio del tasso di crescita e le stime della varianza.

Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (il momento «i» citato nella formula corrisponde all'inizio della prova e il momento «j» corrisponde alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico e le stime della varianza. Occorre inoltre valutare il tasso di crescita sezione per sezione, al fine di determinare gli effetti della sostanza di prova nel corso del periodo di esposizione (per esempio analizzando le curve di crescita «log-trasformate»). Una differenza significativa tra il tasso di crescita «sezione per sezione» e il tasso di crescita medio sta ad indicare l'esistenza di uno scarto rispetto alla crescita esponenziale costante, scarto che richiede un attento esame delle curve di crescita. In tal caso, un approccio prudente consisterebbe nel confrontare i tassi di crescita specifici delle colture trattate durante il periodo di inibizione massima con quelli dei controlli nello stesso periodo.

▼M1

La percentuale di inibizione del tasso di crescita (I_r) può esser calcolata per ciascuna concentrazione di prova (gruppo trattato) secondo la formula seguente:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

in cui:

— % I_r: percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio

— μ_C: valore medio di μ nel gruppo di controllo

— μ_T: valore medio di μ nel gruppo trattato

2.2.2. **Rendimento**

Gli effetti sul rendimento sono determinati in funzione di due variabili di misura: il numero di fronde e un'altra variabile di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco) misurati in ciascun recipiente di prova all'inizio e al termine della prova. Per quanto riguarda il peso secco o il peso fresco, la biomassa di partenza è determinata a partire da un campione di fronde prelevato dallo stesso lotto utilizzato per l'inoculazione dei recipienti di prova (cfr. secondo paragrafo del punto 1.7.3). Per ciascuna concentrazione di prova e di controllo, occorre calcolare un valore medio di rendimento nonché le stime della varianza. La percentuale media di inibizione del rendimento (% I_r) può esser calcolata per ogni gruppo trattato secondo la formula seguente:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

in cui:

— % I_y: percentuale di riduzione del rendimento

— b_C: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo di controllo

— b_T: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo trattato

2.2.3. **Tracciato delle curve concentrazione-risposta**

Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurano la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r, o I_y calcolate come indicato nell'ultimo paragrafo del punto 2.2.1 o 2.2.2) e la log concentrazione della sostanza di prova.

2.2.4. **Stima della CE_x**

Le stime della CE_x (per esempio la CE_{50}) si devono basare sia sul tasso di crescita specifico medio (C_xE_r) sia sul rendimento (C_xE_y), che devono, a loro volta, basarsi sul numero di fronde e su un'ulteriore variabile di misura (area fogliare totale, peso secco o peso fresco), in quanto alcune sostanze esercitano un impatto diverso sul numero di fronde e sulle altre variabili di misura. I parametri di tossicità auspicati corrispondono pertanto a quattro valori di CE_x per ciascun livello di inibizione x calcolato: C_xE_r (numero di fronde); C_xE_r (area fogliare totale, peso secco o pesco fresco); C_xE_y (numero di fronde); e C_xE_y(area fogliare totale, peso secco o peso fresco).

▼M1

2.3. PROCEDURE STATISTICHE

L'obiettivo è ottenere una relazione quantitativa concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata dopo aver effettuato una trasformazione di linearizzazione dei dati di reazione — per esempio in unità probit, logit o Weibull (16), ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle irregolarità inevitabili dei valori e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (16). Occorre rilevare che i metodi analitici usuali che ricorrono alle trasformazioni probit, logit, o Weibull sono destinati ad essere utilizzati con dati quantali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono essere modificati per poter essere utilizzati con i dati concernenti la crescita o il rendimento. Alcune procedure specifiche che consentono di determinare i valori della CE_x a partire da dati continui sono reperibili nei riferimenti 17, 18 e 19.

Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori CE_x. Laddove possibile, occorre determinare gli intervalli di confidenza a 95 % per ogni stima. La corrispondenza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione dovrebbe essere valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni recipiente replicato e non sulle medie dei gruppi trattati.

Le stime della CE_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con bootstrapping (20), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.

Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla o un metodo di tendenza. Possono essere utili i test di Dunnett o di Williams (21, 22, 23, 24). È necessario controllare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Si raccomanda di effettuare questo controllo graficamente o con un test formale (25), come il test di Levene o quello di Bartlett. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi analitici come i test di tendenza regressivi di Jonkheere. Ulteriori riferimenti sulla determinazione della NOEC sono reperibili al riferimento 19.

Alcuni progressi recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali della CE_x basate sulla regressione. Per questa prova su *Lemna* non sono stati fissati valori adeguati di x. Tuttavia un intervallo da 10 a 20 % sembra adeguato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile menzionare sia la CE_{10} che la CE_{20}.

3. **RELAZIONI**

3.1. RELAZIONE SULLA PROVA

La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— stato fisico e proprietà fisico-chimiche pertinenti, compreso il limite di solubilità in acqua,

▼M1

— dati di identificazione chimica (per esempio il numero CAS), compresa la purezza.

Specie oggetto della prova:

— nome scientifico, clone (se noto) e origine.

Condizioni sperimentali:

— procedimento di prova utilizzato (statico, semi-statico o continuo),

— data dell'inizio della prova e durata della prova,

— mezzo della prova,

— descrizione della prova: contenitori e coperchi, volumi delle soluzioni, numero di colonie e di fronde per contenitore all'inizio della prova,

— concentrazioni di prova (nominali e misurate in funzione delle esigenze), numero di replicati per concentrazione,

— metodi di preparazione delle soluzioni madri e delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di eventuali solventi o disperdenti,

— temperatura nel corso della prova,

— fonte luminosa, intensità luminosa e omogeneità,

— valori del pH dei mezzi di prova e di controllo,

— concentrazioni della sostanza di prova e metodo di analisi e dati adeguati per la valutazione della qualità (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi),

— metodo di determinazione del numero di fronde o di altre variabili di misura, per esempio peso secco, peso fresco o area fogliare,

— tutte le deviazioni rispetto al metodo di prova.

Risultati:

— dati grezzi: numero di fronde e altre variabili di misura in ciascun recipiente di prova e di controllo a ciascuna osservazione e analisi,

— medie e scarti tipo per ciascuna variabile di misura,

— curve di crescita per ciascuna concentrazione (si raccomanda la log-trasformazione della variabile di misura, cfr. secondo paragrafo del punto 2.2.1),

— tempio di raddoppio/tasso di crescita nel controllo sulla base del numero di fronde,

— calcolo delle variabili studiate per ciascun replicato, con valore medio e coefficiente di variazione dei replicati,

— rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto,

— stime degli endpoint tossici per le variabili di risposta: per esempio CE_{50}, CE_{10}, CE_{20}, e relativi intervalli di confidenza. Qualora siano state calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle,

▼M1

— se è stata praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuato (per esempio, la differenza meno significativa),

— stimoli alla crescita eventualmente osservati in un gruppo trattato,

— eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzione di prova,

— analisi dei risultati, compresa l'influenza sul risultato del test risultante dagli scostamenti dal presente metodo di prova.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Linea guida TG 221 (2006) dell'OCSE. Saggio di inibizione della crescita di *Lemna* sp.

2. L'utilizzo di studi su Lemna per le sostanze colorate è illustrato dettagliatamente al punto 13.5.3 del manuale delle decisioni dell'UE di luglio 2006, all'indirizzo: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/-new-chemicals.

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues all'indirizzo:

   http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

5. USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

6. AFNOR — *Association Française de Normalisation*. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pagg.

7. SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

8. Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor. EPS 1/RM/37-120 pagg.

9. Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

15. Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

18. Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

19. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

21. Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

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

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

24. Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

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

▼M1

Appendice 1

Descrizione di *Lemna* spp.

La pianta acquatica comunemente denominata «lenticchia d'acqua»*Lemna* spp., appartiene alla famiglia delle *Lemnaceae* costituita da quattro generi presenti in tutto il mondo. La loro tassonomia e il loro aspetto sono stati descritti in maniera esaustiva, (1, 2). *Lemna gibba* e *L. minor* sono specie rappresentative delle zone temperate e sono regolarmente utilizzate nelle prove di tossicità. Entrambe le specie possiedono un fusto discoide (fronda) galleggiante o sommerso e una radice estremamente sottile che parte dalla superficie inferiore di ogni fronda. *Lemna* spp. fiorisce raramente e la pianta si riproduce per via vegetativa dando luogo a nuove fronde (3). Rispetto alle piante più vecchie, le giovani tendono ad essere più pallide, avere radici più corte ed essere costituite da 2-3 fronde di misure diverse. Le dimensioni ridotte di *Lemna*, la sua struttura semplice, la sua riproduzione asessuata e il «tempo di generazione» breve rendono le piante di questo genere particolarmente adatte alle prove di laboratorio (4, 5).

Data la possibile variazione di sensibilità da una specie all'altra, solo i confronti di sensibilità all'interno della stessa specie sono validi.

Esempi di specie di *Lemna* utilizzati per le prove: riferimenti bibliografici delle specie

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Fonti di specie di *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, CANADA, M5S 3 B2
Tel. +1 416978-3641
Fax +1 416978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
STATI UNITI
Tel. +1 919515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stoccolma
SVEZIA
Tel. +46 86747240
Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlino
GERMANIA
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Bibliografia

1. Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.
2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.
5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼M1

Appendice 2

Conservazione di una coltura madre

Le colture madri possono essere conservate a basse temperature (4-10 °C) per lunghi periodi senza che occorra ristabilirle. Il mezzo di crescita delle *Lemna* può esser identico a quello utilizzato per le prove, ma anche altri mezzi ricchi di nutrienti sono adatti alla colture madri.

Periodicamente alcune giovani piante di color verde-chiaro sono prelevate e trasferite, con una tecnica asettica, in nuovi recipienti di coltura contenenti un mezzo fresco. Alle temperature proposte, le sottocolture possono essere avviate anche ad intervalli di tre mesi.

Occorre utilizzare recipienti di coltura in vetro sterili e chimicamente puliti (lavati con acido) e ricorrere a tecniche di manipolazione asettiche. Se la coltura madre viene contaminata, per esempio da alghe o funghi, si adotteranno le misure necessarie per eliminare gli organismi contaminanti. Per le alghe e la maggior parte degli altri organismi contaminanti basta una sterilizzazione di superficie. A tal fine si preleva un campione delle piante contaminate e si tagliano le radici; in seguito si agita vigorosamente tale materiale in acqua pulita prima di immergerlo in una soluzione di ipoclorito di sodio a 0,5 % (v/v) per un periodo compreso tra 30 secondi e 5 minuti. In seguito si sciacquano le piante con acqua sterile e le si trasferisce, suddivise per lotti, in recipienti di coltura contenenti del mezzo fresco. Molte fronde moriranno dopo questo trattamento, soprattutto se il periodo di esposizione è stato lungo, ma alcune di quelle sopravvissute non saranno più contaminate e potranno essere inoculate in nuove colture.

▼M1

Appendice 3

Mezzi

Si raccomandano mezzi di crescita diversi per *L. minor* e *L. gibba*. Per *L. minor*, una versione modificata del mezzo stabilito dalla norma svedese (SIS) mentre per *L. gibba*, il mezzo 20X — AAP. Le composizioni di questi due mezzi sono riportate qui di seguito. Nella preparazione di questi mezzi occorre utilizzare reattivi e sostanze di grado analitico e acqua deionizzata.

Mezzo di crescita per Lemna istituito in base ad una norma dell'istituto svedese di standardizzazione

— Le soluzioni madre I-V sono sterilizzate in autoclave (120 °C, 15 minuti) o mediante filtrazione su membrana (dimensione dei pori di circa 0,2 μm).

— La soluzione madre VI (ed eventualmente VII) sono sterilizzate solo mediante filtrazione su membrana, non devono essere sottoposte a sterilizzazione in autoclave.

— Le soluzioni madre sterili devono essere conservate al fresco e nell'oscurità. Le soluzioni madre I-V devono essere eliminate dopo sei mesi, mentre la soluzione madre VI (ed eventualmente VII) può essere conservata per un mese.

Soluzione madre n.	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre ($g \cdot l^{-1}$)	Concentrazione nel mezzo preparato ($mg \cdot l^{-1}$)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampone)	490	490	—	—

— Per ottenere un litro del mezzo SIS, aggiungere gli ingredienti seguenti a 900 ml di acqua deionizzata:

— 10 ml di soluzione madre I

— 5 ml di soluzione madre II

— 5 ml di soluzione madre III

— 5 ml di soluzione madre IV

▼M1

— 1 ml di soluzione madre V

— 5 ml di soluzione madre VI

— 1 ml di soluzione madre VII (facoltativo)

NB: Per alcune sostanze di prova può essere necessaria la soluzione madre VII (tampone MOPS) (cfr. l'ultimo paragrafo del punto 1.4).

— Il pH è portato a 6,5 ± 0,2 con 0,1 o 1 mol di HCl o NaOH, e il volume è portato ad un litro con acqua deionizzata.

Mezzo di crescita 20X — AAP

Le soluzioni madre sono preparate in acqua sterile distillata o deionizzata.

Le soluzioni madre sterili devono essere conservate al fresco e nell'oscurità. In queste condizioni le soluzioni madre si possono conservare da 6 a 8 settimane.

Per il mezzo 20X — AAP si preparano cinque soluzioni madri nutrienti (A1, A2, A3, B e C) utilizzando sostanze chimiche di grado reagente. Il mezzo di crescita è composto da 20 ml di ciascuna soluzione madre nutriente aggiunte a circa 850 ml di acqua deionizzata. Il pH è portato a 7,5 ± 0,1 con 0,1 o 1 mol di HCl o NaOH, e il volume è portato ad un litro con acqua deionizzata. Il mezzo è successivamente filtrato con una membrana di 0,2 μm (circa) in un recipiente sterile.

Il mezzo di crescita destinato alle prove deve essere preparato 1 o 2 giorni prima dell'utilizzazione in modo che il suo pH abbia il tempo di stabilizzarsi. Il pH del mezzo di crescita dovrebbe essere controllato prima dell'utilizzo e riequilibrato, se necessario, aggiungendovi, una soluzione di 0,1 o 1 mol di NaOH o HCl come già illustrato.

Soluzione madre n.	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre ($g \cdot l^{-1}$) (1)	Concentrazione nel mezzo preparato ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Salvo indicazione contraria

▼M1

Nota: La concentrazione finale di bicarbonato teoricamente adeguata (che consente di evitare l'adeguamento del pH) è 15 mg/l, non 300 mg/l. Tuttavia il mezzo 20X — AAP è stato sempre utilizzato con una concentrazione di 300 mg/l, anche per il ring-test [I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Mezzo di Steinberg (secondo la norma ISO 20079)

Concentrazioni e soluzioni madre

— Nell'ISO 20079 il mezzo modificato di Steinberg è utilizzato solo per *Lemna minor* (in quanto è la sola ad essere autorizzata nelle prove previste da questa norma) ma alcune prove hanno dimostrato che si possono ottenere buoni risultati anche con *Lemna gibba*.

— Per preparare questo mezzo occorre utilizzare sostanze chimiche di grado reagente e acqua deionizzata.

— Occorre preparare il mezzo nutriente a partire da soluzioni madri (o mezzi con una concentrazione dieci volte superiore) che consentono di raggiungere la massima concentrazione senza precipitazione.

Tabella 1

Mezzo di Steinberg a pH stabilizzato (modificato da Altenburger)

Sostanza		Mezzo nutriente	
Macroelementi	peso molare	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Microelementi	peso molare	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,2	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA diidrato di sodio	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

Tabella 2

Soluzioni madre (macroelementi)

1. **Macroelementi (concentrato 50 volte)**	g/l
Soluzione madre 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzione madre 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzione madre 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzioni madre (microelementi)

2. **Microelementi (concentrato 1 000 volte)**	mg/l
Soluzione madre 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzione madre 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzione madre 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluzione madre 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzione madre 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA diidrato di sodio	1 500,00

— Le soluzioni madre 2 e 3 possono essere mischiate, così come le soluzioni 4 e 7 (tenendo conto delle concentrazioni necessarie).

— Per aumentarne la durata di conservazione, occorre sterilizzare le soluzioni madre in autoclave per 20 minuti a 121 °C o filtrandole in modo sterile su una membrana porosa (0,2 μm). Si consiglia vivamente la sterilizzazione mediante filtrazione (0,2 μm).

Preparazione della concentrazione finale del mezzo di Steinberg (modificato)

— Aggiungere 20 ml delle soluzioni madre 1, 2 e 3 (cfr. tabella 2) a circa 900 ml di acqua deionizzata per impedire la precipitazione.

— Aggiungere 1,0 ml delle soluzioni madre 4, 5, 6, 7 e 8 (cfr. tabella 3).

— Il pH deve essere 5,5 ± 0,2 (adeguare aggiungendo un volume minimo di soluzione di NaOH o di HCl)

▼M1

— Portare a 1 000 ml con acqua

— Se le soluzioni madre sono sterilizzate e si utilizza un'acqua adeguata non è necessaria un'ulteriore sterilizzazione. Se il mezzo finale è sterilizzato, aggiungere la soluzione madre 8 dopo la sterilizzazione in autoclave (a 121 °C per 20 minuti).

Preparazione del mezzo di Steinberg (modificato) concentrato dieci volte per la conservazione intermedia

— Aggiungere 20 ml delle soluzioni madre 1, 2 e 3 (cfr. tabella 2) a circa 30 ml di acqua per impedire la precipitazione.

— Aggiungere 1,0 ml delle soluzioni madre 4, 5, 6, 7 e 8 (cfr. tabella 3). Portare a 100 ml con acqua.

— Se le soluzioni madre sono sterilizzate e si utilizza un'acqua adeguata non è necessaria un'ulteriore sterilizzazione. Se il mezzo finale è sterilizzato, aggiungere la soluzione madre 8 dopo la sterilizzazione in autoclave (a 121 °C per 20 minuti)

— Il pH del mezzo (concentrazione finale) dovrebbe essere 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDE IN ACQUA-SEDIMENTO CON SEDIMENTO ADDIZIONATO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE n. 218 (2004) ed è inteso a valutare gli effetti di un'esposizione prolungata a sostanze chimiche su larve di *Chironomus* sp., un dittero che vive nei sedimenti di acqua dolce. Tiene conto anche dei protocolli per le prove di tossicità su *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* messi a punto in Europa (1) (2) (3) e in Nord America (4) (5) (6) (7) (8) e sottoposti a prove interlaboratorio (1) (6) (9). È possibile utilizzare anche altre specie ben documentate, ad esempio *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Questo metodo prevede che l'esposizione alla sostanza in esame avvenga a mezzo di sedimenti addizionati. La scelta dello scenario d'esposizione dipende dalla finalità della prova. Lo scenario che consiste nell'addizionare i sedimenti con la sostanza in esame è inteso a simulare il persistere di livelli cumulativi della sostanza. In questo sistema sperimentale sedimento-acqua è il sedimento ad essere addizionato.

3. In genere le sostanze da saggiare su organismi che vivono nei sedimenti persistono a lungo in questo comparto. Questi organismi possono essere esposti per diverse vie. L'importanza relativa di ogni via d'esposizione e il tempo impiegato da ciascuna di esse per contribuire all'effetto tossico globale dipendono dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame. Per le sostanze fortemente adsorbenti (ad esempio, con log K_{ow} > 5) oppure per le sostanze che si legano in modo covalente al sedimento, l'ingestione di alimenti contaminati può costituire una via d'esposizione importante. Per non sottovalutare la tossicità delle sostanze altamente lipofile, si può considerare l'opportunità di aggiungere alimenti al sedimento prima di applicare la sostanza in esame. Il presente metodo, per tenere conto di tutte le possibili vie di esposizione, prevede un'esposizione a lungo termine: la prova dura da 20 a 28 giorni per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, e da 28 a 65 giorni per *C. tentans*. Se occorrono dati a breve termine per un fine specifico, ad esempio studiare gli effetti di una sostanza chimica instabile, è possibile ritirare dopo dieci giorni di prova le repliche supplementari allestite nell'ambito dello stesso impianto sperimentale.

4. Gli endpoint misurati sono il numero totale di adulti comparsi e il tempo intercorso fino alla loro comparsa. Se occorrono dati a breve termine, si consiglia di effettuare dopo dieci giorni le misurazioni relative alla sopravvivenza e alla crescita delle larve, utilizzando le eventuali repliche supplementari.

5. Si raccomanda di usare un sedimento artificiale, che presenta numerosi vantaggi rispetto a quello naturale:

   — riduce la variabilità sperimentale in quanto costituisce una «matrice standardizzata» riproducibile, ed elimina la necessità di trovare delle fonti di sedimenti pulite e incontaminate,

   — consente di effettuare le prove in qualsiasi momento dell'anno, senza che occorra tenere conto della variabilità stagionale dei sedimenti, e non richiede di essere trattato prima delle prove per eliminare la fauna indigena; riduce inoltre i costi associati alla raccolta sul terreno di quantità sufficienti di sedimento per le prove di routine,

   — è possibile mettere a confronto e classificare le sostanze in base alla loro tossicità.

6. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

▼M4

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Si espongono dei chironomidi al primo stadio larvale a un intervallo di concentrazioni della sostanza in esame in un sistema sedimento-acqua. La sostanza in esame è aggiunta al sedimento e le larve al primo stadio vengo in seguito introdotte nei becher dove le concentrazioni sedimento-acqua sono state stabilizzate. Le percentuali di emergenza e crescita dei chironomidi sono misurate alla fine della prova. La sopravvivenza e il peso delle larve possono essere misurati anche dopo 10 giorni, se necessario (utilizzando le eventuali repliche supplementari). Questi dati sono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x dell'emergenza, della sopravvivenza o della crescita delle larve (ad esempio CE_{15}, CE_{50} ecc.), oppure mediante verifica di un'ipotesi statistica per determinare un valore NOEC/LOEC. Nel secondo caso occorre confrontare i valori degli effetti con i valori di controllo per mezzo di prove statistiche.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

8. È necessario conoscere l'idrosolubilità e la tensione di vapore della sostanza in esame, il coefficiente di ripartizione misurato o calcolato nel sedimento e la sua stabilità nell'acqua e nel sedimento. Occorre inoltre disporre di un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza in esame nell'acqua sovrastante, nell'acqua interstiziale e nel sedimento, di cui devono essere noti e riportati nella relazione l'accuratezza e il limite di rivelabilità. È anche utile conoscere la formula strutturale e la purezza della sostanza in esame, come pure il suo destino chimico (ad esempio, dissipazione, degradazione abiotica e biotica ecc.). Ulteriori orientamenti per saggiare le sostanze con caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione delle prove sono contenuti in (12).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

9. Per assicurarsi che il protocollo e le condizioni di prova siano affidabili si possono saggiare regolarmente delle sostanze di riferimento. Tra i tossici di riferimento utilizzati con successo in prove interlaboratorio e studi di validazione vi sono: lindano, trifluralin, pentaclorofenolo, cloruro di cadmio e cloruro di potassio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÀ DELLA PROVA

10. Perché il test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— l'emergenza nei controlli deve arrivare almeno al 70 % alla fine del test (1) (6),

— per quanto riguarda *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, l'emergenza allo stadio adulto nei recipienti di controllo deve avvenire tra i 12 e i 23 giorni successivi alla loro introduzione nei recipienti; per *C. tentans* il periodo va da 20 a 65 giorni,

— alla fine della prova, si devono misurare il pH e la concentrazione dell'ossigeno disciolto in ogni recipiente. La concentrazione dell'ossigeno deve essere almeno il 60 % del suo valore di saturazione in aria (ASV) alla temperatura applicata e il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6 e 9 in tutti i recipienti di prova,

— la temperatura dell'acqua non deve variare di oltre ± 1.0 °C e può essere regolata per mezzo di un camera isotermica, nel qual caso la temperatura ambiente dovrà essere periodicamente confermata, a congrui intervalli di tempo.

▼M4

DESCRIZIONE DEL METODO

Recipienti di prova

11. Lo studio è condotto in becher di vetro da 600 ml, di 8 cm di diametro. Possono essere utilizzati anche altri recipienti, purché garantiscano profondità sufficiente ad accogliere il sedimento e l'acqua sovrastante. La superficie del sedimento deve essere tale da offrire uno spazio da 2 a 3 cm^2 per larva. La profondità dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua sovrastante devono essere in un rapporto di 1:4. I recipienti e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con il sistema di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte (ad esempio Teflon).

Selezione delle specie

12. La specie che conviene utilizzare per la prova è *Chironomus riparius*. Si può utilizzare anche C*hironomus tentans*, anche se è più difficile da manipolare e richiede un periodo di prova più lungo. Si può utilizzare anche *Chironomus yoshimatsui*. Metodi di coltura di *Chironomus riparius* figurano nell'appendice 2. Sono reperibili informazioni anche sulle condizioni di coltura delle altre specie: *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). Occorre identificare la specie prima dell'avvio della sperimentazione, ma non è necessario farlo prima di ogni singola prova se gli organismi sono stati coltivati dal laboratorio che esegue la sperimentazione.

Sedimento

13. Utilizzare di preferenza sedimento artificiale (detto anche sedimento formulato). Se si sceglie di utilizzare un sedimento naturale, occorre caratterizzarlo, almeno quanto a pH e tenore di carbonio organico (la determinazione di altri parametri, come il rapporto C/N e la granulometria è altrettanto raccomandata), e assicurarsi che sia esente da ogni contaminazione e da altri organismi che potrebbero entrare in competizione con i chironomidi o consumarli. Prima di impiegare un sedimento naturale in una prova di tossicità su chironomidi, si consiglia inoltre di farlo riposare per sette giorni alle stesse condizioni in cui verrà realizzata la prova. Per questo test si consiglia di utilizzare il sedimento artificiale basato su quello di cui al metodo di prova C.8 (14) e costituito secondo la seguente formula (1) (15) (16):

a) 4-5 % (peso secco) di torba, con pH più vicino possibile a 5,5-6,0. È importante utilizzare torba sotto forma di polvere, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata unicamente all'aria;

b) 20 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);

c) 75-76 % (peso secco) di sabbia quarzosa (composta in prevalenza da sabbia fine, con oltre il 50 % delle particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 μm);

d) aggiunta di acqua deionizzata fino ad ottenere un tenore di umidità totale della miscela compreso tra 30 e 50 %;

e) aggiunta di carbonato di calcio di qualità chimicamente pura ($CaCO_3$) per aggiustare il pH della miscela finale a 7,0 ± 0,5. Il tenore di carbonio organico della miscela finale dovrà essere del 2 % (± 0,5 %), ottenuto aggiungendo le dovute quantità di torba e sabbia, come indicato in a) e c).

14. La provenienza di torba, argilla caolinica e sabbia deve essere nota. Occorre verificare che i componenti del sedimento non siano contaminati da sostanze chimiche (es.: metalli pesanti, composti organoclorurati o organo fosforati ecc.). L'appendice 3 contiene un esempio per la preparazione del sedimento artificiale. È possibile mescolare componenti secchi, se si può dimostrare che con l'aggiunta di acqua sovrastante non si verifica alcuna separazione dei componenti del sedimento (es. particelle di torba che galleggiano) e che la torba o il sedimento sono sufficientemente condizionati.

▼M4

Acqua

15. Le acque che presentano le caratteristiche chimiche indicate alle appendici 2 e 4 sono considerate adatte per le prove. È possibile utilizzare come acqua di allevamento e acqua di prova ogni tipo di acqua idonea, quali acqua naturale (di superficie o freatica), ricostituita (cfr. appendice 2) o di rubinetto non clorata, se i chironomidi riescono a sopravvivervi per la durata della coltura e della prova senza manifestare segni di stress. All'inizio della prova, il pH dell'acqua di prova dev'essere compreso tra 6 e 9 e la durezza totale non dev'essere superiore a 400 mg/l (come $CaCO_3$). Utilizzare, però, un'acqua meno dura se si sospetta il rischio di un'interazione tra gli ioni che provocano la durezza e la sostanza in esame (nel qual caso il mezzo Elendt M4 non può essere usato). Utilizzare lo stesso tipo di acqua nel corso di tutta la prova. Misurare le caratteristiche della qualità dell'acqua elencate nell'appendice 4 almeno due volte l'anno o quando si sospetta che possano essere cambiate significativamente.

Soluzioni madre — sedimenti addizionati

16. I sedimenti addizionati — alla concentrazione desiderata — vengono generalmente preparati aggiungendo una soluzione della sostanza in esame direttamente al sedimento. La soluzione madre della sostanza in esame dissolta in acqua deionizzata viene mescolata con il sedimento artificiale ricorrendo a un laminatoio, a un miscelatore per mangimi oppure a mano. Se scarsamente solubile in acqua, la sostanza in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un solvente organico idoneo (per esempio esano, acetone, cloroformio). La soluzione ottenuta va poi mischiata con 10 g di sabbia quarzosa fine per ciascun recipiente di prova. Il solvente va lasciato evaporare e deve essere completamente eliminato dalla sabbia; la sabbia va poi mescolata alla quantità di sedimento necessaria per un becher. Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Occorre tener conto, al momento di preparare il sedimento, della sabbia contenuta nella sostanza in esame e nella miscela di sabbia (il sedimento, quindi, va preparato utilizzando meno sabbia). Fare attenzione a che la sostanza in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno. Se necessario, analizzare dei sottocampioni per verificare il grado di omogeneità.

DISEGNO SPERIMENTALE

17. Il disegno comprende la selezione del numero delle concentrazioni di prova, e dell'intervallo fra esse, del numero di recipienti per ciascun livello di concentrazione e del numero di larve per recipiente. È qui descritto il procedimento da seguire per la stima puntuale della CE, la stima della NOEC e per l'esecuzione di una prova limite.

Disegno per l'analisi di regressione

18. La concentrazione che determina un effetto (ad esempio CE_{15}, CE_{50}) e l'intervallo di concentrazioni alle quali la sostanza in esame produce un effetto interessante devono essere contemplati dalle concentrazioni incluse nella prova. In genere la precisione e, in particolare, la validità della stima delle concentrazioni con effetto (CE_X) saranno maggiori quando la concentrazione con effetto rientra nell'intervallo di concentrazioni da testare. Bisogna evitare di estrapolare risultati molto al di sotto della concentrazione efficace più debole o al di sopra della concentrazione massima. È utile condurre una prova preliminare di determinazione dell'intervallo di concentrazioni per delimitare le concentrazioni su cui imperniare la prova (cfr. paragrafo 27).

▼M4

19. Se si deve stimare la CE_X occorre saggiare almeno cinque concentrazioni, allestendo tre repliche per ciascuna concentrazione. In ogni caso, per ottenere una buona stima del modello, è consigliabile utilizzare un numero sufficiente di concentrazioni. Il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere maggiore di due (salvo nel caso in cui la curva dose/risposta sia poco accentuata). Il numero di repliche per trattamento può essere diminuito se si aumenta il numero di concentrazioni che danno risposte diverse. L'aumento del numero di repliche o la riduzione degli intervalli tra le concentrazioni tendono a ridurre gli intervalli di confidenza per la prova. Il numero delle repliche sarà maggiore se si deve stimare la percentuale di sopravvivenza e la crescita delle larve dopo 10 giorni.

Disegno per la stima di una NOEC/LOEC

20. Se occorre stimare la LOEC o la NOEC si saggeranno cinque concentrazioni con almeno quattro repliche, e il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere superiore a due. Il numero di repliche deve essere tale da garantire una potenza statistica che consenta di rilevare una differenza del 20 % con l'unità di controllo, a un grado di significatività statistica del 5 % ($p = 0,05$). Per quanto riguarda la velocità di sviluppo, è in genere appropriata un'analisi della varianza (ANOVA), come ad esempio il test di Dunnett o il test di Williams (17) (18) (19) (20). Per il tasso di emergenza si può utilizzare il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione secondo Bonferroni) o il test di Mantel-Haenszel.

Prova limite

21. Se la prova preliminare di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni non ha prodotto alcun effetto, si può condurre una prova limite (una concentrazione di prova e un controllo). Lo scopo della prova limite è quello di condurre un test con una concentrazione sufficientemente alta da consentire ai responsabili delle decisioni di escludere eventuali effetti tossici della sostanza in esame; il limite va fissato a una concentrazione la cui comparsa è improbabile in tutte le situazioni. Si raccomanda un rapporto di 1 000 mg/kg (peso secco). Di norma è necessario allestire sei repliche sia per gli organismi trattati che per quelli di controllo. Occorre dimostrare che la potenza statistica è sufficiente per rilevare una differenza del 20 % con gli organismi di controllo, a un grado di significatività statistica del 5 % ($p = 0,05$). Per quanto concerne la risposta in termini di velocità di sviluppo e peso, il test t costituisce un metodo statistico adatto se i dati rispettano le condizioni imposte da questo test (normalità, varianze omogenee). In caso contrario, si può ricorrere al test t per varianze disuguali o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whithey. Quanto al tasso di emergenza, il test esatto di Fisher è appropriato.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

Preparazione del sistema sedimento addizionato-acqua

22. Per l'applicazione della sostanza in esame (14), si raccomanda l'uso del processo di addizione descritto nel metodo di prova C.8: Tossicità per i lombrichi. I sedimenti addizionati vengono posti nei recipienti e viene aggiunta acqua sovrastante per produrre un rapporto volumetrico sedimento-acqua di 1:4 (cfr. paragrafi 11 e 15). La profondità dello strato sedimentario dev'essere tra 1,5 e 3 cm. Per evitare la separazione degli ingredienti del sedimento e la risospensione delle particelle fini durante l'aggiunta dell'acqua, si può ricoprire il sedimento con un disco di plastica durante l'operazione di riempimento della colonna d'acqua, per poi ritirarlo a operazione completata. Possono essere utilizzati anche altri dispositivi.

23. I recipienti così allestiti devono essere coperti (ad esempio, da piastre di vetro). Nel corso della prova si provvederà, se necessario, ad aggiungere l'acqua necessaria a mantenere il volume originario per compensare l'evaporazione, avendo cura di utilizzare acqua distillata o deionizzata per evitare l'accumulo di sali.

▼M4

Stabilizzazione

24. Una volta che il sedimento addizionato sovrastato da uno strato d'acqua è stato preparato, è preferibile lasciare che la sostanza in esame si ripartisca tra la fase acquosa e il sedimento (3) (4) (6) (13); di preferenza, ciò dovrebbe avvenire nelle stesse condizioni di temperatura e aerazione utilizzate nella prova. Il tempo di equilibratura può durare alcune ore, dei giorni o, in rari casi, fino a 4 o 5 settimane, a seconda del sedimento e della sostanza chimica. Non occorre attendere il raggiungimento dell'equilibrio, perché molte sostanze rischiano di degradarsi nel corso di questo periodo, ma è raccomandato un tempo di attesa di 48 ore. Al termine di questo periodo di equilibratura, occorre misurare la concentrazione della sostanza in esame nell'acqua sovrastante, nell'acqua interstiziale e nel sedimento, almeno alla concentrazione massima e a una più bassa (cfr. paragrafo 38). Tali misurazioni analitiche della sostanza in esame consentono di calcolare il bilancio di massa e di esprimere i risultati in funzione delle concentrazioni misurate.

Introduzione degli organismi di prova

25. Quattro o cinque giorni prima di introdurre gli organismi nei recipienti, si prelevano dalle colture ammassi di uova e le si depositano in recipienti piccoli con il mezzo di coltura. Si può utilizzare il mezzo vecchio prelevato dalla coltura madre o un mezzo fresco. In quest'ultimo caso, si aggiunge una piccola quantità di cibo, ad esempio alghe verdi e/o qualche goccia di filtrato di una sospensione di mangime per pesci in fiocchi (cfr. appendice 2). Si devono utilizzare solo ammassi di uova appena deposti. Di solito le larve compaiono qualche giorno dopo la deposizione delle uova (da 2 a 3 giorni per *Chironomus riparius* a 20 ºC e da 1 a 4 giorni per *Chironomus tentans* a 23 ºC e *Chironomus yoshimatsui* a 25 ºC) e la loro crescita avviene in quattro stadi, ciascuno di una durata compresa tra 4 e 8 giorni. Questa prova si applica al primo stadio larvale (2-3 oppure 1-4 giorni dopo la schiusa). È possibile verificare lo stadio di sviluppo dei moscerini in base alle dimensioni della capsula cefalica (6).

26. In ciascun recipiente contenente il sedimento addizionato e l'acqua si depositano, per mezzo di una pipetta smussata, venti larve al primo stadio scelte a caso. L'aerazione dell'acqua deve essere interrotta per 24 ore dal momento dell'introduzione delle larve nei recipienti (cfr. paragrafi 24 e 32). In base al disegno sperimentale adottato (cfr. paragrafi 19 e 20), il numero di larve utilizzate per concentrazione è almeno 60 per la stima puntuale della CE e 80 per la determinazione della NOEC.

Concentrazioni di prova

27. Può essere utile effettuare una prova preliminare per determinare la gamma delle concentrazioni per la prova vera e propria. A tal fine si utilizza una serie di concentrazioni della sostanza in esame molto intervallate tra loro. Applicando la stessa densità superficiale di chironomidi prevista per la prova vera e propria, i chironomidi sono esposti ad ogni concentrazione della sostanza in esame per un periodo che consenta di stimare le concentrazioni di prova adeguate e non è necessaria alcuna replica.

28. Le concentrazioni di prova per la prova vera e propria sono decise in funzione dell'esito del saggio di determinazione dell'intervallo di concentrazione. Occorre saggiare almeno cinque concentrazioni, scelte in base a quanto indicato nei paragrafi 18-20.

▼M4

Controlli

29. La prova prevede l'allestimento di recipienti di controllo, senza la sostanza in esame ma con il sedimento, e un congruo numero di repliche (cfr. paragrafi 19-20). Se la sostanza in esame è stata applicata mediante un solvente (cfr. paragrafo 16), si deve aggiungere un recipiente di controllo che contenga sedimento e solvente.

Sistema di prova

30. Si impiegano sistemi statici. I sistemi semistatici oppure a flusso, con rinnovo intermittente o continuo dell'acqua sovrastante, possono essere utilizzati in casi eccezionali, ad esempio se le specifiche della qualità dell'acqua diventano inadeguate per gli organismi in esame oppure influiscono sull'equilibrio chimico (nel caso in cui, ad esempio, i livelli di ossigeno disciolto si abbassino troppo, la concentrazione degli escreti aumenti eccessivamente o i minerali prodotti dalla lisciviazione del sedimento alterino il pH e/o la durezza dell'acqua). È tuttavia sufficiente e preferibile ricorrere ad altri metodi di miglioramento della qualità dell'acqua sovrastante, come l'areazione.

Cibo

31. Le larve devono essere nutrite, di preferenza ogni giorno o almeno tre volte la settimana. Durante i primi 10 giorni la dieta giornaliera ritenuta adeguata per le larve in questo stadio consiste in 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg per *C. yoshimatsui*) pro capite di mangime per pesci (sospensione acquosa o finemente macinato, del tipo Tetra-Min o Tetra-Phyll; cfr. appendice 2). Può essere necessario aumentare leggermente la dose per le larve più vecchie: 0,5-1 mg per larva al giorno dovrebbe essere sufficiente per il resto della prova. Si diminuirà la razione di mangime di tutti gli organismi trattati e dei controlli se si osserva la comparsa di funghi o il decesso di organismi di controllo. Se non si riesce ad arrestare lo sviluppo fungino occorre ripetere la prova. Se la prova verte su sostanze fortemente adsorbenti (ad esempio, con log $K_{ow} > 5$) o sostanze che si legano in modo covalente al sedimento, la quantità di cibo necessaria alla sopravvivenza e alla crescita naturale degli organismi può essere incorporata al sedimento artificiale prima del periodo di stabilizzazione. In tal caso il mangime per pesci è sostituito con alimenti vegetali, ad esempio 0,5 % (peso secco) di foglie finemente macinate di ortica (*Urtica dioica*), gelso (*Morus alba*), trifoglio bianco (*Trifolium repens*), spinacio (*Spinacia oleracea*) o di altro materiale vegetale (*Cerophyl* o alfa cellulosa).

Condizioni di incubazione

32. L'acqua sovrastante dei recipienti è sottoposta a una moderata aerazione, di preferenza a partire da 24 ore dopo l'introduzione delle larve e fino alla fine della prova (avendo cura che la concentrazione di ossigeno disciolto non scenda sotto il 60 % del valore di saturazione dell'aria). L'aria è insufflata tramite pipette Pasteur in vetro fissate a 2-3 cm sopra lo strato di sedimento (nella misura di una o poche bolle al secondo). Se la sostanza in esame è volatile, va eventualmente considerato di sopprimere l'aerazione.

33. La prova è effettuata a una temperatura costante di 20 °C (± 2 °C). Per *C. tentans* e *C. yoshimatsui* la temperatura consigliata è, rispettivamente, di 23 °C e 25 °C (± 2 °C). Il fotoperiodo è di 16 ore e l'intensità luminosa compresa tra 500 e 1 000 lux.

▼M4

Durata dell'esposizione

34. L'esposizione ha inizio con l'introduzione delle larve nei recipienti trattati e di controllo. La prova dura 28 giorni per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, e 65 giorni per *C. tentans*. Se i moscerini emergono prima, la prova può concludersi dopo almeno cinque giorni dall'emergenza dell'ultimo adulto di controllo.

Osservazioni

Emergenza

35. Si deve determinare il tempo di sviluppo e il numero totale di moscerini maschi e femmine adulti completamente emersi. I maschi si distinguono facilmente perché dotati di antenne piumate.

36. I recipienti vanno osservati almeno tre volte la settimana, per verificare che non presentino attività anomala (abbandono del sedimento, movimenti natatori insoliti ecc.) rispetto a quelli di controllo. Durante il periodo della prevista emergenza è necessario contare tutti i giorni i moscerini emersi e registrare il sesso e il numero di quelli completamente emersi. Una volta identificati, i moscerini sono tolti dai recipienti. Ogni ammasso di uova deposto prima della fine della prova deve essere registrato e poi tolto per impedire l'introduzione di nuove larve nel sedimento. Va registrato anche il numero delle pupe visibili che non sono riuscite ad emergere. L'appendice 5 contiene indicazioni su come misurare l'emergenza.

Crescita e sopravvivenza

37. Se occorre rilevare i dati sulla sopravvivenza e la crescita della larve dopo 10 giorni, si allestiscono recipienti supplementari all'inizio della prova da usare successivamente. Il sedimento di questi recipienti supplementari è setacciato con un setaccio da 250 μm per trattenere le larve. La morte è determinata da due criteri: l'immobilità o l'assenza di reazione a uno stimolo meccanico. Anche le larve non recuperate devono essere contate tra i decessi (è possibile che le larve morte all'inizio della prova siano state degradate da microbi). Dopo avere determinato il peso secco (senza ceneri) delle larve sopravvissute per ogni recipiente, si calcola il peso secco individuale medio per recipiente. Per determinare a quale stadio si trovano le larve sopravvissute si possono misurare le dimensioni della capsula cefalica di ogni individuo.

Misurazioni analitiche

Concentrazione della sostanza in esame

38. Prima di iniziare la prova (cioè prima di introdurre le larve), occorre prelevare campioni di sedimento da almeno uno dei recipienti per ciascun trattamento, per determinare analiticamente la concentrazione nel sedimento della sostanza in esame. Occorre analizzare, come minimo, dei campioni dell'acqua sopranatante, dell'acqua interstiziale e del sedimento all'inizio della prova (cfr. paragrafo 24) e alla fine, e ciò per la concentrazione massima e per una più bassa. La concentrazione della sostanza in esame ci informa sul comportamento/ripartizione della sostanza nel sistema acqua-sedimento.

39. Quando si effettuano misurazioni intermedie (ad esempio, al settimo giorno) e se l'analisi richiede campioni voluminosi che non possono essere prelevati dai recipienti senza influire sull'impianto sperimentale, le determinazioni analitiche sono praticate su campioni prelevati da recipienti supplementari trattati allo stesso modo (anche contenenti organismi di prova) ma non utilizzati per le osservazioni biologiche.

▼M4

40. Per isolare l'acqua interstiziale si raccomanda di centrifugare i campioni, ad esempio, a 10 000 g e a 4ºC per 30 minuti. Se però è dimostrato che la sostanza in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione. In alcuni casi, se i campioni sono troppo piccoli, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.

Parametri fisici e chimici

41. Il pH e la temperatura dei recipienti devono essere debitamente misurati (cfr. paragrafo 10). All'inizio e alla fine della prova è necessario misurare la durezza dell'acqua e il tenore di ammoniaca nei controlli e in un recipiente trattato alla concentrazione massima.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

42. Scopo di questa prova è determinare l'effetto della sostanza in esame sulla velocità di sviluppo e sul numero totale di moscerini moscerini maschi e femmine adulti completamente emersi oppure, nel caso della prova a 10 giorni, gli effetti sulla sopravvivenza e sul peso delle larve. Se nulla indica che i due sessi presentano differenze statistiche di sensibilità, ai fini dell'analisi statistica i risultati ottenuti sui maschi e sulle femmine possono essere raggruppati. Le differenze di sensibilità tra i sessi possono essere valutate statisticamente tramite, ad esempio, il test χ^2-r x 2. La sopravvivenza delle larve e il peso secco individuale medio per recipiente devono essere determinati dopo 10 giorni, se del caso.

43. Le concentrazioni con effetto espresse (basate sul peso secco), sono calcolate di preferenza sulla base delle concentrazioni dei sedimenti misurate all'inizio della prova (cfr. paragrafo 38).

44. Per effettuare una stima puntuale della CE_{50} o di qualsiasi altra CE_X, le statistiche per recipiente possono essere usate alla stregua di repliche. Quando si calcola un intervallo di confidenza per una qualsiasi CE_X occorre tener conto della variabilità tra i recipienti oppure dimostrare che tale variabilità è di entità trascurabile. Quando il modello è adattato mediante il metodo dei minimi quadrati, è necessario trasformare le statistiche per recipiente al fine di aumentare l'omogeneità della varianza. I valori della CE_X devono però essere calcolati dopo che il risultato è stato ritrasformato nel suo valore originario.

45. Se l'analisi statistica mira a determinare la NOEC/LOEC mediante verifica di un'ipotesi, la variabilità tra i recipienti deve essere presa in considerazione, ad esempio mediante un'analisi ANOVA gerarchica. In situazioni dove non sussistono tutti i consueti presupposti per l'ANOVA si possono invece utilizzare test più robusti (21).

Tasso di emergenza

46. I tassi di emergenza sono dati di tipo quantale e possono essere analizzati con il test di Cochran-Armitage applicato in modo regressivo se si ipotizza un rapporto dose-risposta monotonico e i tassi di emergenza corroborano questa ipotesi. In caso contrario, si può utilizzare un test esatto di Fisher o un test di Mantel-Haenszel con correzione dei valori p secondo Bonferroni-Holm. Se si osserva che la variabilità tra le repliche alla stessa concentrazione è maggiore di quanto una distribuzione binomiale indicherebbe (variazione spesso denominata «extrabinomiale»), si applicherà un test più robusto (Cochran-Armitage o Fisher esatto) come proposto alla nota (21).

▼M4

Si determina la somma dei moscerini emersi per recipiente (n_e) e la si divide per il numero di larve introdotte (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

dove:

ER = tasso di emergenza

n_e = numero di moscerini emersi per recipiente

n_a = numero di larve introdotte per recipiente

47. Un'alternativa più adatta ai campioni di grandi dimensioni, in presenza di varianza extrabinomiale, consiste nel trattare il tasso di emergenza come una risposta continua e adottare procedure quali il test di William, se si ipotizza che il rapporto dose-risposta sia monotonico e se i dati del tasso di emergenza corroborano tale ipotesi. Conviene utilizzare il test di Dunnett quando l'ipotesi di monotonicità è infondata. Ai fini di questa analisi un campione è considerato di grandi dimensioni quando il numero di moscerini emersi e il numero dei non emersi sono entrambi superiori a cinque per replica.

48. Prima di applicare i metodi ANOVA, occorre dapprima trasformare i valori del tasso di emergenza (ER) per la radice quadrata dell'arcoseno oppure secondo Freeman-Tukeylper ottenere una distribuzione prossima a quella normale e livellare le varianze. Il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione Bonferroni) oppure il test di Mantel-Haenszel possono essere impiegati quando si utilizzano delle frequenze assolute. La trasformazione con la radice quadrata dell'arcoseno consiste nel calcolare la funzione inversa del seno ($seno^{-1}$) della radice quadrata del tasso di emergenza (ER).

49. Per i tassi di emergenza, i valori della CE_X sono calcolati con un'analisi di regressione [oppure probit (22), logit, Weibull, appositi software commerciali ecc.]. Se l'analisi di regressione è inconcludente (ad esempio, quando vi sono meno di due risposte parziali), si fa ricorso ad altri metodi non parametrici quali la media mobile o una semplice interpolazione.

Velocità di sviluppo

50. Il tempo medio di sviluppo è il tempo medio intercorso tra l'introduzione delle larve (giorno 0 della prova) e l'emergenza della coorte sperimentale di moscerini (per calcolare il tempo reale di sviluppo si deve tenere conto dell'età delle larve al momento dell'introduzione). La velocità di sviluppo è inversamente proporzionale al tempo di sviluppo (unità: 1/giorno) e consiste nella parte di sviluppo larvale che avviene quotidianamente. Per valutare la tossicità nei sedimenti si preferisce far riferimento alla velocità di sviluppo perché, rispetto al tempo di sviluppo, ha una varianza più bassa e valori più omogenei e più prossimi a una distribuzione normale. È anche per questo che si possono applicare test parametrici potenti, più adatti alla velocità di sviluppo che al tempo di sviluppo. Se la velocità di sviluppo è trattata come risposta continua, i valori della CE_X possono essere stimati avvalendosi dell'analisi di regressione [ad esempio (23) (24)].

51. Per i test statistici seguenti, il numero di moscerini osservati il giorno x è considerato essere emerso a metà dell'intervallo tra il giorno x e il giorno x - 1 (l = lunghezza dell'intervallo di osservazione, di solito 1 giorno). La velocità media di sviluppo per recipiente (x) è calcolata come segue:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

dove:

$\bar{x}$: velocità media di sviluppo per recipiente

i: indice dell'intervallo di osservazione

m: numero massimo di intervalli di osservazione

f_i: numero di moscerini emersi nell'intervallo di osservazione i

n_e: numero totale di moscerini emersi alla fine dell'esperimento (= $\sum f_i$)

x_i: velocità di sviluppo dei moscerini emersi nell'intervallo i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

dove:

day_i: giorno dell'osservazione (contato a partire dall'applicazione)

l_i: lunghezza dell'intervallo d'osservazione i (espressa in giorni, di solito 1 giorno)

Relazione sulla prova

52. La relazione sulla prova deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

— natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (idrosolubilità, tensione di vapore, coefficiente di ripartizione nel suolo (o nel sedimento, se disponibile), stabilità nell'acqua ecc.),

— dati di identificazione chimica (nome comune, nome chimico, formula strutturale, numero CAS ecc.) compresi purezza e metodo di analisi per la quantificazione della sostanza in esame.

Specie in esame:

— animali utilizzati: specie, nome scientifico, provenienza degli organismi e condizioni di allevamento,

— informazioni sulla manipolazione degli ammassi di uova e delle larve,

— età degli animali al momento della loro introduzione nei recipienti di prova.

Condizioni sperimentali:

— sedimento utilizzato (specificare se naturale o artificiale),

— se il sedimento è naturale: ubicazione e descrizione del sito di campionamento del sedimento e, se possibile, cronistoria della contaminazione; caratteristiche: pH, tenore di carbonio organico, rapporto C/N e granulometria (se del caso).

— preparazione del sedimento artificiale: ingredienti e caratteristiche (tenore di carbonio organico, pH, tenore di umidità ecc., all'inizio della prova),

— preparazione dell'acqua per la prova (se l'acqua è ricostituita) e caratteristiche (concentrazione dell'ossigeno, pH, conduttività, durezza ecc., all'inizio della prova),

— spessore del sedimento e profondità dell'acqua sovrastante,

— volume dell'acqua sovrastante e dell'acqua interstiziale; peso del sedimento umido, con acqua interstiziale e senza,

▼M4

— recipienti di prova (materiale e dimensioni),

— metodo per l'addizione della sostanza al sedimento: concentrazioni utilizzate nella prova, numero di repliche e, se del caso, solventi utilizzati,

— fase di stabilizzazione del sistema sedimento addizionato-acqua: durata e condizioni,

— condizioni di incubazione: temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa, aerazione (frequenza e intensità),

— informazioni dettagliate sull'alimentazione, che comprendono il tipo di mangime, la preparazione, la quantità e il regime di alimentazione.

Risultati:

— concentrazioni di prova, nominali e concentrate, e risultati di tutte le analisi condotte per determinare la concentrazione della sostanza in esame nel recipiente di prova,

— qualità dell'acqua nei recipienti di prova, ossia pH, temperatura, ossigeno disciolto, durezza e ammoniaca,

— aggiunta di acqua per sostituire quella eventualmente evaporata,

— numero di moscerini maschi e femmine emersi, per ciascun recipiente e ciascun giorno,

— numero di larve non emerse come moscerini, per recipiente,

— peso secco individuale medio delle larve, per recipiente e, se del caso, per stadio larvale,

— percentuale di emergenza per replica e per concentrazione (risultati raggruppati per moscerini maschi e femmine),

— velocità media di sviluppo dei moscerini completamente emersi, per replica e per concentrazione somministrata (risultati raggruppati per moscerini maschi e femmine),

— stime degli endpoint di tossicità, ad esempio per CE_X (e relativi intervalli di confidenza), NOEC e/o LOEC, nonché metodi statistici utilizzati per determinarli,

— discussione dei risultati comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canadàs biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCSE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

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

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

Sedimento artificiale: sintetico o formulato, miscela di materiali utilizzati per simulare le componenti fisiche di un sedimento naturale.

Acqua sovrastante: acqua posta sopra il sedimento nel recipiente di prova.

Acqua interstiziale: acqua che occupa lo spazio tra il sedimento e le particelle di terreno.

Sedimento addizionato: sedimento al quale è stata aggiunta la sostanza in esame.

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

▼M4

Appendice 2

Indicazioni per l'allevamento di *Chironomus riparius*

1. Le larve di *Chironomus* possono essere allevate in cristallizzatori o in grandi recipienti. Il fondo del recipiente è ricoperto di un sottile strato di sabbia di quarzo dello spessore di circa 5-10 mm. Anche il Kieselguhr (ad esempio l'articolo 8117 di Merck) ha dato prova di essere un substrato idoneo (nel qual caso ne basta uno strato ancora più sottile, di pochi millimetri). Si aggiunge acqua di qualità adeguata ad un'altezza di vari centimetri, avendo cura di mantenere questo livello iniziale aggiungendo acqua in caso di evaporazione per prevenire il disseccamento. L'acqua può essere rinnovata completamente, se necessario. Fornire un'aerazione moderata. I recipienti di allevamento devono essere situati in apposite gabbie per impedire la fuga degli adulti emergenti. La gabbia dev'essere sufficientemente grande per consentire agli adulti emersi di sfarfallare, condizione imprescindibile per la copulazione (dimensioni minime: 30 × 30 × 30 cm).

2. Le gabbie devono essere tenute a temperatura ambiente, oppure a una temperatura costante di 20 ± 2 °C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce (a un'intensità luminosa di circa 1 000 lux) e 8 ore di buio. Secondo le informazioni disponibili, un'umidità relativa dell'aria inferiore a 60 % può impedire la riproduzione.

Acqua di diluizione

3. Può essere utilizzata qualsiasi acqua naturale o sintetica di qualità adeguata. Normalmente viene utilizzata acqua di pozzo, acqua di rubinetto non clorata e mezzi artificiali (come Elendt M4 o M7, si veda di seguito). L'acqua deve essere aerata prima dell'uso. Se necessario, si può rinnovare l'acqua di allevamento versando o sifonando l'acqua usata dai recipienti, facendo attenzione a non distruggere i tubi delle larve.

Alimentazione delle larve

4. Le larve di *Chironomus* sono nutrite con mangime per pesci in fiocchi (Tetra Min®, Tetra Phyll® o altra marca registrata equivalente), in dose giornaliera di circa 250 mg per recipiente. Il mangime può essere somministrato sotto forma di polvere macinata secca o sospensione acquosa: si aggiunge 1,0 g di fiocchi a 20 ml di acqua di diluizione e si agita la miscela per renderla omogenea. La dieta a base di questo preparato consiste in 5 ml al giorno per recipiente (agitare prima dell'uso). La dose può essere più abbondante per le larve più vecchie.

5. L'alimentazione è adattata in funzione della qualità dell'acqua. Se il mezzo di coltura diventa torbido, occorre somministrare meno mangime. Le quantità di mangime somministrate vanno controllate scrupolosamente: se scarse faranno migrare le larve verso la colonna d'acqua, se in eccesso intensificheranno l'attività microbica e abbasseranno la concentrazione di ossigeno. La conseguenza, in entrambi i casi, potrebbe essere l'inibizione della crescita degli organismi.

6. Nell'allestire i nuovi recipienti di allevamento è possibile aggiungere anche alcune cellule di alghe verdi (come *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Alimentazione degli adulti emersi

7. Alcuni ricercatori suggeriscono, come mezzo di alimentazione per gli adulti emersi, un tampone di ovatta imbevuto di una soluzione satura di saccarosio.

▼M4

Emergenza

8. Alla temperatura di 20 ± 2 °C gli adulti iniziano ad emergere dai recipienti di allevamento delle larve dopo circa 13-15 giorni. I maschi si distinguono facilmente perché dotati di antenne piumate.

Ammassi di uova

9. Dal momento in cui si osserva la presenza di adulti nelle gabbie di allevamento, occorre controllare tre volte la settimana, in tutti i recipienti, se sono stati depositati ammassi gelatinosi di uova. Se presenti, gli ammassi di uova devono essere rimossi con cura e trasferiti in un recipiente piccolo contenente un campione dell'acqua di allevamento. Essi sono utilizzati per allestire un nuovo recipiente di allevamento (ad esempio, 2-4 ammassi per recipiente) oppure per eseguire prove di tossicità.

10. Le larve al primo stadio compaiono di norma dopo 2-3 giorni.

Allestimento di nuovi recipienti di coltura

11. Una volta avviate le colture, dovrebbe essere possibile allestire un nuovo recipiente per la coltura di larve a cadenza settimanale o meno spesso, secondo quanto richiesto dalla prova, ritirando i recipienti vecchi dopo che i moscerini adulti sono emersi. Questo sistema permette di ottenere regolarmente una quota di adulti con un'organizzazione minima.

Preparazione delle soluzioni di prova M4 e M7

12. Il mezzo M4 è stato descritto da Elendt (1990). Il mezzo M7 è preparato come l'M4 tranne per le sostanze indicate nella tabella 1, le cui concentrazioni nel mezzo M7 sono quattro volte inferiori rispetto al mezzo M4. Una pubblicazione sul mezzo M7 è in preparazione (Elendt, comunicazione personale). La soluzione di prova non deve essere preparata secondo le istruzioni di Elendt e Bias (1990), perché le concentrazioni di $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 indicate per la preparazione delle soluzioni madre non sono adatte.

Preparazione del mezzo M7

13. Ciascuna soluzione madre (I) è preparata separatamente e a partire da queste soluzioni madri (I) si prepara la soluzione madre combinata (II) (cfr. tabella 1). Per preparare il mezzo M7 mescolare 50 ml di soluzione madre combinata (II) con i quantitativi di ogni soluzione madre con macronutrienti indicati nella tabella 2 e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata. Per preparare una soluzione madre vitaminica, aggiungere tre vitamine all'acqua deionizzata, come indicato nella tabella 3, e versare 0,1 ml della soluzione madre combinata di vitamine al mezzo M7 finale poco prima dell'uso La soluzione di vitamine combinate è conservata in congelatore in piccole aliquote. Aerare e stabilizzare il mezzo.

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼M4

Tabella 1

Soluzioni madre di oligoelementi per i mezzi M4 e M7

Soluzioni madre (I)	Quantità (mg) per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata	Preparazione della soluzione madre combinata (II): mescolare le quantità seguenti (ml) di soluzioni madre (I) e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata		Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Queste sostanze sono presenti in dosi diverse in M4 e M7, come indicato sopra.
(2) Queste soluzioni sono preparate separatamente, mescolate e messe immediatamente in autoclave.

Tabella 2

Soluzioni madre di macronutrienti per i mezzi M4 e M7

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre di macronutrienti aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Concentrazioni finali delle soluzioni di prova M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzione madre vitaminica per i mezzi M4 e M7. Le tre soluzioni di vitamine sono mescolate in modo da formare un'unica soluzione madre vitaminica.

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre vitaminica aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Concentrazioni finali delle soluzioni di prova M4 e M7 (mg/l)
Tiamina cloridrato	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PREPARAZIONE DEL SEDIMENTO ARTIFICIALE

Composizione del sedimento

Il sedimento è preparato come illustrato nella tabella sottostante:

Componente	Caratteristiche	% di sedimento peso secco
Torba	Torba di sfagno, con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata all'aria	4-5
Sabbia di quarzo	Granulometria: > 50 % delle particelle ha dimensioni comprese tra 50 e 200 µm	75-76
Argilla caolinica	Tenore di caolinite ≥ 30 %	20
Carbonio organico	Regolato aggiungendo torba e sabbia	2 (± 0,5)
Carbonato di calcio	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro	0,05-0,1
Acqua	Conduttività ≤ 10 µS/cm	30-50

Preparazione

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba. Preparare una sospensione della quantità richiesta di polvere di torba in acqua deionizzata utilizzando un omogeneizzatore ad alte prestazioni. Aggiustare il pH della sospensione a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. Conservare per almeno due giorni la sospensione a temperatura di 20 ± 2 °C agitandola leggermente per stabilizzare il pH e favorire il costituirsi di una flora microbica stabile. Misurare nuovamente il pH, che deve essere pari a 6,0 ± 0,5. Successivamente mescolare la sospensione di torba con gli altri componenti (sabbia e argilla caolinica) e con acqua deionizzata, fino ad ottenere un sedimento omogeneo con tenore in acqua pari al 30-50 % del peso secco del sedimento. Misurare ancora una volta il pH della miscela finale e aggiustare a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ se necessario. Prelevare campioni del sedimento per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico. Prima di impiegare il sedimento artificiale in una prova di tossicità su chironomidi, si consiglia di conservarlo per sette giorni alle stesse condizioni in cui si realizzerà la prova.

Conservazione

I componenti secchi destinati alla preparazione del sedimento artificiale possono essere conservati in luogo fresco e asciutto, a temperatura ambiente. Il sedimento artificiale (umido) non può essere conservato prima del suo impiego per la prova, ma deve essere utilizzato subito dopo il periodo di riposo di 7 giorni che ne conclude la preparazione.

BIBLIOGRAFIA

Capitolo C.8 del presente allegato. Tossicità per i lombrichi.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Appendice 4

Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

Sostanza	Concentrazioni
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Durezza espressa come $CaCO_3$	< 400 mg/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

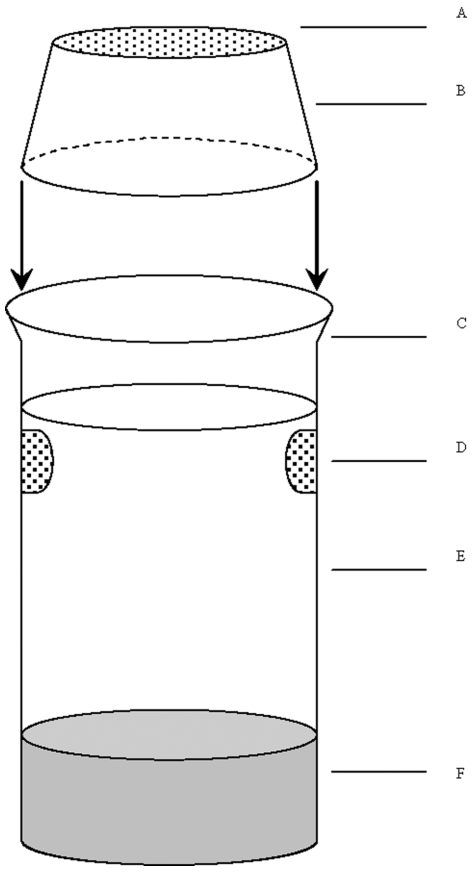
(*) Utilizzare un'acqua meno dura se si sospetta il rischio di un'interazione tra gli ioni che provocano la durezza e la sostanza in esame (nel qual caso il mezzo Elendt M4 non può essere usato).

▼M4

Appendice 5

Indicazioni per monitorare l'emergenza delle larve di chironomidi

A partire dal 20º giorno fino alla fine della prova, in cima ai becher si collocano contenitori «trappola». Un esempio di trappola è raffigurato nell'immagine sottostante.



A: reticella di nylon

B: contenitore di plastica capovolto

C: becher senza beccuccio

D: aperture ricoperte di reticella attraverso cui si effettua il ricambio dell'acqua

E: acqua

F: sedimento

▼M4

C. 28. **PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDI IN SEDIMENTO-ACQUA CON ACQUA ADDIZIONATA**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE n. 219 (2004) ed è inteso a valutare gli effetti di un'esposizione prolungata a sostanze chimiche su larve di *Chironomus* sp., un dittero che vive nei sedimenti di acqua dolce. Si basa principalmente sulla linea guida della BBA che utilizza un sistema sperimentale sedimento-acqua con terreno artificiale, in cui l'esposizione avviene nella colonna d'acqua (1) e tiene conto anche dei protocolli per le prove di tossicità su *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* messi a punto in Europa e in Nord America (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) e sottoposti a prove interlaboratorio (1) (6) (9). È possibile utilizzare anche altre specie ben documentate, ad esempio *Chironomus yoshimatsui* (10 (11).

2. Questo metodo prevede che l'esposizione alla sostanza in esame avvenga a mezzo d'acqua addizionata. La scelta dello scenario d'esposizione dipende dalla finalità della prova. Lo scenario d'esposizione, che consiste nell'addizionare alla colonna d'acqua la sostanza in esame, è inteso a simulare la dispersione di pesticidi nebulizzati e copre il picco iniziale di concentrazioni nell'acqua interstiziale. È utile anche per altri tipi di esposizione (fuoriuscite di sostanze chimiche, ad esempio), tranne quando i processi di accumulo hanno durata superiore a quella della prova.

3. In genere le sostanze da saggiare su organismi che vivono nei sedimenti persistono a lungo in questo comparto. L'esposizione di questi organismi può avvenire per diverse vie. L'importanza relativa di ogni via d'esposizione e il tempo impiegato da ciascuna di esse per contribuire all'effetto tossico globale dipendono dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame. Per le sostanze fortemente adsorbenti (ad esempio, con log K_{ow} > 5) oppure per le sostanze che si legano in modo covalente al sedimento, l'ingestione di alimenti contaminati può costituire una via d'esposizione importante. Per non sottovalutare la tossicità delle sostanze altamente lipofile, si può considerare l'opportunità di aggiungere cibo al sedimento prima di applicare la sostanza in esame. Il presente metodo, per tenere conto di tutte le possibili vie di esposizione, prevede un'esposizione a lungo termine: la prova dura da 20 a 28 giorni per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, e da 28 a 65 giorni per *C. tentans*. Se si ha bisogno di dati a breve termine per un fine specifico, ad esempio studiare gli effetti di sostanze chimiche instabili, è possibile ritirare dopo dieci giorni di prova le repliche supplementari allestite nell'ambito dello stesso impianto sperimentale.

4. Gli endpoint misurati sono il numero totale di adulti emersi e il tempo intercorso fino alla loro emergenza. Se occorrono dati a breve termine, si raccomanda di effettuare dopo dieci giorni le misurazioni relative alla sopravvivenza e alla crescita delle larve, utilizzando le eventuali repliche supplementari.

5. Si raccomanda di usare un sedimento artificiale, che presenta numerosi vantaggi rispetto a quello naturale:

— riduce la variabilità sperimentale in quanto costituisce una «matrice standardizzata» riproducibile, ed elimina la necessità di trovare delle fonti di sedimenti pulite e incontaminate,

— consente di effettuare le prove in qualsiasi momento dell'anno, senza che occorra tenere conto della variabilità stagionale dei sedimenti, e non richiede di essere trattato prima delle prove per eliminare la fauna indigena; riduce inoltre i costi associati alla raccolta sul terreno di quantità sufficienti di sedimento per le prove di routine,

▼M4

— consente di mettere a confronto e classificare le sostanze in base alla loro tossicità: i dati sulla tossicità ricavati da prove con sedimenti naturali e artificiali sono comparabili per varie sostanze chimiche (2).

6. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DEL METODO

7. Si espongono dei chironomidi al primo stadio larvale a un intervallo di concentrazioni della sostanza in esame in un sistema sedimento-acqua. La prova inizia introducendo le larve al primo stadio nei becher contenenti il sistema sedimento-acqua e aggiungendo successivamente all'acqua la sostanza in esame. La percentuale di emergenza e la velocità di sviluppo dei chironomidi sono misurate alla fine della prova. Dopo 10 giorni, se necessario, si misurano anche la sopravvivenza e il peso delle larve (utilizzando eventuali repliche supplementari). Questi dati sono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x dell'emergenza, della sopravvivenza o della crescita delle larve (ad esempio CE_{15}, CE_{50} ecc.), oppure mediante verifica di un'ipotesi statistica per determinare un valore LOEC/NOEC. Nel secondo caso occorre confrontare i valori degli effetti con i valori di controllo per mezzo di prove statistiche.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

8. È necessario conoscere l'idrosolubilità e la tensione di vapore della sostanza in esame, il coefficiente di ripartizione misurato o calcolato nel sedimento e la sua stabilità nell'acqua e nel sedimento. Occorre inoltre avvalersi di un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza in esame nell'acqua sovrastante, nell'acqua interstiziale e nel sedimento, di cui devono essere noti e riportati nella relazione l'accuratezza e il limite di rivelabilità. È anche utile conoscere la formula strutturale e la purezza della sostanza in esame, come pure il suo destino chimico (ad esempio, dissipazione, degradazione abiotica e biotica ecc.). Ulteriori orientamenti per saggiare le sostanze con caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione delle prove sono contenuti in (12).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

9. Per assicurarsi che il protocollo e le condizioni di prova siano affidabili si possono saggiare regolarmente delle sostanze di riferimento. Tra i tossici di riferimento utilizzati con successo in prove interlaboratorio e studi di validazione vi sono: lindano, trifluralin, pentaclorofenolo, cloruro di cadmio e cloruro di potassio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÀ DELLA PROVA

10. Perché la prova sia valida devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— alla fine della prova l'emergenza nei controlli deve essere almeno pari al 70 % (1) (6),

— per quanto riguarda *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, l'emergenza allo stadio adulto nei recipienti di controllo deve avvenire tra i 12 e i 23 giorni successivi alla loro introduzione nei recipienti; per *C. tentans* il periodo va da 20 a 65 giorni,

— alla fine della prova, si devono misurare il pH e la concentrazione dell'ossigeno disciolto in ogni recipiente. La concentrazione dell'ossigeno deve essere almeno il 60 % del suo valore di saturazione in aria (ASV) alla temperatura applicata e il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6 e 9 in tutti i recipienti di prova,

▼M4

— la temperatura dell'acqua non deve variare di oltre ± 1,0 °C e può essere regolata per mezzo di una camera isotermica, nel qual caso la temperatura ambiente dovrà essere periodicamente confermata, a congrui intervalli di tempo.

DESCRIZIONE DEL METODO

Recipienti di prova

11. Lo studio è condotto in becher di vetro da 600 ml, di 8 cm di diametro. Possono essere utilizzati anche altri recipienti, purché garantiscano profondità sufficiente ad accogliere il sedimento e l'acqua sovrastante. La superficie del sedimento deve essere tale da offrire uno spazio da 2 a 3 cm^2 per larva. Lo spessore dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua sovrastante devono essere in rapporto 1:4. I recipienti e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con il sistema sperimentale devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte (ad esempio Teflon).

Selezione delle specie

12. La specie che meglio si presta a questa prova è *Chironomus riparius*. C*hironomus tentans* è altrettanto adatto, sebbene sia più difficile da manipolare e richieda un periodo di prova più lungo. Si può utilizzare anche *Chironomus yoshimatsui.* Le istruzioni sul metodo di allevamento di *Chironomus riparius* figurano nell'appendice 2. Sono reperibili informazioni anche sulle condizioni di allevamento delle altre specie: *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). Occorre identificare la specie prima dell'avvio della sperimentazione, ma non è necessario farlo prima di ogni singola prova se gli organismi sono stati coltivati dal laboratorio che esegue la sperimentazione.

Sedimento

13. Si utilizza di preferenza sedimento artificiale. Se si sceglie di utilizzare un sedimento naturale, occorre caratterizzarlo, almeno quanto a pH e tenore di carbonio organico (la determinazione di altri parametri, come il rapporto C/N e la granulometria è altrettanto raccomandata), e assicurarsi che sia esente da ogni contaminazione e da altri organismi che potrebbero entrare in competizione con i chironomidi o consumarli. Prima di impiegare un sedimento naturale in una prova di tossicità su chironomidi, si raccomanda inoltre di mantenerlo per sette giorni alle stesse condizioni in cui verrà realizzata la prova. Per questo test si raccomanda di utilizzare il sedimento artificiale basato su quello di cui al metodo di prova C.8 (14) e costituito secondo la seguente formula (1) (15) (16):

a) 4-5 % (peso secco) di torba, con pH più vicino possibile a 5,5-6,0. È importante utilizzare torba sotto forma di polvere, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata unicamente all'aria;

b) 20 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);

c) 75-76 % (peso secco) di sabbia di quarzo (composta in prevalenza da sabbia fine, con oltre il 50 % delle particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 μm);

d) aggiunta di acqua deionizzata fino ad ottenere un tenore di umidità totale della miscela compreso tra 30 % e 50 %;

e) aggiunta di carbonato di calcio di qualità chimicamente pura ($CaCO_3$) per aggiustare il pH della miscela finale a 7,0 ± 0,5.

f) il tenore di carbonio organico della miscela finale dovrà essere del 2 % (± 0,5 %), ottenuto aggiungendo le dovute quantità di torba e sabbia, come indicato in a) e c).

▼M4

14. Il luogo di provenienza di torba, argilla caolinica e sabbia deve essere noto. Occorre verificare che i componenti del sedimento non siano contaminati da sostanze chimiche (ad esempio, metalli pesanti, composti organoclorurati, composti organofosforici ecc.). Un esempio di preparazione del sedimento artificiale figura nell'appendice 3. I componenti possono anche essere mescolati allo stato secco, purché si dimostri che dopo l'aggiunta dell'acqua sovrastante non si separino (ad esempio, particelle di torba in sospensione) e che la torba o il sedimento sono condizionati a sufficienza.

Acqua

15. Le acque che presentano le caratteristiche chimiche indicate nelle appendici 2 e 4 per un'acqua di diluizione accettabile sono considerate adatte per la prova. È possibile utilizzare come acqua di coltura e acqua di diluizione qualsiasi acqua naturale (di superficie o freatica), acqua ricostituita (cfr. appendice 2) o acqua di rubinetto non clorata se i chironomidi sopravvivono durante l'allevamento e la prova senza manifestare segni di stress. All'inizio della prova il pH dell'acqua di prova deve situarsi tra 6 e 9 e la sua durezza complessiva non superare 400 mg/l di $CaCO_3$. Se però si sospetta che vi sia un'interazione tra gli ioni che determinano la durezza e la sostanza in esame, occorre utilizzare un'acqua meno dura (in tal caso il mezzo Elendt M4 non è idoneo). Lo stesso tipo di acqua deve essere impiegato per tutta la prova. Le caratteristiche della qualità dell'acqua indicate nell'appendice 4 vanno misurate almeno due volte l'anno oppure quando si sospetta che abbiano subito un'alterazione significativa.

Soluzioni madre — Acqua addizionata

16. Le concentrazioni sperimentali sono calcolate in base alle concentrazioni della colonna d'acqua, ossia l'acqua sovrastante il sedimento. Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre devono preferibilmente essere preparate solubilizzando la sostanza nel mezzo di prova. In alcuni casi può rendersi necessario l'uso di solventi o disperdenti per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. Tra i solventi che si possono usare vi sono: acetone, etanolo, metanolo, etere monometilico del glicol etilenico, etere dimetilico del glicol etilenico, dimetilformammide e glicol trietilenico. Disperdenti utilizzabili sono Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. La concentrazione dell'agente solubilizzante nel mezzo di prova finale deve essere minima (ossia $\leq$ 0,1 ml/l) e identica in tutti i trattamenti. Qualora si utilizzi un agente solubilizzante, questo non deve avere effetti significativi sulla sopravvivenza né effetti negativi visibili sulle larve di chironomide, effetti che si ricavano dall'osservazione del recipiente di controllo trattato con solo solvente. L'uso di questi materiali dovrebbe tuttavia essere evitato il più possibile.

DISEGNO SPERIMENTALE

17. Il disegno sperimentale comprende la selezione del numero delle concentrazioni della sostanza in esame e dell'intervallo fra esse, il numero di recipienti per ciascun livello di concentrazione e il numero di larve per recipiente. È qui descritto il procedimento da seguire per la stima puntuale della CE, la stima della NOEC e per l'esecuzione di una prova limite. Come impostazione sperimentale, l'analisi di regressione è da preferirsi alla verifica di un'ipotesi.

Disegno per l'analisi di regressione

18. La concentrazione che determina un effetto (ad esempio CE_{15}, CE_{50}) e l'intervallo delle concentrazioni alle quali la sostanza in esame produce un effetto d'interesse devono rientrare tra le concentrazioni incluse nella prova. In genere la precisione e, in particolare, la validità della stima delle concentrazioni che determinano un effetto (CE_X) saranno maggiori quando la concentrazione con effetto rientra nell'intervallo delle concentrazioni da testare.

▼M4

Bisogna evitare di estrapolare risultati molto al di sotto della concentrazione efficace minima o al di sopra di quella massima. È utile condurre una prova preliminare di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni per delimitare quelle su cui impostare la prova (cfr. paragrafo 27).

19. Se si deve stimare la CE_X occorre saggiare almeno cinque concentrazioni e allestire tre repliche per ciascuna concentrazione. In ogni caso, per ottenere una buona stima del modello, è consigliabile utilizzare un numero sufficiente di concentrazioni. Il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere maggiore di due (salvo nel caso in cui la curva dose/risposta sia poco accentuata). Il numero di repliche per trattamento può essere diminuito se si aumenta il numero di concentrazioni che danno risposte diverse. L'aumento del numero di repliche o la riduzione degli intervalli delle concentrazioni tendono a ridurre gli intervalli di confidenza per la prova. Il numero delle repliche sarà maggiore se si deve stimare la percentuale di sopravvivenza e crescita delle larve dopo 10 giorni.

Disegno per la stima di una NOEC/LOEC

20. Se occorre stimare la LOEC/NOEC si saggeranno cinque concentrazioni con almeno quattro repliche, e il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere superiore a due. Il numero di repliche deve essere tale da garantire una potenza statistica che consenta di rilevare una differenza del 20 % con gli organismi di controllo, applicando una significatività statistica del 5 % ($p = 0,05$). Per quanto riguarda la velocità di sviluppo, è in genere appropriata un'analisi della varianza (ANOVA), come ad esempio il test di Dunnett o il test di Williams (17) (18) (19) (20). Per il tasso di emergenza si può utilizzare il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione secondo Bonferroni) o il test di Mantel-Haenszel.

Prova limite

21. Se la prova preliminare per determinare l'intervallo delle concentrazioni non ha prodotto alcun effetto, si può condurre una prova limite (una concentrazione di prova e un controllo). Scopo della prova limite è di indicare che la concentrazione tossica della sostanza in esame è superiore alla concentrazione limite saggiata. Per questo metodo di prova non è possibile raccomandare una concentrazione precisa, che è lasciata alla discrezione dei regolatori. Di norma è necessario allestire sei repliche sia per gli organismi trattati che per quelli di controllo. Occorre dimostrare che la potenza statistica è sufficiente per rilevare una differenza del 20 % con il controllo, applicando una significatività statistica del 5 % ($p = 0,05$). Per quanto concerne la risposta in termini di velocità di sviluppo e peso, il test t costituisce un metodo statistico idoneo se i dati rispettano le condizioni imposte da questo test (normalità, varianze omogenee). In caso contrario, si può ricorrere al test t per varianze disuguali o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whithey. Quanto al tasso di emergenza, il test esatto di Fisher è appropriato.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

Preparazione del sistema addizionato acqua-sedimento

22. Si deposita nei recipienti una congrua quantità di sedimento artificiale (cfr. paragrafi 13-14 e appendice 3), in modo da formare uno strato di almeno 1,5 cm. Si aggiunge acqua fino ad un'altezza di 6 cm (cfr. paragrafo 15). Il rapporto tra spessore del sedimento e profondità dell'acqua non deve essere superiore a 1:4 e lo strato di sedimento non deve oltrepassare i 3 cm. Il sistema sedimento-acqua è posto in moderata aerazione per sette giorni prima di introdurvi gli organismi di prova (cfr. paragrafo 14 e appendice 3). Per evitare la separazione degli ingredienti del sedimento e la risospensione delle particelle fini durante l'aggiunta dell'acqua, si può ricoprire il sedimento con un disco di plastica durante l'operazione di riempimento della colonna d'acqua per poi ritirarlo a operazione completata. Possono essere utilizzati anche altri dispositivi.

▼M4

23. I recipienti così allestiti devono essere coperti (ad esempio, da piastre di vetro). Nel corso della prova si provvederà, se necessario, ad aggiungere l'acqua necessaria a mantenere il volume originario per compensare l'evaporazione, avendo cura di utilizzare acqua distillata o deionizzata per evitare l'accumulo di sali.

Introduzione degli organismi di prova

24. Quattro o cinque giorni prima di introdurre gli organismi nei recipienti, si prelevano dagli allevamenti ammassi di uova e li si depositano in recipienti piccoli contenenti mezzo di coltura. Si può utilizzare il mezzo vecchio prelevato dalla coltura madre o un mezzo fresco. In quest'ultimo caso, si aggiunge una piccola quantità di cibo, ad esempio alghe verdi e/o qualche goccia di filtrato di una sospensione di mangime per pesci in fiocchi (cfr. appendice 2). Si devono utilizzare solo ammassi di uova appena deposti. Di solito le larve compaiono qualche giorno dopo la deposizione delle uova (da 2 a 3 giorni per *Chironomus riparius* a 20 °C e da 1 a 4 giorni per *Chironomus tentans* a 23 C e *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) e la loro crescita avviene in quattro stadi, ciascuno di una durata compresa tra 4 e 8 giorni. Questa prova si esegue al primo stadio larvale (2-3 oppure 1-4 giorni dopo la schiusa). È possibile verificare lo stadio di sviluppo dei moscerini in base alle dimensioni della capsula cefalica (6).

25. In ciascun recipiente contenente il sistema addizionato sedimento-acqua si distribuiscono casualmente, per mezzo di una pipetta smussata, venti larve al primo stadio. L'aerazione dell'acqua deve essere interrotta per 24 ore dal momento dell'introduzione delle larve nei recipienti (cfr. paragrafi 24 e 32). In base al disegno sperimentale adottato (cfr. paragrafi 19 e 20), il numero di larve utilizzate per concentrazione è almeno 60 per la stima puntuale della CE e 80 per la determinazione della NOEC.

26. Ventiquattr'ore dopo avere introdotto le larve, la sostanza da saggiare è aggiunta nella colonna d'acqua sovrastante e i recipienti vengono di nuovo sottoposti a moderata aerazione. Piccoli volumi della soluzione contenente la sostanza in esame sono iniettati con un pipetta sotto la superficie dell'acqua. In seguito si mescola delicatamente l'acqua sovrastante, con la dovuta cautela per evitare la risospensione del sedimento.

Concentrazioni di prova

27. Può essere utile effettuare una prova preliminare per determinare la gamma delle concentrazioni per la prova vera e propria. A tal fine si utilizza a una serie di concentrazioni della sostanza in esame molto intervallate tra loro. Applicando la stessa densità superficiale di chironomidi prevista per la prova vera e propria, i chironomidi sono esposti ad ogni concentrazione della sostanza in esame per un periodo che consenta di stimare le concentrazioni di prova adeguate e non è necessaria alcuna replica.

28. Le concentrazioni sperimentali per la prova vera e propria sono decise in funzione dell'esito della prova di determinazione dell'intervallo di concentrazione. Occorre saggiare almeno cinque concentrazioni, scelte in base a quanto indicato nei paragrafi 18-20.

Controlli

29. La prova prevede l'allestimento di recipienti di controllo, senza la sostanza in esame ma con il sedimento, e un congruo numero di repliche (cfr. paragrafi 19-20). Se la sostanza in esame è stata applicata mediante un solvente (cfr. paragrafo 16), si deve aggiungere un recipiente di controllo che contenga sedimento e solvente.

▼M4

Sistema di prova

30. Si impiegano sistemi statici. I sistemi semistatici oppure a flusso, con rinnovo intermittente o continuo dell'acqua sovrastante, possono essere utilizzati in casi eccezionali, ad esempio se le specifiche della qualità dell'acqua diventano inadeguate per gli organismi in esame oppure influiscono sull'equilibrio chimico (nel caso in cui, ad esempio, i livelli di ossigeno disciolto si abbassino troppo, la concentrazione degli escreti aumenti eccessivamente o i minerali prodotti dalla lisciviazione del sedimento alterino il pH e/o la durezza dell'acqua). È tuttavia sufficiente e preferibile ricorrere ad altri metodi di miglioramento della qualità dell'acqua sovrastante, come l'aerazione.

Alimentazione

31. Le larve devono essere nutrite, di preferenza ogni giorno o almeno tre volte la settimana. Durante i primi 10 giorni l'alimentazione giornaliera ritenuta adeguata per le larve giovani consiste in 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg per *C. yoshimatsui*) pro capite di mangime per pesci (sospensione acquosa o finemente macinato, del tipo Tetra-Min o Tetra-Phyll; cfr. appendice 2). Può essere necessario aumentare leggermente la dose per le larve più vecchie: 0,5-1 mg per larva al giorno dovrebbe essere sufficiente per il resto della prova. Si diminuirà la razione di cibo di tutti gli organismi trattati e dei controlli se si osserva la comparsa di funghi o il decesso di organismi di controllo. Se non si riesce ad arrestare lo sviluppo fungino occorre ripetere la prova. Se la prova verte su sostanze fortemente adsorbenti (ad esempio, con log K_{ow} > 5) o sostanze che si legano in modo covalente al sedimento, la quantità di cibo necessaria alla sopravvivenza e alla crescita naturale degli organismi può essere incorporata al sedimento artificiale prima del periodo di stabilizzazione. In tal caso il mangime per pesci è sostituito con alimenti vegetali, ad esempio 0,5 % (peso secco) di foglie finemente macinate di ortica (*Urtica dioica*), gelso (*Morus alba*), trifoglio bianco (*Trifolium repens*), spinacio (*Spinacia oleracea*) o di altro materiale vegetale (*Cerophyl* o alfa cellulosa).

Condizioni di incubazione

32. L'acqua sovrastante dei recipienti è sottoposta a una moderata aerazione, di preferenza a partire da 24 ore dopo l'introduzione delle larve e fino alla fine della prova (avendo cura che la concentrazione di ossigeno disciolto non scenda sotto il 60 % del suo valore di saturazione dell'aria). L'aria è insufflata tramite pipette Pasteur in vetro fissate a 2-3 cm sopra lo strato di sedimento (nella misura di una o poche bolle al secondo). Se la sostanza in esame è volatile, va eventualmente considerato di non aerare il sistema.

33. La prova è effettuata a una temperatura costante di 20 °C (± 2 °C). Per *C. tentans* e *C. yoshimatsui* la temperatura raccomandata è, rispettivamente, di 23 °C e 25 °C (± 2 °C). Il fotoperiodo è di 16 ore e l'intensità luminosa compresa tra 500 e 1 000 lux.

Durata dell'esposizione

34. L'esposizione ha inizio con l'introduzione delle larve nei recipienti trattati e di controllo. La prova dura 28 giorni per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, e 65 giorni per *C. tentans*. Se i moscerini emergono prima, la prova può concludersi dopo almeno cinque giorni dall'emergenza dell'ultimo adulto di controllo.

OSSERVAZIONI

Emergenza

35. Si deve determinare il tempo di sviluppo e il numero totale di moscerini maschi e femmine adulti completamente emersi. I maschi si distinguono facilmente perché dotati di antenne piumate.

▼M4

36. I recipienti vanno osservati almeno tre volte la settimana, per verificare che non presentino attività anomala (abbandono del sedimento, movimenti natatori insoliti ecc.) rispetto a quelli di controllo. Durante il periodo della prevista emergenza è necessario contare tutti i giorni i moscerini emersi e registrare il sesso e il numero di quelli completamente emersi. Una volta identificati, i moscerini sono tolti dai recipienti. Ogni ammasso di uova deposto prima della fine della prova deve essere registrato e poi tolto per impedire l'introduzione di nuove larve nel sedimento. Va registrato anche il numero delle pupe visibili che non sono riuscite ad emergere. L'appendice 5 contiene indicazioni su come misurare l'emergenza.

Crescita e sopravvivenza

37. Se occorre rilevare i dati sulla sopravvivenza e la crescita della larve dopo 10 giorni, si allestiscono recipienti supplementari all'inizio della prova da usare successivamente. Il sedimento di questi recipienti supplementari è setacciato con un setaccio da 250 μm per trattenere le larve. La morte è determinata da due criteri: l'immobilità o l'assenza di reazione a uno stimolo meccanico. Anche le larve non recuperate devono essere contate tra i decessi (è possibile che le larve morte all'inizio della prova siano state degradate da microbi). Dopo avere determinato il peso secco (senza ceneri) delle larve sopravvissute per ogni recipiente, si calcola il peso secco individuale medio per recipiente. Per determinare a quale stadio si trovano le larve sopravvissute si possono misurare le dimensioni della capsula cefalica di ogni individuo.

Misurazioni analitiche

Concentrazione della sostanza in esame

38. Occorre analizzare, come minimo, dei campioni dell'acqua sovrastante, dell'acqua interstiziale e del sedimento all'inizio della prova (di preferenza un'ora dopo l'applicazione della sostanza in esame) e alla fine, e ciò per la concentrazione massima e per una più bassa. La concentrazione della sostanza in esame ci informa sul comportamento/ripartizione della sostanza nel sistema acqua-sedimento. Dato che il prelievo di campioni di sedimento all'inizio della prova può perturbare l'impianto sperimentale (rimozione di larve, ad esempio), è opportuno usare dei recipienti supplementari per effettuare i rilievi analitici all'inizio ed eventualmente durante la prova (cfr. paragrafo 39). Non è necessario analizzare il sedimento se la ripartizione della sostanza in esame tra l'acqua e il sedimento è stata chiaramente determinata con uno studio acqua/sedimento condotto in condizioni analoghe (ad esempio, rapporto sedimento/acqua, tipo di applicazione, tenore di carbonio organico nel sedimento).

39. Quando si effettuano misurazioni intermedie (ad esempio, al settimo giorno) e se l'analisi richiede campioni voluminosi che non possono essere prelevati dai recipienti senza influire sull'impianto sperimentale, le determinazioni analitiche sono praticate su campioni prelevati dai recipienti supplementari trattati allo stesso modo (anche contenenti gli organismi di prova) ma non utilizzati per le osservazioni biologiche.

40. Per isolare l'acqua interstiziale si raccomanda di centrifugare i campioni, ad esempio, a 10 000 g e a 4°C per 30 minuti. Se però è dimostrato che la sostanza in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione. In alcuni casi, se i campioni sono troppo piccoli, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.

▼M4

Parametri fisici e chimici

41. Il pH, l'ossigeno disciolto nell'acqua di prova e la temperatura dei recipienti devono essere debitamente misurati (cfr. paragrafo 10). All'inizio e alla fine della prova è necessario misurare la durezza dell'acqua e il tenore di ammoniaca nei controlli e in un recipiente trattato alla concentrazione massima.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

42. Scopo di questa prova è determinare l'effetto della sostanza in esame sulla velocità di sviluppo e sul numero totale di moscerini maschi e femmine adulti completamente emersi oppure, nel caso della prova a 10 giorni, gli effetti sulla sopravvivenza e sul peso delle larve. Se nulla indica che i due sessi presentano differenze statistiche di sensibilità, ai fini dell'analisi statistica i risultati ottenuti sui maschi e sulle femmine possono essere raggruppati. Le differenze di sensibilità tra i sessi possono essere valutate statisticamente tramite, ad esempio, il test χ^2-r x 2. La sopravvivenza delle larve e il peso secco individuale medio per recipiente devono essere determinati dopo 10 giorni, se del caso.

43. Le concentrazioni con effetto, espresse come concentrazioni nell'acqua sovrastante, sono calcolate di preferenza sulla base delle concentrazioni misurate all'inizio della prova (cfr. paragrafo 38).

44. Per effettuare una stima puntuale della CE_{50} o di qualsiasi altra CE_X, le statistiche per recipiente possono essere usate alla stregua di repliche. Quando si calcola un intervallo di confidenza per una qualsiasi CE_X occorre tener conto della variabilità tra i recipienti oppure dimostrare che tale variabilità è di entità trascurabile. Quando il modello è adattato mediante il metodo dei minimi quadrati, è necessario trasformare le statistiche per recipiente al fine di aumentare l'omogeneità della varianza. I valori della CE_X devono però essere calcolati dopo che il risultato è stato ritrasformato nel suo valore originario.

45. Se l'analisi statistica mira a determinare la NOEC/LOEC mediante la verifica di ipotesi, la variabilità tra i recipienti deve essere presa in considerazione, ad esempio con un'analisi ANOVA gerarchica. In situazioni dove non sussistono tutti i consueti presupposti per l'ANOVA si possono invece utilizzare test più robusti (21).

Tasso di emergenza

46. I tassi di emergenza sono dati di tipo quantale e possono essere analizzati con il test di Cochran-Armitage applicato in modo regressivo se si ipotizza un rapporto dose-risposta monotonico e i tassi di emergenza corroborano questa ipotesi. In caso contrario, si può utilizzare un test esatto di Fisher o un test di Mantel-Haenszel con correzione dei valori p secondo Bonferroni-Holm. Se si osserva che la variabilità tra le repliche alla stessa concentrazione è maggiore di quanto una distribuzione binomiale indicherebbe (variazione spesso denominata «extrabinomiale»), si applicherà un test più potente (Cochran-Armitage o Fisher esatto) come proposto in (21).

47. Si determina la somma dei moscerini emersi per recipiente (n_e) e la si divide per il numero di larve introdotte (n_a):

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

dove:

TE = tasso di emergenza

n_e = numero di moscerini emersi per recipiente

n_a = numero di larve introdotte per recipiente

48. Un'alternativa più adatta ai campioni di grandi dimensioni, in presenza di varianza extrabinomiale, consiste nel trattare il tasso di emergenza come una risposta continua e adottare procedure quali il test di William, se si ipotizza che il rapporto dose-risposta sia monotonico e se i dati del tasso di emergenza corroborano tale ipotesi. Conviene utilizzare il test di Dunnett quando l'ipotesi di monotonicità è infondata. Ai fini di questa analisi un campione è considerato di grandi dimensioni quando il numero di moscerini emersi e il numero dei non emersi sono entrambi superiori a cinque per replica.

49. Prima di applicare i metodi ANOVA, occorre trasformare i valori del TE per la radice quadrata dell'arcoseno oppure secondo Freeman-Tukeylper ottenere una distribuzione prossima a quella normale e livellare le varianze. Il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione Bonferroni) oppure il test di Mantel-Haenszel possono essere impiegati quando si utilizzano delle frequenze assolute. La trasformazione con la radice quadrata dell'arcoseno consiste nel calcolare la funzione inversa del seno ($seno^{-1}$) della radice quadrata del TE.

50. Per i tassi di emergenza, i valori della CE_X sono calcolati con un'analisi di regressione [oppure probit (22), logit, Weibull, appositi software commerciali ecc.]. Se l'analisi di regressione è inconcludente (ad esempio, quando vi sono meno di due risposte parziali), si fa ricorso ad altri metodi non parametrici quali media mobile o interpolazione lineare.

Velocità di sviluppo

51. Il tempo medio di sviluppo è il tempo medio intercorso tra l'introduzione delle larve (giorno 0 della prova) e l'emergenza della coorte sperimentale di moscerini (per calcolare il tempo reale di sviluppo si deve tenere conto dell'età delle larve al momento dell'introduzione). La velocità di sviluppo è inversamente proporzionale al tempo di sviluppo (unità: 1/giorno) e consiste nella parte di sviluppo larvale che avviene quotidianamente. Per valutare la tossicità nei sedimenti si preferisce far riferimento alla velocità di sviluppo perché, rispetto al tempo di sviluppo, ha una varianza più bassa e valori più omogenei e più prossimi a una distribuzione normale. È anche per questo che si possono applicare test parametrici potenti, più adatti alla velocità di sviluppo che al tempo di sviluppo. Se la velocità di sviluppo è trattata come risposta continua, i valori della CE_X possono essere stimati avvalendosi dell'analisi di regressione (ad esempio (23) (24)].

52. Per i test statistici seguenti, il numero di moscerini osservati il giorno x è considerato essere emerso a metà dell'intervallo tra il giorno x e il giorno x - l (l = lunghezza dell'intervallo di osservazione, di solito 1 giorno). La velocità media di sviluppo per recipiente (x) è calcolata come segue:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

dove:

$\overline{x}$: velocità media di sviluppo per recipiente

i: indice dell'intervallo di osservazione

m: numero massimo di intervalli di osservazione

▼M4

f_i: numero di moscerini emersi nell'intervallo di osservazione i

n_e: numero totale di moscerini emersi alla fine dell'esperimento (= $\sum f_i$)

x_i: velocità di sviluppo dei moscerini emersi nell'intervallo i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

dove:

$giorno_i$: giorno dell'osservazione (contato a partire dall'applicazione)

l_i: lunghezza dell'intervallo d'osservazione i (espressa in giorni, di solito 1 giorno)

Relazione sulla prova

53. La relazione sulla prova deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

— natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (idrosolubilità, tensione di vapore, coefficiente di ripartizione nel terreno — o nel sedimento, se noto —, stabilità nell'acqua ecc.),

— identificazione chimica (nome comune, nome chimico, formula strutturale, numero CAS ecc.), purezza e metodo di analisi per la quantificazione della sostanza in esame.

Specie in esame:

— animali utilizzati: specie, nome scientifico, provenienza degli organismi e condizioni di allevamento,

— informazioni sulla manipolazione degli ammassi di uova e delle larve,

— età degli animali al momento della loro introduzione nei recipienti di prova.

Condizioni sperimentali:

— sedimento utilizzato, ossia se naturale o artificiale,

— per il sedimento naturale, ubicazione e descrizione del sito di campionamento e, se possibile, cronistoria della contaminazione; caratteristiche: pH, tenore di carbonio organico, rapporto C/N e granulometria (se del caso),

— preparazione del sedimento artificiale: ingredienti e caratteristiche (tenore di carbonio organico, pH, umidità ecc. all'inizio della prova),

— preparazione dell'acqua (se si utilizza acqua artificiale) e caratteristiche (concentrazione di ossigeno, pH, conduttività, durezza ecc. all'inizio della prova),

— spessore del sedimento e profondità dell'acqua sovrastante,

— volume dell'acqua sovrastante e dell'acqua interstiziale; peso del sedimento umido con e senza acqua interstiziale,

— recipienti di prova (materiale e dimensioni),

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e delle concentrazioni in esame,

▼M4

— applicazione della sostanza in esame: concentrazioni utilizzate, numero di repliche e impiego di eventuali solventi,

— condizioni d'incubazione: temperatura, fotoperiodo, intensità luminosa, aerazione (frequenza e intensità),

— informazioni dettagliate sull'alimentazione, che comprendano il tipo di mangime, la preparazione, la quantità e il regime di alimentazione.

Risultati:

— concentrazioni nominali sperimentali, concentrazioni sperimentali misurate e risultati di tutte le analisi condotte per determinare la concentrazione della sostanza in esame nel recipiente di prova,

— qualità dell'acqua nei recipienti, ossia pH, temperatura, ossigeno disciolto, durezza e tenore di ammoniaca,

— sostituzione dell'eventuale acqua evaporata nel corso della prova,

— numero di moscerini maschi e femmine emersi, al giorno, per recipiente,

— numero di larve non emerse come moscerini per recipiente,

— peso secco individuale medio delle larve per recipiente, e per stadio larvale, se del caso,

— percentuale di emergenza per replica e per concentrazione (risultati raggruppati per moscerini maschi e femmine),

— velocità media di sviluppo dei moscerini completamente emersi per replica e per concentrazione somministrata (risultati raggruppati per moscerini maschi e femmine),

— stime degli endpoint di tossicità, ad esempio CE_X (e relativi intervalli di confidenza), NOEC e/o LOEC, e metodi statistici impiegati per determinarle,

— discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canadàs biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCSE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

Sedimento artificiale, sintetico o formulato: una miscela di materiali usati per simulare i componenti fisici di un sedimento naturale.

Acqua sovrastante: l'acqua al di sopra del sedimento nel recipiente di prova.

Acqua interstiziale o soluzione circolante: l'acqua che occupa lo spazio tra il sedimento e le particelle di terreno.

Acqua addizionata: l'acqua utilizzata per la prova alla quale è stata aggiunta la sostanza in esame.

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

▼M4

Appendice 2

Indicazioni per l'allevamento di *Chironomus riparius*

1. Le larve di *Chironomus* possono essere allevate in cristallizzatori o in grandi recipienti. Il fondo del recipiente è ricoperto di un sottile strato di sabbia di quarzo dello spessore di circa 5-10 mm. Anche il Kieselguhr (ad esempio l'articolo 8117 di Merck) ha dato prova di essere un substrato idoneo (nel qual caso basta uno strato ancora più sottile di pochi millimetri). Si aggiunge acqua di qualità adeguata ad un'altezza di vari centimetri, avendo cura di mantenere questo livello iniziale aggiungendo acqua in caso di evaporazione per prevenire il disseccamento. L'acqua può essere rinnovata completamente, se necessario. Fornire un'aerazione moderata. I recipienti di coltura devono essere situati in apposite gabbie per impedire la fuga degli adulti via via che emergono. La gabbia deve essere sufficientemente grande per consentire agli adulti emersi di sfarfallare, condizione imprescindibile per la copulazione (dimensioni minime: 30 × 30 × 30 cm).

2. Le gabbie devono essere tenute a temperatura ambiente, oppure a una temperatura costante di 20 ± 2 °C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce (a un'intensità luminosa di circa.1 000 lux) e 8 ore di buio. Da alcuni studi si è appreso che un'umidità relativa dell'aria inferiore a 60 % può impedire la riproduzione.

Acqua di diluizione

3. Può essere utilizzata qualsiasi acqua naturale o sintetica di qualità adeguata. Di solito si impiega acqua di pozzo, acqua di rubinetto non clorata e mezzi artificiali (come Elendt M4 o M7, si veda di seguito). L'acqua deve essere aerata prima dell'uso. Se necessario, si può rinnovare l'acqua di coltura versando o sifonando l'acqua usata dai recipienti facendo attenzione a non distruggere i tubi delle larve.

Alimentazione delle larve

4. Le larve di *Chironomus* sono nutrite con mangime per pesci in fiocchi (Tetra Min®, Tetra Phyll® o altra marca registrata equivalente), in dose giornaliera di circa 250 mg per recipiente. Il mangime può essere somministrato sotto forma di polvere macinata secca o in sospensione acquosa: aggiungere 1,0 g di fiocchi a 20 ml di acqua di diluizione e agitare la miscela per renderla omogenea. La dieta a base di questo preparato può consistere in 5 ml al giorno per recipiente (agitare prima dell'uso). La dose può essere più abbondante per le larve più vecchie.

5. L'alimentazione è adattata in funzione della qualità dell'acqua. Se il mezzo di coltura diventa torbido, occorre somministrare meno mangime. Le quantità di mangime introdotte nei recipienti vanno controllate scrupolosamente: se scarse faranno migrare le larve verso la colonna d'acqua, se in eccesso intensificheranno l'attività microbica e abbasseranno la concentrazione di ossigeno. La conseguenza, in entrambi i casi, potrebbe essere l'inibizione della crescita degli organismi.

6. Nell'allestire nuovi recipienti di allevamento è possibile aggiungere anche alcune cellule di alghe verdi (come *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Alimentazione degli adulti emersi

7. Alcuni ricercatori suggeriscono, come mezzo di alimentazione per gli adulti emersi, un tampone di ovatta imbevuto di una soluzione satura di saccarosio.

▼M4

Emergenza

8. Alla temperatura di 20 ± 2 °C gli adulti iniziano ad emergere dai recipienti di allevamento delle larve dopo circa 13-15 giorni. I maschi si distinguono facilmente in quanto provvisti di antenne piumate.

Ammassi di uova

9. Dal momento in cui si osserva la presenza di adulti nelle gabbie di allevamento, occorre controllare tutti i recipienti tre volte la settimana per vedere se sono state deposte le uova, sotto forma di ammassi gelatinosi. Gli ammassi di uova devono essere rimossi con cura e trasferiti in un recipiente piccolo contenente un campione dell'acqua di coltura. Essi sono utilizzati per preparare un nuovo recipiente di coltura (ad esempio, 2-4 ammassi per recipiente) oppure per eseguire prove di tossicità.

10. Le larve al primo stadio nascono di norma dopo 2-3 giorni.

Allestimento di nuovi recipienti di coltura

11. Una volta avviate le colture, dovrebbe essere possibile allestire un nuovo recipiente per la coltura di larve a cadenza settimanale o meno spesso, secondo quanto richiesto dalla prova, ritirando i recipienti vecchi dopo che i moscerini adulti sono emersi. Questo sistema permette di ottenere regolarmente una quota di adulti con un'organizzazione minima.

Preparazione delle soluzioni di prova M4 e M7

12. Il mezzo M4 è stato descritto da Elendt (1990). Il mezzo M7 è preparato come l'M4 tranne per le sostanze indicate nella tabella 1, le cui concentrazioni nel mezzo M7 sono quattro volte inferiori rispetto al mezzo M4. Una pubblicazione sul mezzo M7 è in preparazione (Elendt, comunicazione personale). La soluzione di prova non deve essere preparata secondo le istruzioni di Elendt e Bias (1990), perché le concentrazioni di $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 indicate per la preparazione delle soluzioni madre non sono adatte.

Preparazione del mezzo M7

13. Ogni soluzione madre (I) è preparata separatamente e a partire da ciascuna di esse (I) si prepara la soluzione madre combinata (II) (cfr. tabella 1). Per preparare il mezzo M7 prelevare 50 ml di soluzione madre combinata (II), mescolarla ai quantitativi di ogni soluzione madre con macronutrienti indicati nella tabella 2 e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata. Per preparare una soluzione madre vitaminica, aggiungere tre vitamine a acqua deionizzata, come indicato nella tabella 3, e versare 0,1 ml della soluzione madre combinata di vitamine al mezzo M7 finale poco prima dell'uso (conservare la soluzione madre vitaminica in congelatore in piccole aliquote). Aerare e stabilizzare il mezzo.

Tabella 1

Soluzioni madre di oligoelementi per i mezzi M4 e M7

Soluzioni madre (I)	Quantità (mg) per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata	Preparazione della soluzione madre combinata (II): mescolare le quantità seguenti (ml) di soluzioni madre (I) e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata		Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluzioni madre (I)	Quantità (mg) per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata	Preparazione della soluzione madre combinata (II): mescolare le quantità seguenti (ml) di soluzioni madre (I) e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata		Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Queste sostanze sono presenti in dosi diverse in M4 e M7, come indicato sopra.
(2) Queste soluzioni sono preparate separatamente, mescolate e messe immediatamente in autoclave.

Tabella 2

Soluzioni madre di macronutrienti per i mezzi M4 e M7

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre di macronutrienti aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzione madre vitaminica per i mezzi M4 e M7

Le tre soluzioni di vitamine sono mescolate in modo da formare un'unica soluzione madre vitaminica

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre vitaminica aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Final concentrations in test solutions M4 and M7 (mg/l)
Tiamina cloridrato	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PREPARAZIONE DEL SEDIMENTO ARTIFICIALE

Composizione del sedimento

Il sedimento è preparato come illustrato nella tabella sottostante:

Componente	Caratteristiche	% di sedimento peso secco
Torba	Torba di sfagno, con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata all'aria	4-5
Sabbia di quarzo	Granulometria: > 50 % delle particelle ha dimensioni comprese tra 50 e 200 µm	75-76
Argilla caolinica	Tenore di caolinite ≥ 30 %	20
Carbonio organico	Regolato aggiungendo torba e sabbia	2 (± 0,5)
Carbonato di calcio	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro	0,05-0,1
Acqua	Conduttività ≤ 10 µS/cm	30-50

Preparazione

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba. Preparare una sospensione della quantità richiesta di polvere di torba in acqua deionizzata utilizzando un omogeneizzatore ad alte prestazioni. Aggiustare il pH della sospensione a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. Conservare per almeno due giorni la sospensione a temperatura di 20 ± 2 °C agitandola leggermente per stabilizzare il pH e favorire il costituirsi di una flora microbica stabile. Misurare nuovamente il pH, che deve essere pari a 6,0 ± 0,5. Successivamente mescolare la sospensione di torba con gli altri componenti (sabbia e argilla caolinica) e con acqua deionizzata, fino ad ottenere un sedimento omogeneo con tenore in acqua pari al 30-50 % del peso secco del sedimento. Misurare ancora una volta il pH della miscela finale e aggiustare a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ se necessario. Prelevare campioni del sedimento per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico. Prima di impiegare il sedimento artificiale in una prova di tossicità su chironomidi, si consiglia di conservarlo per sette giorni alle stesse condizioni in cui si realizzerà la prova.

Conservazione

I componenti secchi destinati alla preparazione del sedimento artificiale possono essere conservati in luogo fresco e asciutto, a temperatura ambiente. Il sedimento artificiale (umido) non può essere conservato prima del suo impiego per la prova, ma deve essere utilizzato subito dopo il periodo di riposo di 7 giorni che ne conclude la preparazione.

BIBLIOGRAFIA

Capitolo C.8 del presente allegato. Tossicità per i lombrichi.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Appendice 4

Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

Sostanza	Concentrazioni
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Durezza espressa come $CaCO_3$	< 400 mg/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

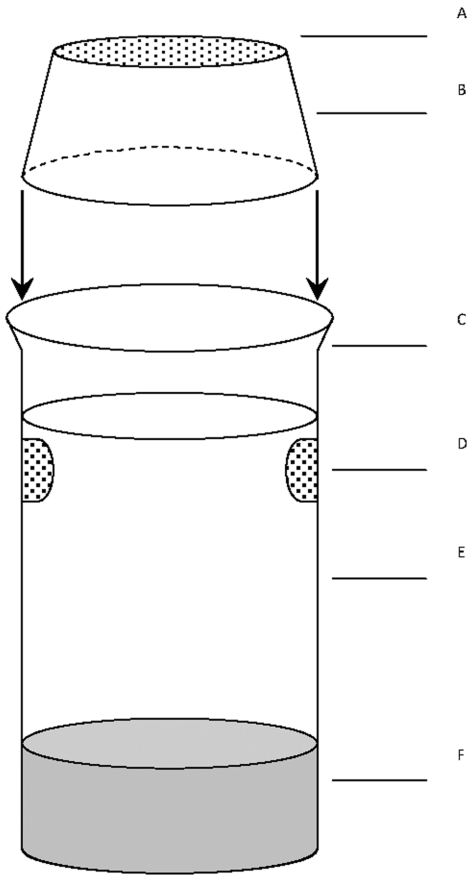
(*) Utilizzare un'acqua meno dura se si sospetta il rischio di un'interazione tra gli ioni che provocano la durezza e la sostanza in esame (nel qual caso il mezzo Elendt M4 non può essere usato).

▼**M4**

Appendice 5

Indicazioni per monitorare l'emergenza delle larve di chironomidi

A partire dal 20º giorno fino alla fine della prova è necessario collocare dei contenitori «trappola» in cima ai becher utilizzati per la prova. Un esempio di trappola è raffigurato nell'immagine sottostante.



A: reticella di nylon (del tipo zanzariera)

B: contenitore di plastica capovolto

C: becher senza beccuccio

D: aperture protette da reticella attraverso cui si effettua il ricambio d'acqua

E: acqua

F: sedimento

▼M4

C.29. PRONTA BIODEGRADABILITÀ — CO_2 IN RECIPIENTI ERMETICI (prova del CO_2 nello spazio di testa)

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE n. 310 (2006). Si tratta di un metodo di screening che consente di valutare la pronta biodegradabilità delle sostanze chimiche e che fornisce informazioni analoghe ai sei metodi di prova descritti nel capitolo C.4 del presente allegato (da A a F). Pertanto, una sostanza chimica che risulta positiva a questo metodo di prova può essere considerata prontamente biodegradabile e quindi rapidamente biodegradabile nell'ambiente.

2. L'ormai consolidato metodo del biossido di carbonio (CO_2) (1), basato sul test originale di Sturm (2) che permette di valutare la biodegradabilità delle sostanze chimiche organiche misurando il biossido di carbonio prodotto dall'attività microbica, è in genere quello che meglio si presta a saggiare le sostanze chimiche poco solubili e quelle fortemente adsorbenti. È utilizzato anche per le sostanze solubili (ma non volatili), poiché molti ritengono che lo sviluppo di biossido di carbonio sia l'unica prova inequivocabile dell'attività microbica. L'eliminazione del carbonio organico disciolto può avvenire mediante processi fisico-chimici (adsorbimento, volatilizzazione, precipitazione, idrolisi), nonché ad opera dell'azione microbica e di molte reazioni non biologiche che consumano ossigeno; è raro che il CO_2 sia prodotto a partire da prodotti chimici organici per via abiotica. Nel test di Sturm originale e in quello modificato (1) (2), il CO_2 è estratto dalla fase liquida ed inviato negli assorbitori per gorgogliamento (ossia insufflando nel mezzo liquido l'aria trattata per eliminare il CO_2), mentre nella versione di Larson (3) (4) è trasferito dal reattore agli assorbitori facendo passare nello spazio di testa un flusso d'aria priva di CO_2 e, in più, agitando il reattore in continuo. Solo nella versione modificata di Larson il reattore viene agitato; l'agitazione è prescritta solo per le sostanze insolubili nella norma ISO 9439 (5) e nella versione originale degli Stati Uniti (6), entrambe le quali prescrivono il gorgogliamento invece della sostituzione dell'aria nello spazio di testa. In un altro metodo ufficiale dell'agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (US EPA) (7), che si basa sul metodo di Gledhill (8), il reattore agitato è chiuso ermeticamente e il CO_2 prodotto è raccolto direttamente dalla fase gassosa in una trappola alcalina interna, come nel respirometro classico di Warburg/Barcroft.

3. È stato tuttavia dimostrato, nell'applicazione della prova standard modificata di Sturm a varie sostanze chimiche (9), che il carbone inorganico si accumula nel mezzo. Nella degradazione di 20 mg C/l di anilina, ad esempio, si è osservata una concentrazione di carbonio inorganico dell'ordine di 8 mg/l, da cui si è desunto che la raccolta di CO_2 nelle trappole alcaline non rispecchia la quantità reale di CO_2 prodotta dall'azione microbica nelle fasi intermedie della degradazione. Pertanto, la prescrizione secondo la quale, per poter classificare la sostanza in esame come prontamente biodegradabile, è necessario raggiungere una produzione di CO_2 superiore al 60 % della produzione massima teorica ($ThCO_2$) nella fase di crescita di 10 giorni («time window», ossia i 10 giorni immediatamente successivi al raggiungimento della soglia del 10 % di biodegradazione) non è rispettata nel caso di alcune sostanze chimiche che rientrerebbero in questa categoria utilizzando come criterio l'eliminazione del carbonio organico disciolto (DOC).

4. Quando la degradazione percentuale è inferiore al valore previsto, è probabile che una quantità di carbonio inorganico si sia accumulata nella soluzione di prova. La degradabilità può allora essere valutata tramite le altre prove di pronta biodegradabilità.

▼M4

5. Altri inconvenienti del metodo di Sturm (laboriosità, tempi lunghi, propensione a errori sperimentali e non applicabilità alle sostanze chimiche volatili) avevano già indotto i ricercatori ad orientarsi verso una tecnica con recipienti ermetici, diversa da quella di Gledhill, prescindendo dall'uso di un flusso di gas continuo (10) (11). Boatman *et al.* (12) hanno riveduto i primi metodi e hanno adottato un sistema con spazio di testa chiuso, in cui il CO_2 è liberato nello spazio di testa alla fine dell'incubazione mediante acidificazione del mezzo. Il CO_2 era misurato per gascromatografia/analisi del carbonio inorganico in campioni prelevati automaticamente dallo spazio di testa, senza però tenere conto del carbonio inorganico disciolto (DIC) nella fase liquida. Inoltre, i recipienti utilizzati erano molto piccoli (20 ml) e contenevano soltanto 10 ml di mezzo, il che era fonte di problemi, ad esempio quando si aggiungevano quantità necessariamente molto piccole di sostanze chimiche insolubili, e/o per il fatto che il mezzo inoculato rischiava di non contenere affatto i microrganismi in grado di degradare le sostanze in esame o di contenerli in un numero insufficiente.

6. Tali problemi sono stati risolti dagli studi indipendenti di Struijs e Stoltenkamp (13) e di Birch e Fletcher (14), questi ultimi ispirati dalla loro esperienza con le apparecchiature utilizzate nella prova di biodegradazione anaerobica (15). Nel primo metodo (13) il CO_2 era misurato nello spazio di testa dopo l'acidificazione e l'equilibrazione, mentre nel secondo (14) il DIC era misurato nelle fasi gassosa e liquida, senza trattamento; più del 90 % del carbonio inorganico formatosi era presente nella fase liquida. Entrambi i metodi presentavano vantaggi rispetto al test di Sturm: poggiavano su un sistema sperimentale più compatto e maneggevole, si applicavano anche alle sostanze chimiche volatili ed evitavano che la misurazione del CO_2 prodotto fosse ritardata.

7. I due approcci sono stati combinati nella norma ISO sul CO_2 nello spazio di testa (16), che è stata sottoposta a prove interlaboratorio (17) e costituisce la base del presente metodo di prova. Essi sono stati anche utilizzati nel metodo dell'EPA (18). Sono stati raccomandati due metodi di misurazione del CO_2: il CO_2 nello spazio di testa dopo acidificazione (13) e il carbonio inorganico nella fase liquida dopo l'aggiunta di un agente alcalino in eccesso. Quest'ultimo è stato introdotto da Peterson nel corso della prova interlaboratorio, condotta da CONCAWE (19), del presente metodo dello spazio di testa modificato, per misurare la biodegradabilità intrinseca. Nel 1992 è stata effettuata una revisione dei metodi di cui al capitolo C.4 del presente allegato per la pronta biodegradabilità (20) e le modifiche apportate in quella sede sono state integrate nel metodo di prova qui descritto, cosicché le condizioni (mezzo, durata ecc.) sono per il resto identiche a quelle del test di Sturm riveduto (20). Birch e Fletcher (14) hanno dimostrato che, sulle stesse sostanze, la prova dello spazio di testa dava risultati molto simili a quelli della prova interlaboratorio condotta dall'OCSE (21) dei metodi di prova riveduti.

PRINCIPIO DEL METODO

8. La sostanza chimica in esame, normalmente a una concentrazione di 20 mg C/l e unica fonte di carbonio ed energia, è incubata in un tampone a base di sali minerali in cui è stata inoculata una popolazione mista di microrganismi. La prova è eseguita in bottiglie ermeticamente chiuse contenenti aria nello spazio di testa, che costituisce una riserva di ossigeno per la biodegradazione aerobica. Si determina il CO_2 sviluppatosi dalla biodegradazione aerobica completa della sostanza in esame misurando la quantità eccedente di carbonio inorganico prodotta nelle bottiglie rispetto a quella prodotta nelle bottiglie di controllo, che contengono solo il mezzo inoculato. Il grado di biodegradazione è espresso come percentuale della produzione massima teorica di carbonio inorganico (ThIC), in base alla quantità di sostanza chimica in esame (in carbonio organico) aggiunta all'inizio.

9. È anche possibile misurare l'eliminazione del DOC e/o il grado di biodegradazione primaria della sostanza chimica in esame (20).

▼M4

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

10. Per poter calcolare la percentuale di degradazione occorre conoscere il tenore (% del peso) di carbonio organico della sostanza chimica in esame, desumendolo dalla sua struttura chimica oppure misurandolo. Per le sostanze volatili, è utile misurare o calcolare la costante di Henry per determinare un rapporto adeguato tra il volume dello spazio di testa e quello di liquido. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i microrganismi aiutano a scegliere la concentrazione sperimentale adatta e a interpretare i risultati quando indicano scarsa biodegradabilità: si raccomanda di includere un controllo per l'inibizione, tranne nel caso in cui si sappia che la sostanza in esame non inibisce l'attività microbica (cfr. paragrafo 24).

APPLICABILITÀ DEL METODO

11. La prova si applica alle sostanze chimiche idrosolubili e insolubili, purché la sostanza in esame sia ben dispersa. Se per il rapporto volumico spazio di testa/liquido si applica il rapporto raccomandato di 1:2, le sostanze volatili la cui costante di Henry non supera 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ possono essere saggiate, poiché la porzione di sostanza in esame nello spazio libero non sarà superiore all'1 % (13). Si può utilizzare uno spazio di testa di volume inferiore per saggiare sostanze chimiche più volatili, la cui biodisponibilità rischia tuttavia di essere limitante soprattutto se sono poco idrosolubili. L'operatore deve però assicurarsi che il rapporto volumico spazio di testa/liquido e la concentrazione della sostanza in esame lascino ossigeno in quantità sufficiente da permettere il compiersi di una biodegradazione aerobica completa (evitando, ad esempio, di usare un substrato molto concentrato e uno spazio di testa ridotto). Ulteriori orientamenti a questo proposito si trovano nei riferimenti bibliografici (13) e (23).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

12. Occorre verificare il procedimento sperimentale saggiando in parallelo una sostanza di riferimento la cui biodegradabilità sia nota. A tal fine si può ricorrere all'anilina, al benzoato di sodio o al glicol etilenico quando si saggiano sostanze chimiche idrosolubili, e all'1-ottanolo quando si saggiano sostanze chimiche poco solubili (13). La biodegradazione di queste sostanze deve essere superiore al 60 % della ThIC dopo 14 giorni.

RIPRODUCIBILITÀ

13. Dalla prova interlaboratorio del metodo realizzata dall'ISO (17) sono emersi i seguenti risultati, ottenuti applicando le condizioni raccomandate, ivi compresa la concentrazione della sostanza in esame pari a 20 mg C/l.

Sostanza chimica in esame	Percentuale media di biodegradazione (28 giorni)	Coefficiente di variazione (%)	Numero di laboratori
Anilina	90	16	17
1-ottanolo	85	12	14

Con l'anilina, la variabilità interna della prova (riproducibilità) è risultata bassa, con coefficienti di variabilità non superiori a 5 % in quasi tutte le prove. Nei due casi con peggiore riproducibilità, la causa è probabilmente una produzione elevata di carbonio inorganico nei controlli. La riproducibilità con l'1-ottanolo ha dato risultati meno soddisfacenti, risultando comunque inferiore al 10 % nel 79 % delle prove. Questa maggiore variabilità interna della prova potrebbe derivare da errori di dosaggio, dato che il volume di 1-ottanolo da iniettare nelle bottiglie era assai piccolo (3 to 4 µl). Si osservano coefficienti di variazione più alti quando si utilizzano concentrazioni più deboli della sostanza in esame, in particolare al di sotto di 10 mg C/l. Si può in parte ovviare a questo inconveniente riducendo la concentrazione del carbonio inorganico totale (TIC) nell'inoculo.

▼M4

14. Una prova interlaboratorio, organizzata dall'UE (24), di cinque tensioattivi a una concentrazione di 10 mg C/l ha dato i seguenti risultati:

Sostanza chimica in esame	Percentuale media di biodegradazione (28 giorni)	Coefficiente di variazione (%)	Numero di laboratori
Tetrapropilenbenzene solfonato	17	45	10
Di-isoottilsulfosuccinato (anionico)	72	22	9
Cloruro di esadecil-trimetilammonio (*) (cationico)	75	13	10
Isononilfenolo(etossilato)$_9$ (non ionico)	41	32	10
Cocoamidopropil dimetilidrossi sulfobetaina (anfotero)	60	23	11

(*) Il SiO_2 è stato aggiunto per neutralizzare la tossicità.

Dai risultati si ricava che in generale la variabilità è maggiore per i tensioattivi meno degradabili. La variabilità interna della prova è stata inferiore al 15 % in più del 90 % dei casi, senza mai superare il 30-40 %.

NB: La maggior parte dei tensioattivi non sono specie molecolari semplici bensì miscele di isomeri, omologhi ecc. che degradano dopo periodi di latenza diversi e a diverse velocità cinetiche, dando luogo a curve poco nette, attenuate, cosicché la soglia del 60 % rischia di non essere raggiunta nell'arco dei 10 giorni, anche se ogni singola specie molecolare, se saggiata isolatamente, la raggiungerebbe. Questo fenomeno può essere osservato anche con altre miscele complesse.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

15. Normale attrezzatura da laboratorio e:

a) bottiglie da siero, chiuse ermeticamente con tappi di butile e ghiere di alluminio. La capacità raccomandata è di 125 ml, ossia un volume totale di circa 160 ml (nel qual caso il volume noto di ciascuna bottiglia deve essere di 160 ± 1 ml). Si possono utilizzare bottiglie più piccole se i risultati soddisfano le condizioni di cui ai paragrafi 66 e 67;

b) analizzatore di carbonio o altro strumento (ad esempio, gascromatografo) per misurare il carbonio inorganico;

▼M4

c) siringhe ad alta precisione per i campioni gassosi e liquidi;

d) agitatore orbitale in ambiente termostatato;

e) flusso d'aria priva di CO_2 — può esser preparata facendo passare un flusso d'aria attraverso granuli di calce sodata o impiegando una miscela gassosa costituita da 80 % di N_2 e 20 % di 0_2 (facoltativo) (cfr. paragrafo 28);

f) dispositivo di filtrazione su membrana con porosità da 0,20 a 0,45 μm (facoltativo);

g) analizzatore di carbonio organico (facoltativo).

Reagenti

16. Impiegare sempre reagenti di grado analitico.

Acqua

17. Utilizzare acqua distillata o deionizzata con contenuto totale di carbonio organico ≤ 1 mg/l. Questo valore rappresenta una quantità ≤ 5 % del tenore iniziale di carbonio organico introdotto dalla dose raccomandata della sostanza chimica in esame.

Soluzioni madre per il mezzo a base di sali minerali

18. Le soluzioni madre e il mezzo a base di sali minerali sono simili a quelli della norma ISO 14593 (16) e delle prove di «pronta biodegradabilità» descritte nel capitolo C.4 (20). Una concentrazione più alta di cloruro di ammonio (2,0 g/l invece di 0,5 g/l) è da usarsi solo in casi molto eccezionali, ad esempio quando la concentrazione della sostanza in esame eccede i 40 mg C/l. Le soluzioni madre devono essere conservate al freddo e per non più di sei mesi, o per meno tempo se si osserva una precipitazione o una proliferazione microbica. Preparare le soluzioni madre seguenti:

a) diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4) 8,50 g

idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4) 21,75 g

sodio idrogenofosfato diidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

cloruro d'ammonio (NH_4Cl) 0,50 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro. Questa soluzione deve avere un pH pari a 7,4 (± 0,2). Se così non fosse, preparare una nuova soluzione;

b) cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro;

c) solfato di magnesio eptaidrato ($Mg_2SO_4.7H_20$) 22,50 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro;

d) cloruro di ferro (III) esaidrato ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Sciogliere in acqua portando a 1 litro e aggiungere una goccia di HCl concentrato.

Preparazione del mezzo minerale

19. Mescolare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua (paragrafo 17), aggiungere 1 ml delle soluzioni (b), (c) e (d) e portare a 1 litro con acqua (paragrafo 17).

Altri reagenti

20. Acido fosforico concentrato (H_3PO_4) (> 85 % massa per volume).

▼M4

Soluzione di idrossido di sodio 7M

21. Sciogliere 280 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1 litro di acqua (paragrafo 17). Determinare la concentrazione di DIC di questa soluzione e tenere conto di questo valore nel calcolo del risultato della prova (cfr. paragrafi 55 e 61), in particolare alla luce del criterio di validità di cui al paragrafo 66, lettera b). Preparare una nuova soluzione se la concentrazione di DIC è troppo alta.

Sostanza chimica in esame

22. Preparare una soluzione madre di una sostanza chimica sufficientemente solubile in acqua (paragrafo 17) oppure nel mezzo di prova (paragrafo 19), a una concentrazione di preferenza 100 volte superiore alla concentrazione finale da utilizzarsi nella prova; può essere necessario aggiustare il pH della soluzione madre. La soluzione madre deve essere aggiunta al mezzo minerale in modo da ottenere una concentrazione finale di carbonio organico tra 2 e 40 mg C/l. di preferenza 20 mg C/l. Concentrazioni più basse rischiano di diminuire la precisione. Le sostanze liquide solubili e insolubili possono essere introdotte direttamente nei recipienti con siringhe ad alta precisione. Le sostanze chimiche poco solubili e insolubili possono richiedere un trattamento speciale (25), da scegliere tra i seguenti:

a) aggiunta diretta delle aliquote pesate note;

b) dispersione ultrasonica prima dell'aggiunta;

c) dispersione con l'ausilio di agenti emulsionanti di cui occorre stabilire, prima dell'aggiunta, se esercitano un effetto inibitorio o stimolante sull'attività microbica;

d) adsorbimento della sostanza in esame liquida, o di una soluzione della sostanza in esame in un solvente volatile adeguato, su un mezzo o un supporto inerte (ad esempio un filtro in fibra di vetro), seguito dall'evaporazione del solvente, se utilizzato, e dall'aggiunta diretta delle aliquote note;

e) introduzione in un recipiente vuoto di un'aliquota nota di una soluzione della sostanza chimica in esame in un solvente facilmente volatile, seguita da evaporazione del solvente.

Occorre saggiare gli agenti o i solventi di cui alle lettere c), d) ed e) per verificare se hanno un effetto stimolante o inibitorio sull'attività microbica [cfr. paragrafo 42, lettera b)].

Sostanze chimiche di riferimento

23. Preparare una soluzione madre della sostanza chimica di riferimento (solubile) in acqua (paragrafo 17), a una concentrazione di preferenza 100 volte superiore alla concentrazione finale (20 mg C/l) da utilizzarsi nella prova.

Verifica dell'inibizione

24. Si osserva spesso che le sostanze chimiche in esame non si degradano in modo significativo nelle condizioni sperimentali stabilite nelle prove per valutare la pronta biodegradazione. Ciò potrebbe essere causato dal fatto che la sostanza in esame esercita un effetto inibitore sull'inoculo alla concentrazione alla quale è saggiata. Il disegno sperimentale può prevedere una verifica dell'effetto inibitore, per facilitare l'individuazione (in retrospettiva) dell'inibizione come causa possibile o fattore concomitante, oppure, al contrario, per dissipare questa ipotesi e mostrare che la degradazione debole o nulla è imputabile unicamente al fatto che i microrganismi non attaccano la sostanza nelle condizioni in cui è condotta la prova. Per ottenere informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (aerobici), preparare una soluzione nel mezzo di prova contenente la sostanza in esame e la sostanza di riferimento (paragrafo 19), ciascuna alle stesse concentrazioni utilizzate nel mezzo di prova (cfr. paragrafi 22 e 23).

▼M4

Inoculo

25. L'inoculo può essere di varia origine: fanghi attivi, acqua di scarico (non clorata), acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi elementi (20). Occorre verificare l'attività di biodegradazione dell'origine utilizzando una sostanza chimica di riferimento. Indipendentemente dall'origine, non utilizzare microrganismi che sono già stati esposti alla sostanza in esame se il procedimento è destinato a una prova per determinare la pronta biodegradabilità.

Attenzione: il fango attivo e l'acqua di scarico contengono organismi patogeni e devono essere manipolati con cautela.

26. In base all'esperienza acquisita, il volume ottimale dell'inoculo è quello che soddisfa le seguenti condizioni:

— è sufficiente a fornire un'adeguata attività di biodegradazione,

— degrada la sostanza chimica di riferimento alla percentuale prestabilita (cfr. paragrafo 66),

— fornisce da 10^2 a 10^5 unità formanti colonie per millilitro nella miscela finale,

— dà luogo normalmente a una concentrazione di 4 mg/l di solidi sospesi nella miscela finale quando si usa fango attivo; possono essere impiegate concentrazioni fino a 30 mg/l, tenendo presente che rischiano di aumentare notevolmente la produzione di CO_2 nei bianchi (26),

— costituisce meno del 10 % della concentrazione iniziale di carbonio organico introdotto dalla sostanza chimica in esame,

— equivale generalmente a un quantitativo compreso tra 1 ml e 10 ml di inoculo per litro di soluzione di prova.

Fango attivo

27. Raccogliere un campione di fango attivo fresco dal serbatoio di aerazione di un impianto di trattamento o da un'unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente liquami domestici. Se necessario, setacciarlo per rimuovere le particelle grossolane (con un setaccio a maglia da 1 mm^2) e mantenerlo in condizioni aerobiche sino al momento dell'uso.

28. In alternativa, far decantare o centrifugare (per esempio a 1 100 g per 10 minuti) dopo la rimozione delle eventuali particelle grossolane. Scartare il surnatante. Il fango può essere lavato nella soluzione minerale. Sospendere il fango concentrato nel mezzo minerale per ottenere una concentrazione di 3-5 g di solidi sospesi/l e aerare finché sia necessario.

29. Il fango deve essere prelevato da un impianto di trattamento convenzionale ben funzionante. Se il fango è stato prelevato da un impianto ad alta potenzialità o si ritiene contenga inibitori deve essere lavato. Decantare o centrifugare il fango risospeso dopo accurata miscelazione, scartare il surnatante e risospendere il fango lavato in un volume ulteriore di mezzo minerale. Ripetere questa procedura fino a quando il fango può essere considerato esente da substrato e inibitori in eccesso.

30. Prelevare un campione di fango risospeso (a risospensione ultimata) oppure di fango non trattato appena prima di utilizzarlo per determinare il peso secco dei solidi sospesi.

31. Un'ulteriore alternativa è quella di omogeneizzare il fango attivo (3-5 g di solidi sospesi/l). Trattare il fango in un miscelatore Waring per due minuti a velocità media. Decantare il fango miscelato per 30 minuti, o più a lungo se necessario, e utilizzare il liquido sovrastante come inoculo nel rapporto di 10 ml per litro di mezzo minerale.

▼M4

32. È possibile ottenere una riduzione ulteriore dello sviluppo di CO_2 nel bianco aerando il fango tutta una notte con aria priva di CO_2. In questa prova la concentrazione dell'inoculo deve essere pari a 4 mg/l di solidi di fanghi attivi (13).

Effluenti secondari

33. L'inoculo può provenire anche da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio che riceve prevalentemente liquami domestici. Conservato in condizioni aerobiche, il campione può essere utilizzato il giorno del prelievo oppure può essere precondizionato, se necessario. Filtrare l'effluente con un filtro grossolano per rimuovere le parti solide più evidenti e misurarne il pH.

34. Per ridurre il tenore di carbonio inorganico del filtrato, lo si fa gorgogliare insufflandogli aria priva di CO_2 [paragrafo 15, lettera e)] per 1 ora, mantenendo il pH a 6,5 con acido fosforico (paragrafo 20). Riportare il pH al valore di partenza con dell'idrossido di sodio (paragrafo 21) e, dopo decantazione di circa 1 ora, prelevare un volume appropriato di surnatante per l'inoculo. Questa procedura riduce il tenore di carbonio inorganico nell'inoculo. Ad esempio, se si utilizza il volume massimo raccomandato di effluente filtrato e gorgogliato (100 ml) per litro come inoculo, la quantità di carbonio inorganico nei bianchi è compresa tra 0,4 e 1,3 mg/l (14), il che rappresenta da 2 % a 6,5 % del carbonio della sostanza in esame, per una concentrazione di 20 mg C/l, e da 4 % a 13 %, per una concentrazione di 10 mg C/l.

Acque superficiali

35. Da un'acqua superficiale adeguata si preleva un campione che sarà conservato in condizioni aerobiche e impiegato il giorno stesso del prelievo. Se necessario, concentrare il campione filtrandolo o centrifugandolo. Il volume dell'inoculo da utilizzare in ogni recipiente di prova deve soddisfare i criteri di cui al paragrafo 26.

Terreno

36. Prelevare un campione di terreno appropriato, a una profondità massima di 20 cm sotto la superficie del terreno. Occorre asportare le pietre, i residui di piante e gli invertebrati prima di passare il campione attraverso un setaccio con maglia di 2 mm (se il campione è troppo umido da non poter essere setacciato immediatamente, farlo asciugare parzialmente all'aria). Va conservato in condizioni aerobiche e impiegato il giorno stesso del prelievo (se il campione è trasportato in una busta di polietilene con la chiusura non ermetica può essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 4 °C nella busta stessa fino a un mese).

Precondizionamento dell'inoculo

37. L'inoculo può essere precondizionato in base alle condizioni in cui si svolgerà la prova, ma non può essere preadattato alla sostanza in esame. Il precondizionamento può diminuire lo sviluppo di CO_2 nel bianco. Il precondizionamento consiste nell'aerare il fango attivo, dopo averlo diluito nel mezzo di prova a 30 mg/l, con aria umida priva di CO_2 per un periodo fino a 5-7 giorni alla temperatura in cui si svolgerà la prova.

PROCEDURA SPERIMENTALE

Numero di bottiglie

38. Il numero delle bottiglie [paragrafo 15, lettera a)] necessarie per una prova dipenderà dalla frequenza delle analisi e dalla durata della prova.

39. Si raccomanda di effettuare l'analisi in triplicato dopo un numero di intervalli di tempo sufficiente per poter individuare la fase di crescita di 10 giorni. Alla fine della prova analizzare almeno altre cinque bottiglie sperimentali [paragrafo 15, lettera a)] delle serie a), b) e c) (cfr. paragrafo 42), per poter calcolare gli intervalli di confidenza al 95 % per la percentuale media di biodegradazione.

▼M4

Mezzo inoculato

40. L'inoculo è utilizzato a una concentrazione di 4 mg/l di solidi secchi di fango attivo. Preparare subito prima dell'uso una quantità sufficiente di mezzo inoculato aggiungendo, ad esempio, 2 ml di fango attivo opportunamente trattato (paragrafi da 27 a 32) con concentrazione di 2 000 mg/l a 1 litro di mezzo salino (paragrafo 19). Se si impiega effluenti secondari, aggiungere fino a 100 ml di effluenti (paragrafo 33) a 900 ml di mezzo salino (paragrafo 19) e portare a 1 litro con il mezzo.

Preparazione delle bottiglie

41. Versare aliquote di mezzo inoculato nelle bottiglie di ciascuna replica in modo che il rapporto spazio di testa/liquido sia di 1:2 (ad esempio, introducendo 107 ml in bottiglie dalla capacità di 160 ml). Si possono utilizzare altri rapporti, tenendo però conto dell'avvertenza di cui al paragrafo 11. Indipendentemente dal tipo di inoculo impiegato, occorre aver cura di mescolare correttamente il mezzo inoculato affinché sia distribuito uniformemente nelle bottiglie.

42. Preparare delle serie di bottiglie [paragrafo 15, lettera a)] da destinare ai seguenti usi:

f) recipienti per la prova (denominati F_T) contenenti la sostanza chimica in esame;

g) recipienti per la prova in bianco (denominati F_B) contenenti solo il mezzo di prova e l'inoculo; vanno aggiunte anche tutte le sostanze chimiche, i solventi, gli agenti o i filtri di fibra di vetro usati per introdurre la sostanza in esame nei recipienti di prova;

h) recipienti (denominati F_C) contenenti la sostanza chimica di riferimento per verificare la procedura;

se necessario, recipienti (denominati F_I) per verificare l'eventuale effetto inibitorio della sostanza chimica in esame, contenenti sia la sostanza in esame sia la sostanza di riferimento alle stesse concentrazioni (paragrafo 24) delle bottiglie F_T e F_C.

j) recipienti (denominati F_S) per verificare l'eventuale degradazione abiotica: si tratta di recipienti come in a) a cui si sono aggiunti 50 mg/l di $HgCl_2$ o che sono stati sterilizzati in altro modo (ad esempio, autoclave).

43. Introdurre nelle bottiglie, sotto forma di soluzioni madre acquose (paragrafi 22, 23 e 24), le sostanze chimiche solubili in esame e quelle di riferimento in modo da ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 20 mg C/l.

44. Le sostanze chimiche insolubili in esame e di riferimento possono essere introdotte nelle bottiglie in svariati modi [cfr. paragrafo 22, lettere da a) a e)], in funzione della natura della sostanza in esame, prima o dopo l'aggiunta del mezzo inoculato, secondo il metodo di trattamento della sostanza in esame. Se si ricorre a uno dei procedimenti indicati nel paragrafo 22, lettere da a) a e), le bottiglie per il bianco F_B [paragrafo 42, lettera b)] devono essere trattate allo stesso modo, salvo non contenere la sostanza in esame o quella di riferimento.

45. Iniettare con una microsiringa le sostanze chimiche in esame volatili nelle bottiglie ermeticamente chiuse (paragrafo 47). La dose è calcolata in base al volume iniettato e alla densità della sostanza in esame.

46. Se necessario, aggiungere acqua nei recipienti affinché il volume di liquido sia identico in tutti i recipienti. Assicurarsi che il rapporto spazio di testa/liquido (normalmente di 1:2) e la concentrazione della sostanza in esame siano tali da garantire la presenza di ossigeno nello spazio di testa in quantità sufficiente a permettere la biodegradazione completa.

▼M4

47. Chiudere ermeticamente tutte le bottiglie, ad esempio con tappi di butile e ghiere di alluminio. È in questa fase che vanno aggiunte le sostanze in esame volatili (paragrafo 45). Se si deve monitorare la diminuzione della concentrazione di DOC della soluzione sperimentale e analizzare al tempo zero la concentrazione iniziale di carbonio inorganico [controlli sterili, paragrafo 42, lettera e)] o altri parametri, prelevare un campione adeguato dal recipiente di prova. Eliminare successivamente il recipiente di prova e il suo contenuto.

48. Collocare le bottiglie ermeticamente chiuse in un agitatore orbitale [paragrafo 15, lettera d)], regolato a una velocità di rotazione sufficiente a mantenere il contenuto delle bottiglie ben mescolato e in sospensione (ad esempio da 150 a 200 rpm), e incubarle al buio a temperatura costante di 20 °C (± 1 °C).

Campionamento

49. La strategia di campionamento dipende dal periodo di latenza e dalla velocità cinetica di biodegradazione della sostanza chimica in esame. Le bottiglie sono analizzate ed eliminate il giorno stesso del campionamento, che deve avvenire almeno a cadenza settimanale o più di frequente (ad esempio, due volte la settimana) se si deve definire una curva completa di degradazione. Ritirare dall'agitatore il numero necessario di repliche di ogni categoria: F_T, F_B e F_C e, se del caso, F_I e F_S (cfr. paragrafo 42). La prova dura normalmente 28 giorni. Se la curva di biodegradazione indica il raggiungimento di un plateau prima di questo termine, la prova può essere conclusa prima di 28 giorni. Prelevare dei campioni dalle cinque bottiglie destinate ad essere analizzate il 28° giorno della prova e utilizzare i risultati per calcolare gli intervalli di confidenza o il coefficiente di variazione della percentuale di biodegradazione. Le bottiglie destinate a verificare l'inibizione e la degradazione abiotica non devono essere campionate con la stessa frequenza delle altre: basteranno due prelievi, effettuati il 1º e il 28° giorno della prova.

Analisi del carbonio inorganico (IC)

50. La produzione di CO_2 nelle bottiglie è determinata misurando l'aumento della concentrazione di carbonio inorganico durante l'incubazione. Si raccomandano due metodi, descritti di seguito, per misurare la quantità di carbonio inorganico prodotta durante la prova. Poiché possono dare risultati leggermente diversi, nella stessa serie di prove si deve impiegare o l'uno o l'altro metodo.

51. Il metodo (a) è consigliato se si ritiene che il mezzo contenga residui, ad esempio di filtri in fibra di vetro e/o della sostanza in esame insolubile. Se non si dispone di un analizzatore di carbonio, l'analisi può essere eseguita con un gascromatografo. Durante l'analisi del gas nello spazio di testa è importante mantenere le bottiglie alla temperatura in cui è stata condotta la prova, o quantomeno prossime alla stessa. Il metodo (b) può essere di più facile applicazione per i laboratori che impiegano analizzatori di carbonio per misurare il carbonio inorganico. È importante che la soluzione di idrossido di sodio (paragrafo 21) utilizzata per convertire il CO_2 in carbonato sia preparata ex novo oppure che sia noto il suo tenore di carbonio inorganico, in modo da poter tenere conto di questo valore al momento di calcolare i risultati della prova [cfr. paragrafo 66, lettera b)].

Metodo (a): acidificazione a pH < 3

52. Prima di ogni lotto di analisi, l'analizzatore di carbonio inorganico è tarato con una sostanza dal tenore standard di carbonio inorganico (ad esempio una diluizione 1 % p/p di CO_2 in N_2). Iniettare l'acido fosforico concentrato (paragrafo 20) nel tappo di ogni bottiglia campionata per abbassare il pH del mezzo a un valore < 3 (ad esempio, aggiungendo 1 ml a 107 ml di mezzo di prova). Rimettere le bottiglie nell'agitatore. Dopo averle agitate per un'ora alla temperatura in cui è stata condotta la prova, togliere le bottiglie dall'agitatore, prelevare dallo spazio di testa di ciascuna bottiglia delle aliquote di gas (ad esempio, 1 ml) e iniettarle nell'analizzatore di carbonio inorganico. Annotare le concentrazioni di carbonio inorganico misurate esprimendole in mg C/l.

▼M4

53. Questo metodo verte sul principio secondo il quale dopo l'acidificazione a pH < 3 e l'equilibrazione a 20 °C, la costante di equilibrio per la ripartizione del CO_2 tra la fase liquida e la fase gassosa nelle bottiglie è pari a 1,0 se misurata sotto forma di concentrazione (13). Tale rapporto deve essere dimostrato almeno una volta per il sistema sperimentale, nel seguente modo:

allestire delle bottiglie contenenti 5 e 10 mg/l di carbonio inorganico utilizzando una soluzione di carbonato di sodio (Na_2CO_3) in acqua priva di CO_2 preparata acidificando l'acqua a pH 6,5 con acido fosforico (paragrafo 20), facendola gorgorgliare per una notte immettendo aria priva di CO_2 e portando il pH alla neutralità con alcali. Assicurarsi che il rapporto volumico tra lo spazio di testa e il liquido sia lo stesso delle prove (ad esempio 1:2). Acidificare ed equilibrare come indicato nel paragrafo 52 e misurare le concentrazioni di carbonio inorganico nello spazio di testa e nella fase liquida. Verificare che le due concentrazioni siano le stesse, nei limiti dell'errore sperimentale. Se non lo sono, riesaminare il procedimento. Non è necessario verificare la ripartizione del carbonio inorganico tra la fase liquida e quella gassosa ad ogni prova, limitandosi a farlo, ad esempio, durante la taratura.

54. Se occorre misurare l'eliminazione del DOC (unicamente per sostanze idrosolubili), prelevare campioni della fase liquida da bottiglie separate (non acidificate), filtrarli su membrana e iniettarli nell'analizzatore di carbonio organico disciolto. Queste bottiglie possono servire eventualmente per altre analisi, al fine di misurare la biodegradazione primaria.

Metodo (b): conversione del CO_2 in carbonato

55. Prima di ogni lotto di analisi, tarare l'analizzatore di carbonio inorganico mediante uno standard adeguato, ad esempio una soluzione di bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) in acqua priva di CO_2 (cfr. paragrafo 53) a una concentrazione di carbonio inorganico compresa tra 0 e 20 mg per litro. Iniettare una soluzione di idrossido di sodio (7M, paragrafo 21) (ad esempio, aggiungendo 1 ml a 107 ml di mezzo di prova) nel tappo di ogni bottiglia campionata e agitare le bottiglie per un'ora alla temperatura stabilita per la prova. Utilizzare la stessa soluzione di NaOH in tutte le bottiglie analizzate lo stesso giorno, ma non necessariamente in tutte le sessioni di campionamento effettuate nel corso della prova. Se occorre rilevare i valori assoluti del tenore di carbonio inorganico nei bianchi in tutte le sessioni di campionamento, si dovrà determinare il tenore di carbonio inorganico della soluzione di NaOH ogniqualvolta la si utilizza. Togliere le bottiglie dall'agitatore e farle decantare. Prelevare con un siringa da ogni bottiglia un idoneo volume della fase liquida (ad esempio, da 50 a 1 000 µl), iniettare i campioni nell'analizzatore di carbonio inorganico e prendere nota delle concentrazioni di carbonio inorganico. Assicurarsi che l'analizzatore utilizzato sia predisposto a trattare i campioni alcalini ottenuti con questo metodo.

56. Questo metodo verte sul principio secondo il quale dopo l'aggiunta di alcali e l'agitazione, la concentrazione di carbonio inorganico nello spazio di testa è trascurabile. Ciò deve essere verificato almeno una volta nel sistema sperimentale: a tal fine utilizzare gli standard di carbonio inorganico, aggiungere alcali e equilibrare, per poi misurare la concentrazione di carbonio inorganico sia nello spazio di testa che nella fase liquida (cfr. paragrafo 53). La concentrazione nello spazio di testa deve essere praticamente nulla. Non è necessario verificare l'assorbimento pressoché completo di CO_2 ad ogni prova.

57. Se occorre misurare l'eliminazione del DOC (unicamente per sostanze in esame idrosolubili), prelevare campioni della fase liquida da bottiglie separate (non contenenti alcali aggiunti), filtrarli su membrana e iniettarli nell'analizzatore di carbonio organico disciolto. Queste bottiglie possono servire eventualmente per altre analisi, al fine di misurare la biodegradazione primaria.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Calcolo dei risultati

58. Supponendo che la sostanza in esame sia stata mineralizzata al 100 % in CO_2, la produzione massima teorica di carbonio inorganico (ThIC) delle bottiglie di prova in eccesso rispetto ai bianchi è uguale al carbonio organico totale (TOC) aggiunto ad ogni bottiglia all'inizio del saggio, ossia:

$$ThIC = TOC$$

La massa totale (mg) di carbonio inorganico (TIC) in ogni bottiglia è:

$$\begin{aligned} TIC &= (\text{mg di C nel liquido} + \text{ mg di C nello spazio di testa}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{equazione [1]}$$

dove:

V_L = volume di liquido nella bottiglia (litro);

CL = concentrazione di carbonio inorganico nel liquido (mg/l, espressa in carbonio);

VT = volume dello spazio di testa (litro);

CT = concentrazione di carbonio inorganico nello spazio di testa (mg/l, espressa in carbonio).

I calcoli del TIC per i due metodi d'analisi utilizzati per misurare il carbonio inorganico nella presente prova sono descritti di seguito nei paragrafi 60 e 61. La percentuale di biodegradazione (*% D*) in entrambi i casi è data dalla seguente equazione:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{equazione [2]}$$

dove:

TIC_t = mg di TIC nella bottiglia di prova al tempo t;

TIC_b = media dei mg di TIC nelle bottiglie dei bianchi al tempo t;

TOC = mg di TOC aggiunti inizialmente alla bottiglia di prova.

La percentuale di biodegradazione (% D) è calcolata per le bottiglie di prova (F_T), quelle di riferimento (F_C) e, se del caso, quelle destinate alla verifica di un'eventuale effetto inibitore (F_I), in base alle quantità rispettive di TIC prodotte fino al momento di ogni campionamento.

59. Se si osserva un aumento significativo del tenore di TIC nei controlli sterili (F_S) durante il periodo di esecuzione della prova, si può giungere alla conclusione che si è verificata una degradazione abiotica della sostanza in esame di cui occorre tener conto nel calcolo di D nell'equazione [2].

Acidificazione a pH < 3

60. Una volta che l'acidificazione a pH < 3 e il successivo equilibrio hanno dato luogo a un'uniformazione della concentrazione di TIC nella fase liquida e in quella gassosa, basta misurare solo la concentrazione di carbonio inorganico della fase gassosa. Pertanto, in base all'equazione [1] $TIC = (V_L + V_T) \times C_T = V_B \times C_T$, dove V_B = volume della bottiglia da siero.

Conversione del CO_2 in carbonato

61. In questo metodo i calcoli sono effettuati in base all'equazione [1], ma senza tenere conto della quantità trascurabile di carbonio inorganico nella fase gassosa, in modo che $V_T \times C_T = 0$ e $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Espressione dei risultati

62. Tracciare la curva della biodegradazione in un grafico in cui è rappresentata la percentuale di biodegradazione (D) in funzione del tempo di incubazione, indicando, se possibile, le fasi di latenza, biodegradazione, crescita di 10 giorni e plateau, ossia la fase in cui è stata raggiunta la degradazione massima e la curva presenta un andamento orizzontale. Se per le bottiglie di prova F_T saggiate in parallelo si sono ottenuti risultati paragonabili (differenza < 20 %), tracciare la curva media (cfr. appendice 2, fig. 1), altrimenti tracciare una curva per ciascuna bottiglia. Determinare il valore medio della percentuale di biodegradazione nella fase di plateau oppure valutarne il valore massimo (ad esempio, quando la curva scende nella fase di plateau), ma, in quest'ultimo caso, è importante verificare che non sia un valore anomalo (*outlier*). Questo livello massimo di biodegradazione va indicato nella relazione sulla prova come «grado di biodegradazione della sostanza in esame». Se il numero delle bottiglie di prova si è rivelato insufficiente ad indicare una fase di plateau, calcolare un valore medio utilizzando i dati misurati dell'ultimo giorno della prova. Quest'ultimo valore, la media di cinque repliche, serve a indicare la precisione con cui è stata determinata la percentuale di biodegradazione. Nella relazione deve anche figurare il valore ottenuto alla fine della fase di crescita di 10 giorni.

63. Tracciare, allo stesso modo, una curva per la sostanza chimica di riferimento F_C e, eventualmente, per la verifica della degradazione abiotica F_S e per il controllo dell'inibizione F_I.

64. Registrare la quantità di TIC sia dei controlli in bianco (F_B) sia delle bottiglie F_S (verifica abiotica), se queste ultime sono incluse nella prova.

65. Calcolare D per le bottiglie F_I in base al rendimento teorico di carbonio inorganico previsto unicamente in base al componente di riferimento della miscela. Se al 28° giorno $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, si può presumere che la sostanza in esame abbia inibito l'attività dell'inoculo, il che può spiegare i bassi valori di D_{FT} ottenuti alle condizioni della prova. In tal caso, la prova può essere ripetuta con una concentrazione sperimentale inferiore e riducendo di preferenza il DIC nell'inoculo e il TIC formato nei controlli in bianco, dal momento che una diminuzione della concentrazione della sostanza in esame comporta anche una minore precisione del metodo. In alternativa si può utilizzare un altro inoculo. Se nella bottiglia F_S (degradazione abiotica) si osserva un aumento significativo (> 10 %) della quantità di TIC, è possibile che siano avvenuti processi di degradazione abiotica.

Validità dei risultati

66. La prova è considerata valida se:

a) la percentuale media di degradazione nelle bottiglie F_C contenenti la sostanza di riferimento è > 60 % al 14° giorno di incubazione; e

b) la quantità media di TIC nei controlli in bianco F_B alla fine della prova è > 3 mg C/l.

Se questi valori limite non sono raggiunti, occorre ripetere la prova con un inoculo di provenienza diversa e/o rivedere i procedimenti seguiti. Ad esempio, se nel bianco si registra una produzione elevata di carbonio inorganico, è opportuno seguire il procedimento di cui ai paragrafi da 27 a 32.

(1) La percentuale di degradazione nelle bottiglie F_C contenenti la sostanza di riferimento.
(2) La percentuale di degradazione nelle bottiglie F_I

▼M4

67. Se la sostanza chimica in esame non produce il 60 % di ThIC e ha dimostrato di non esercitare alcun effetto inibitore (paragrafo 65), la prova può essere ripetuta aumentando la concentrazione di inoculo (fino a 30 mg/l di fango attivo e 100 ml di effluente/l), oppure con inoculi di altra provenienza, in particolare se la degradazione è stata di un valore compreso tra 20 % e 60 %.

Interpretazione dei risultati

68. Se la sostanza chimica in esame subisce una biodegradazione > 60 % della ThIC nella fase di crescita di 10 giorni nella presente prova significa che è prontamente biodegradabile in condizioni aerobiche.

69. Se il valore-soglia di 60 % della ThIC non è raggiunto, misurare il pH del mezzo contenuto nelle bottiglie che non sono state acidificate o alcalinizzate; un valore inferiore a 6,5 potrebbe indicare un'avvenuta nitrificazione. In tal caso, ripetere la prova con una soluzione tampone più concentrata.

Relazione sulla prova

70. Disegnare un grafico della percentuale di degradazione (% D) rilevata in ogni bottiglia di prova (F_T), di riferimento (F_C) e, se prevista, di verifica dell'inibizione (F_I) per ciascun giorno di campionamento. Se le repliche danno risultati paragonabili, tracciare la curva della percentuale di degradazione media in funzione del tempo. Annotare la quantità di TIC nei bianchi (F_B) e nei controlli sterili (F_S), come pure il DOC e/o altri parametri, insieme alla loro percentuale di eliminazione.

71. Determinare il valore medio della percentuale di biodegradazione nella fase di plateau, oppure utilizzare il valore massimo se la curva di biodegradazione scende nella fase di plateau, e indicare questo valore come «grado di biodegradazione della sostanza in esame». È importante garantire che, nell'ultimo caso, non si tratti di un valore anomalo (*outlier*).

72. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

— nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale e proprietà fisico-chimiche pertinenti,

— purezza (presenza di impurità).

Condizioni sperimentali:

— riferimento al presente metodo di prova,

— descrizione del sistema sperimentale utilizzato (ad esempio, volume della bottiglia, rapporto spazio di testa/liquido, metodo di agitazione ecc.),

— applicazione della sostanza in esame e della sostanza di riferimento nel sistema sperimentale; concentrazione applicata e quantità di carbonio introdotta in ciascuna bottiglia di prova, nonché l'eventuale uso di solventi,

— ragguagli sull'inoculo utilizzato, sull'eventuale pretrattamento e precondizionamento,

— temperatura di incubazione,

— validazione del principio dell'analisi del carbonio inorganico,

— caratteristiche principali dell'analizzatore di carbonio inorganico (e di ogni altro metodo d'analisi eventualmente impiegato),

— numero di repliche.

Risultati:

— dati grezzi e valori calcolati della biodegradabilità presentati su tabella,

▼M4

— grafico della percentuale di degradazione in funzione del tempo per la sostanza in esame e quella di riferimento, fase di latenza, fase di degradazione, fase di crescita di 10 giorni e inclinazione,

— percentuale di eliminazione nella fase di plateau, all'inizio e alla fine della prova e dopo la fase di crescita di 10 giorni,

— giustificazione in caso dell'eventuale rigetto dei risultati della prova,

— qualsiasi altro elemento inerente alla procedura seguita,

— discussione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità — Saggio di sviluppo del CO_2 (Metodo C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (C02 headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

(21) OCSE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Capitolo C.11 del presente allegato, Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Appendice 1

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

IC: carbonio inorganico.

$ThCO_2$: produzione teorica di biossido di carbonio (mg), ossia la quantità di biossido di carbonio prodotto calcolato in base al tenore di carbonio noto o misurato della sostanza in esame quando sia stata completamente mineralizzata; espressa anche come mg di biossido di carbonio sviluppati per mg di sostanza in esame.

DOC: carbonio organico disciolto, ossia il carbonio organico presente in soluzione, che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri o che rimane nel surnatante dopo centrifugazione a ± 4 000 g (40 000 m/s^{-2}) per 15 minuti.

DIC: carbonio organico disciolto.

ThIC: produzione teorica di carbonio inorganico.

TIC: carbonio inorganico totale.

Prontamente biodegradabile: classificazione arbitraria delle sostanze chimiche che hanno superato certe prove specifiche di selezione riguardo alla biodegradabilità ultima; data la rigorosità di queste prove, si suppone che tali composti si degradino biologicamente in modo rapido e completo in ambienti acquosi in condizioni aerobiche.

Fase di crescita di 10 giorni: i 10 giorni che seguono immediatamente il momento in cui la percentuale di degradazione raggiunge il 10 %.

Biodegradabilità intrinseca: classificazione delle sostanze chimiche per le quali vi è una dimostrazione inequivocabile di biodegradazione (primaria o completa) in qualsiasi prova di biodegradabilità.

Biodegradazione aerobica completa: livello di degradazione raggiunto quando la sostanza in esame è completamente utilizzata da microorganismi, con la conseguente produzione di biossido di carbonio, acqua, sali minerali e nuovi costituenti cellulari microbici (biomassa).

Mineralizzazione: completa degradazione di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche.

Fase di latenza: periodo che intercorre tra l'inizio della prova e il momento in cui i microrganismi responsabili della degradazione si sono acclimatati e/o adattati e il livello di degradazione della sostanza chimica o della materia organica ha raggiunto un limite rilevabile (per esempio 10 % della biodegradazione teorica massima, o meno, in funzione dell'accuratezza della tecnica di misura).

Fase di degradazione: periodo che intercorre tra la fine della fase di latenza e il momento in cui è raggiunto il 90 % del livello massimo di degradazione.

Fase di plateau: fase in cui è stata raggiunta la degradazione massima e la curva di biodegradazione presenta un andamento orizzontale.

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

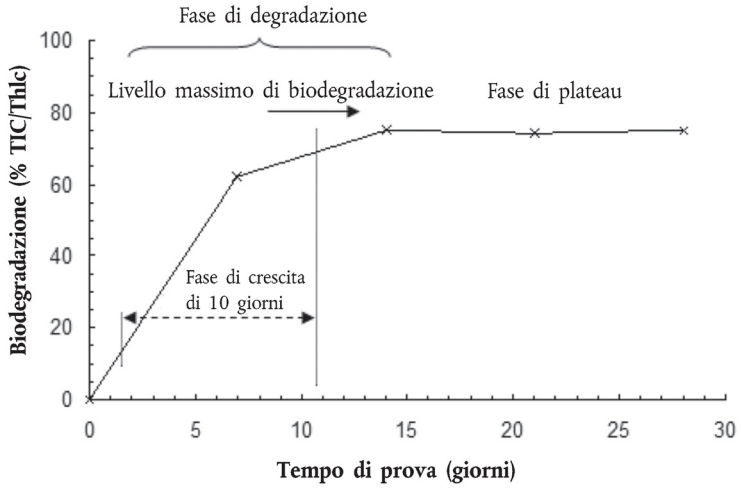
▼M4

Appendice 2

Esempio di curva di biodegradazione

Figura 1

Biodegradazione di 1-ottanolo nella prova del CO_2 nello spazio di testa



Legenda

Biodegradazione

Fase di degradazione

Livello massimo di biodegradazione

Fase di plateau

Fase di crescita di 10 giorni

Tempo di prova (giorni)

▼M4

C.30. BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI TERRESTRI

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 317 (2010). Tra i metodi di prova relativi al destino ambientale, quelli intitolati *Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo* (capitolo C.13 del presente allegato) (49) e *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates* (53) sono stati pubblicati, rispettivamente, nel 1996 e nel 2008. È difficile, se non impossibile, estrapolare i dati sul bioaccumulo in ambiente acquatico e applicarli a organismi terrestri come i lombrichi. Per valutare il bioaccumulo delle sostanze chimiche nel suolo attualmente si utilizzano modelli calcolati basandosi sulla lipofilia della sostanza in esame (14) e (37), come nel documento tecnico di orientamento dell'UE (19). L'esigenza di un metodo di prova specifico per questo compartimento è già stata sollevata (55), in particolare data l'importanza di poter valutare l'avvelenamento secondario nelle catene alimentari terrestri (4). Esistono vari metodi di prova nazionali che vertono sul bioaccumulo in organismi diversi dai pesci, ad esempio (2) e (72). Un metodo di misurazione del bioaccumulo da suoli contaminati nei lombrichi (*Eisenia fetida*, Savigny) e negli enchitreidi è stato messo a punto dall'American Society for Testing and Materials (3). Un metodo di prova riconosciuto a livello internazionale per la determinazione del bioaccumulo in un suolo addizionato consentirà di valutare meglio i rischi posti dalle sostanze chimiche per gli ecosistemi terrestri, ad esempio (25) e (29).

2. Gli invertebrati detritivori sono esposti alle sostanze chimiche presenti nel suolo. Tra questi animali, gli oligocheti terrestri svolgono un ruolo importante nella struttura e nella funzione del suolo (15) (20). Gli oligocheti terrestri vivono nel suolo e in parte sulla sua superficie (in special modo nella lettiera) e costituiscono spesso la specie più abbondante in termini di biomassa (54). Per la loro azione di bioturbazione e a causa della loro funzione di prede, questi animali possono avere un'influenza determinante sulla biodisponibilità delle sostanze chimiche per altri organismi, come i predatori invertebrati [tra cui acari e coleotteri (64)] e invertebrati (quali volpi e gabbiani) (18) e (62). Alcune specie di oligocheti terrestri attualmente impiegate nelle prove ecotossicologiche sono descritte nell'appendice 5.

3. Una fonte di informazioni essenziali che sono servite per l'elaborazione del presente metodo di prova sul bioaccumulo è il manuale dell'ASTM per le prove di laboratorio dedicate alla tossicità del suolo e al bioaccumulo condotte su lombrichi *Eisenia fetida* ed enchitreidi *Enchytraeus albidus* (3). Tra gli altri riferimenti utilizzati figurano il capitolo C.13 Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo (49) e la linea guida dell'OCSE n. 315 *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochate* (53). Fonti di ispirazione altrettanto importanti sono state le esperienze pratiche tratte dagli studi e da diverse pubblicazioni sul bioaccumulo nel suolo, tra cui (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Il presente metodo di prova è per lo più applicabile a sostanze chimiche organiche neutre stabili, che hanno tendenza ad essere adsorbite sul suolo. Esso consente anche di valutare il bioaccumulo di composti organometallici stabili, associati al suolo. Si applica inoltre ai metalli e ad altri oligoelementi.

PREREQUISITI

5. Le prove volte a misurare il bioaccumulo di una sostanza chimica negli oligocheti terrestri sono state eseguite con metalli pesanti [cfr. in particolare (63)] e sostanze organiche persistenti il cui log K_{ow} si situa tra 3,0 e 6,0 (40). Queste prove si applicano anche a:

— sostanze chimiche con un log K_{ow} superiore a 6,0 (sostanze superidrofobe),

▼M4

— sostanze appartenenti alla classe di sostanze organiche note per il loro potenziale di bioaccumulo negli organismi viventi, ad esempio le sostanze fortemente adsorbenti o tensioattive,

— sostanze che, per le loro caratteristiche strutturali, presentano un potenziale di bioaccumulo, ad esempio analoghi di sostanze chimiche con potenziale di bioaccumulo noto, e

— metalli.

6. Prima di iniziare lo studio occorre disporre di talune informazioni sulla sostanza chimica in esame, quali nome comune, nome chimico (di preferenza il nome IUPAC), formula strutturale, numero CAS, purezza, precauzioni, condizioni di conservazione adeguate e metodi di analisi. È inoltre opportuno conoscerne le seguenti proprietà:

a) idrosolubilità;

b) coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua K_{ow};

c) coefficiente di ripartizione terreno-acqua, K_{oc};

d) tensione di vapore;

e) degradabilità (nel suolo o nell'acqua);

f) metaboliti noti.

7. È possibile utilizzare sostanze radiomarcate e no, sebbene, per facilitare l'analisi, si raccomanda di utilizzare una sostanza radiomarcata. Questa decisione dipenderà dai limiti di rivelazione o dalla necessità di misurare il composto progenitore e i suoi metaboliti. Se si impiega una sostanza radiomarcata e si misurano i residui radioattivi totali, è importante che i residui radiomarcati sia nel suolo sia negli organismi sperimentali siano caratterizzati in percentuali del composto progenitore e di quello marcato non progenitore, ad esempio in campioni prelevati allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento, per poter calcolare il fattore di bioaccumulo (BAF) per il composto progenitore e i metaboliti del suolo pertinenti (cfr. paragrafo 50). Può essere necessario modificare il metodo qui descritto, ad esempio per disporre di una biomassa sufficiente a misurare le sostanze in esame organiche non radiomarcate o i metalli. Se si misurano i residui radioattivi totali (per esempio per conteggio in scintillazione liquida dopo estrazione, per combustione o per solubilizzazione dei tessuti), il fattore di bioaccumulo risulta basato sul composto progenitore e sui metaboliti. È preferibile calcolare il BAF in base alla concentrazione del composto progenitore negli organismi e nei residui radioattivi totali. In seguito il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF), normalizzato per il tenore lipidico dei lombrichi e il tenore di carbonio organico (OC), è calcolato a partire dal BAF per garantire la comparabilità dei risultati di diverse prove di bioaccumulo.

8. Occorre conoscere la tossicità della sostanza in esame per le specie utilizzate nella prova, in particolare la concentrazione con effetto (EC_X) o la concentrazione letale (CL_X) per la durata della fase di assorbimento [ad esempio (19)]. La concentrazione scelta per la sostanza in esame deve essere preferibilmente circa l'1 % della sua CL_{50} acuta asintotica e almeno dieci volte superiore del suo limite di rivelabilità nel suolo con il metodo d'analisi utilizzato. Si devono privilegiare, se disponibili, i valori di tossicità ricavati da studi a lungo termine sugli endpoint subletali (51) (52). Se questi dati non sono disponibili, una prova di tossicità acuta apporterà informazioni utili [cfr. ad esempio, (23)].

▼M4

9. Per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di prova, nel suolo e nel materiale biologico, oltre ai dettagli relativi alla preparazione e alla conservazione del campione e alle schede dati sulla sicurezza, è necessario disporre di un metodo analitico appropriato, di accuratezza, precisione e sensibilità note. Devono essere noti anche i limiti di rivelazione analitica nel suolo e nei tessuti del lombrico della sostanza in esame. Quando per la prova si utilizza una sostanza marcata con ^{14}C è necessario conoscere la percentuale di radioattività associata alle impurità. La radioattività specifica della sostanza in esame deve essere abbastanza elevata da facilitare l'analisi, e le concentrazioni sperimentali utilizzate non devono provocare effetti tossici.

10. La prova può essere realizzata con un terreno artificiale o naturale. Prima dell'inizio della prova è opportuno conoscere le caratteristiche del terreno naturale utilizzato, ad esempio l'origine o i componenti, il pH, il tenore di carbonio organico, la distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), e la capacità idrica (WHC) (3) (48).

PRINCIPIO DEL METODO

11. I parametri che caratterizzano il bioaccumulo di una sostanza chimica in esame consistono nel fattore di bioaccumulo (BAF), la costante di velocità di assorbimento (k_s) e la costante di velocità di eliminazione (k_e). Le definizioni di questi parametri figurano nell'appendice 1.

12. La prova consta di due fasi: la fase di assorbimento (esposizione) e la fase di eliminazione (post-esposizione). Durante la fase di assorbimento varie repliche di gruppi di lombrichi vengono esposte al terreno a cui è stata addizionata la sostanza in esame. Oltre agli animali sperimentali, gruppi di lombrichi di controllo sono mantenuti in condizioni identiche senza la sostanza in esame. Si misura il peso secco e il contenuto di lipidi degli organismi sperimentali, utilizzando eventualmente i lombrichi del gruppo di controllo. I valori di fondo (bianco) possono essere ottenuti analizzando campioni di lombrichi e del terreno di controllo. Per la fase di eliminazione i lombrichi sono trasferiti in un terreno privo della sostanza in esame. A meno che l'assorbimento della sostanza in esame durante la fase di esposizione sia stato insignificante, la fase di eliminazione è sempre necessaria, perché è in questa fase che si raccolgono le informazioni sulla velocità alla quale la sostanza in esame è escreta dagli organismi sperimentali [ad esempio (27)]. Se uno stato stazionario non è stato raggiunto nella fase di assorbimento, è preferibile determinare i parametri cinetici — fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione — basandosi sull'adattamento simultaneo dei risultati delle fasi di assorbimento ed eliminazione. La concentrazione della sostanza in esame nei/sui lombrichi è monitorata per l'intera durata delle due fasi della prova.

13. Durante la fase di assorbimento, le misurazioni sono effettuate in periodi di campionamento la cui durata massima è di 14 giorni per gli enchitreidi e 21 giorni per i lombrichi, fino a quando non venga raggiunto lo stato stazionario (11) (12) (67). Lo stato stazionario è raggiunto quando, nel tracciato della concentrazione negli organismi sperimentali in funzione del tempo, la curva diviene parallela all'asse del tempo e da tre analisi successive della concentrazione su campioni prelevati a intervalli di almeno due giorni si ottengono valori che non divergono tra loro più del ± 20 % sulla base di raffronti statistici (ad esempio, analisi della varianza, analisi di regressione).

14. La fase di eliminazione consiste nel trasferire gli organismi sperimentali in recipienti che contengono lo stesso substrato ma senza la sostanza in esame. In questa fase le misurazioni sono effettuate in periodi di campionamento la cui durata massima è di 14 giorni per gli enchitreidi e 21 giorni per i lombrichi, a meno che un'analisi effettuata prima di questi termini non mostri una diminuzione del 90 % dei residui della sostanza in esame negli organismi sperimentali. La concentrazione della sostanza in esame negli

▼M4

organismi alla fine della fase di eliminazione è riportata nella relazione come residui non eliminati. Il fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}) è calcolato di preferenza sia come il rapporto tra la concentrazione negli organismi (Ca) e nel suolo (Cs) ad uno stato stazionario apparente, sia come fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), ossia come il rapporto tra la costante di velocità d'assorbimento dal suolo (ks) e la costante di velocità di eliminazione (ke) (cfr. definizioni nell'appendice 1) presupponendo una cinetica di primo ordine (cfr. calcoli nell'appendice 2). Se la cinetica di primo ordine non è manifestamente applicabile è opportuno ricorrere ad altri modelli.

15. La costante di velocità di assorbimento, la costante di velocità di eliminazione (o le costanti, se si utilizzano altri modelli), il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K) e, se possibile, gli intervalli di confidenza di ciascuno di questi parametri sono calcolati a partire dalle equazioni dei modelli con l'ausilio di programmi informatici (cfr. appendice 2). La bontà di adattamento di un modello può essere desunta dal coefficiente di correlazione, dal coefficiente di determinazione (coefficienti vicini a 1 indicano un buon adattamento), oppure mediante il test chi quadrato. Anche l'entità dell'errore standard o dell'intervallo di confidenza intorno ai parametri stimati può essere indice della bontà di adattamento del modello.

16. Per ridurre la variabilità dei risultati della prova per le sostanze ad elevata lipofilia, i fattori di bioaccumulo devono essere espressi in relazione al contenuto lipidico e al contenuto di carbonio organico [contenuto in kg di carbonio organico (OC) del suolo per contenuto in kg-1 di lipidi degli organismi sperimentali]. Questo approccio si basa sul fatto che per alcune classi di sostanze chimiche esiste una netta relazione tra il potenziale di bioaccumulo e la lipofilia, relazione che è stata stabilita in modo chiaro per i pesci (47), nei quali il contenuto di grassi e il bioaccumulo di queste sostanze sono correlati. Correlazioni analoghe sono state riscontrate negli organismi bentonici, ad esempio (30) (44), e negli oligocheti terrestri, ad esempio (5) (6) (7) (14). Se si dispone di tessuto di lombrico sufficiente, il contenuto lipidico degli animali sperimentali può essere determinato sullo stesso materiale biologico utilizzato per determinare la concentrazione della sostanza in esame, altrimenti questa misurazione può essere fatta sugli animali di controllo.

VALIDITÀ DELLA PROVA

17. Affinché una prova sia valida occorre che siano soddisfatti i seguenti criteri, sia per gli animali sperimentali sia per i controlli:

— alla fine della prova, la mortalità totale durante le fasi di assorbimento e di eliminazione non deve superare il 10 % (lombrichi) o il 20 % (enchitreidi) del numero complessivo degli organismi introdotti nei recipienti,

— per *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, la perdita di massa media misurata alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione non deve superare il 20 % del peso iniziale fresco (f.w.) misurato all'inizio di ogni fase.

DESCRIZIONE DEL METODO

Specie sperimentali

18. Per le prove di bioaccumulo sono raccomandate varie specie di oligocheti terrestri. Le specie più utilizzate sono *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (Lumbricidi), *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus* o *Enchytraeus luxuriosus* (Enchitreidi), descritte nell'appendice 5.

▼M4

Apparecchiatura

19. Per tutte le parti dell'apparecchiatura, evitare accuratamente l'uso di materiali soggetti a dissoluzione, assorbimento o lisciviatura e che possano avere un effetto dannoso sugli animali sperimentali. Si possono usare normali recipienti rettangolari o cilindrici di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico, ossia al numero degli animali sperimentali. Per le apparecchiature destinate ad entrare in contatto con il mezzo di prova si può usare acciaio inossidabile, plastica o vetro. I recipienti devono essere debitamente coperti per evitare la fuga degli animali, assicurando nel contempo un sufficiente apporto d'aria. Per sostanze con elevati coefficienti di adsorbimento come i piretroidi sintetici, può essere necessario il vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono venire riutilizzate. Occorre evitare la fuoriuscita delle sostanze radiomarcate e l'evaporazione delle sostanze volatili. Utilizzare delle trappole (ad esempio bottiglie di lavaggio per gas in vetro) contenenti un assorbente per catturare eventuali residui che possano evaporare dai recipienti di prova.

Terreno

20. Il terreno sperimentale deve essere di una qualità tale da permettere la sopravvivenza e di preferenza la riproduzione degli organismi sperimentali durante i periodi di acclimatazione e di prova senza che essi presentino un aspetto o un comportamento anomali. I lombrichi devono poter infossarsi nel terreno.

21. Per questa prova si raccomanda di utilizzare il terreno artificiale descritto nel metodo di prova C.8 del presente allegato (48). La preparazione del terreno artificiale da utilizzare nelle prove di bioaccumulo e le indicazioni per la sua conservazione figurano nell'appendice 4. Il terreno artificiale asciugato all'aria può essere conservato a temperatura ambiente fino all'utilizzo.

22. È tuttavia possibile impiegare come terreno di prova e/o di coltura anche terreno naturale proveniente da siti non inquinati. I terreni naturali sono caratterizzati almeno per i seguenti parametri: origine (sito di prelievo), pH, tenore di carbonio organico, distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), capacità massima di ritenzione idrica (WHCmax) e tenore di umidità (3). La ricerca di microinquinanti nel terreno o nei suoi componenti, prima del suo utilizzo, fornisce informazioni utili. Se si impiega terreno naturale prelevato da suoli agricoli, è opportuno che non sia stato trattato con fitofarmaci né con letame di animali trattati per almeno un anno prima del prelievo, né con fertilizzanti organici per almeno sei mesi prima del prelievo (50). Le procedure per la manipolazione dei terreni naturali prima del loro utilizzo nelle prove ecotossicologiche di laboratorio con oligocheti sono descritte nel manuale dell'ASTM (3). Il tempo di conservazione dei terreni naturali in laboratorio deve essere il più breve possibile.

Applicazione della sostanza in esame

23. La sostanza chimica in esame è incorporata nel terreno, tenendo conto delle proprietà fisico-chimiche di detta sostanza. Una sostanza idrosolubile va disciolta completamente in acqua prima di mescolarla al terreno. Per l'aggiunta delle sostanze poco solubili in acqua, la procedura raccomandata consiste nel rivestire con la sostanza in esame uno o più componenti del terreno (artificiale). Ad esempio, si può impregnare la sabbia di quarzo, o una sua porzione, con una soluzione della sostanza in esame in un solvente organico adatto, che si lascia poi lentamente evaporare a secco. La frazione rivestita può così essere mescolata al terreno umido. Questa procedura ha il

▼M4

grande vantaggio di non introdurre alcun solvente nel terreno. Quando si utilizza un terreno naturale, la sostanza in esame può essere aggiunta arricchendo una porzione di terreno asciugato all'aria come descritto in precedenza per il terreno artificiale, oppure mescolandola al terreno umido, con successiva fase di evaporazione se si utilizza un agente solubilizzante. In linea di principio, il contatto del terreno umido con solventi è da evitarsi per quanto possibile. Va tenuto presente quanto segue:

— se si utilizza un solvente diverso dall'acqua, è opportuno che sia miscibile con l'acqua e/o che possa essere eliminato (ad esempio, per evaporazione), lasciando sul terreno solo la sostanza in esame,

— se si utilizza un solvente di controllo, non è necessario alcun controllo negativo. Il solvente di controllo deve contenere la concentrazione massima del solvente aggiunto al terreno e deve provenire dallo stesso lotto utilizzato per preparare la soluzione madre. La tossicità e la volatilità del solvente, nonché la solubilità della sostanza in esame nel solvente prescelto devono costituire i criteri principali per la scelta dell'agente solubilizzante.

24. Per le sostanze poco solubili in acqua e nei solventi organici, è possibile mescolare alla quantità di sostanza in esame, ad esempio utilizzando un mortaio e pestello, da 2,0 a 2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per ottenere la concentrazione sperimentale voluta. Questa miscela di sabbia di quarzo e sostanza in esame è incorporata al terreno preumidificato, mescolando a fondo dopo l'aggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il grado di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova. La procedura è ripetuta per ogni concentrazione sperimentale preparando anche un congruo controllo di 2,0-2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per recipiente di prova.

25. La concentrazione della sostanza in esame nel terreno va determinata dopo la sua addizione al terreno. La distribuzione omogenea della sostanza nel terreno deve essere verificata prima di introdurre gli organismi sperimentali. Il metodo di addizione prescelto e le ragioni di tale scelta devono essere riportati nella relazione (24).

26. Idealmente l'equilibrio tra il terreno e l'acqua interstiziale deve essere stabilito prima dell'introduzione degli organismi; si raccomanda un periodo di quattro giorni a 20 °C. Per molte sostanze chimiche organiche poco idrosolubili, il tempo necessario per raggiungere un vero equilibrio tra le parti adsorbite e dissolte può essere dell'ordine di vari giorni o mesi. Secondo la finalità dello studio, ad esempio se si tratta di simulare delle condizioni ambientali, può essere necessario «invecchiare» più a lungo il terreno addizionato [per i metalli, tre settimane a 20 °C (22)].

Allevamento degli organismi sperimentali

27. È preferibile tenere i lombrichi e gli enchitreidi in allevamento di laboratorio permanente. Indicazioni sui metodi di allevamento in laboratorio di *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, e delle specie di enchitreidi figurano nell'appendice 5 [cfr. anche (48) (51) (52)].

28. Gli animali usati nelle prove devono essere esenti da malattie, anomalie e parassiti osservabili.

ESECUZIONE DELLA PROVA

29. Gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza in esame durante la fase di assorbimento. La fase di assorbimento dura 14 giorni (enchitreidi) o 21 giorni (lombrichi) salvo dimostrazione che lo stato stazionario è stato raggiunto prima.

▼M4

30. Per la fase di eliminazione, gli animali sono trasferiti in un terreno privo della sostanza in esame. Il primo campione deve essere prelevato da 4 a 24 ore dopo l'inizio della fase di eliminazione. L'appendice 3 contiene qualche esempio di programma di campionamento con fase di assorbimento e fase di eliminazione di 21 giorni ciascuna.

Organismi sperimentali

31. In molte specie di enchitreidi terrestri il peso individuale è molto basso (ad esempio, 5-10 mg di peso umido per individuo per *Enchytraeus albidus* e peso inferiore per *Enchytraeus crypticus* o *Enchytraeus luxuriosus*); per misurare il peso ed eseguire l'analisi chimica può essere necessario riunire gli animali dei recipienti delle repliche (si utilizzeranno tutti gli animali di una replica per ottenere un risultato unico per i tessuti analizzati). Si utilizzano almeno tre repliche, ciascuna contenente venti enchitreidi. Se il limite di rivelabilità della sostanza in esame è alto, può essere necessario aggiungere più animali. Per le specie sperimentali con peso individuale più elevato (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) è possibile allestire repliche costituite ciascuna di un solo individuo.

32. I lombrichi impiegati in una prova devono essere di peso simile (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* hanno peso individuale compreso tra 250 e 600 mg). Gli enchitreidi (ad esempio, *Enchytraeus albidus*) devono misurare circa 1 cm di lunghezza. Tutti gli animali impiegati nella stessa prova devono avere la stessa origine ed essere adulti con clitello (cfr. appendice 5). Poiché il peso e l'età dell'animale possono influire sui valori del BAF (a causa, per esempio, del variare del contenuto lipidico e/o della presenza di uova), questi parametri vanno accuratamente riportati nella relazione e tenuti in considerazione al momento di interpretare i risultati. È inoltre possibile che nel periodo di esposizione compaiano dei bozzoli, anch'essi con un effetto sui valori del BAF. Si raccomanda di pesare un sotto-campione di organismi sperimentali prima della prova per stimare il peso medio secco e umido.

33. Per contenere al minimo la riduzione della concentrazione della sostanza in esame durante la fase di assorbimento, occorre utilizzare un rapporto elevato terreno/animali: si raccomanda per *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* una quantità minima di 50 g in peso secco di terreno per lombrico, mentre per gli enchitreidi un minimo di 10-20 g in peso secco di terreno per recipiente. Lo strato di terreno nei recipienti ha uno spessore di 2-3 cm (enchitreidi) o 4-5 cm (lombrichi).

34. Gli animali utilizzati nella prova sono prelevati dal terreno di allevamento (gli enchitreidi con l'ausilio di pinzette da orafo). Gli animali adulti sono trasferiti in terreno sperimentale non trattato affinché si acclimatino, e qui alimentati (cfr. paragrafo 36). Se le condizioni sperimentali sono diverse dalle condizioni di allevamento, una fase di acclimatazione compresa tra 24 e 72 ore dovrebbe essere sufficiente perché gli animali si adattino alle condizioni sperimentali. Una volta acclimatati, i lombrichi sono trasferiti in piastre di vetro (ad esempio, capsula Petri) contenenti acqua pulita per esservi risciacquati, sono poi pesati e infine deposti sul terreno sperimentale. Prima della pesatura, occorre togliere dagli animali l'acqua in eccesso, passandoli delicatamente sul bordo della piastra o tamponandoli con cura con un fazzoletto di carta leggermente inumidito.

35. Occorre osservare e riportare nella relazione il comportamento fossorio. Nelle prove con i lombrichi, gli animali (di controllo e trattati) in genere s'infossano nel terreno nel giro di qualche ora; questo dato va verificato entro 24 ore dall'introduzione degli animali nei recipienti di prova. Se così non fosse (ad esempio più del 10 % di lombrichi non si è infossato per oltre la metà della fase di assorbimento) la causa va ricercata nelle condizioni

▼M4

sperimentali, che potrebbero essere inadeguate, oppure nello stato di salute degli organismi sperimentali, non buono. In tal caso la prova deve essere arrestata e ripetuta. Gli enchitreidi vivono soprattutto nei pori interstiziali del suolo e accade spesso che il loro tegumento sia solo in parte in contatto con il substrato circostante; si presume che l'esposizione degli enchitreidi fossori e non fossori sia equivalente e l'osservazione di enchitreidi non infossati non richiede necessariamente la ripetizione della prova.

Alimentazione

36. L'alimentazione degli animali va prevista quando si utilizza un terreno povero in carbonio organico totale. Se il terreno utilizzato è artificiale si raccomanda il seguente regime settimanale (una somministrazione la settimana): per i lombrichi, 7 mg di sterco secco per g di terreno in peso secco; per gli enchitreidi 2-2,5 mg di fiocchi d'avena macinati per g di terreno in peso secco (11). La prima razione è mescolata al terreno subito prima di introdurvi gli organismi sperimentali. Utilizzare di preferenza lo stesso tipo di cibo impiegato durante l'allevamento (cfr. appendice 5).

Illuminazione e temperatura

37. Le prove sono condotte in base a un fotoperiodo controllato di 16 ore/8 ore (luce/buio), con un'intensità luminosa di preferenza compresa tra 400 e 800 lx nella zona dei recipienti di prova (3), a una temperatura di 20 ± 2 °C.

Concentrazioni della sostanza in esame

38. Si utilizza un'unica concentrazione. I casi in cui è necessario utilizzarne un'altra, o altre, devono essere motivati. Se la tossicità (CE_X) della sostanza in esame è prossima al limite di rivelabilità analitica, si raccomanda di utilizzare sostanze di prova radiomarcate con radioattività specifica elevata. Per i metalli, la concentrazione deve essere superiore alla concentrazione di fondo nei tessuti e nel terreno.

Repliche

39. Per le misurazioni cinetiche (fasi di assorbimento e di eliminazione), il numero minimo di repliche (recipienti) trattate è tre per punto di campionamento. Il numero complessivo di repliche preparate dovrà essere sufficiente a coprire i campionamenti previsti per le fasi di assorbimento e di eliminazione.

40. Per le osservazioni e le misurazioni biologiche (rapporto peso secco/peso umido, tenore lipidico) e per l'analisi delle concentrazioni di fondo negli animali e nel terreno, occorre allestire almeno 12 repliche di controllo negativo (quattro campioni prelevati all'inizio, quattro alla fine della fase di assorbimento e quattro alla fine della fase di eliminazione), se come solvente non è stata utilizzata che acqua. Se per l'applicazione della sostanza in esame si utilizza un agente di solubilizzazione, occorre allestire, oltre alle repliche trattate, delle repliche di controllo con solvente (quattro recipienti campionati all'inizio, quattro alla fine della fase di assorbimento e quattro alla fine della fase di eliminazione) contenenti tutti i componenti tranne la sostanza in esame. In tal caso è possibile allestire anche altre quattro repliche di controllo negativo (senza solvente) per un campionamento facoltativo alla fine della fase di assorbimento. Queste repliche possono essere confrontate biologicamente con quelle di controllo con solvente per ottenere informazioni sull'eventuale influenza del solvente sugli organismi sottoposti alla prova. Si raccomanda di prevedere un numero sufficiente di repliche di riserva (otto recipienti, ad esempio), per gli organismi trattati e per i controlli.

▼M4

Frequenza delle misure della qualità del terreno

41. Il pH e il tasso di umidità del terreno sono misurati all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione. La temperatura del locale di prova è misurata in continuo. L'umidità del terreno va controllata una volta la settimana pesando i recipienti di prova e confrontandone il peso con il peso rilevato all'inizio della prova. Le perdite di umidità devono essere compensate aggiungendo acqua deionizzata.

Campionamento e analisi degli organismi sperimentali e del terreno

42. Nell'appendice 3 figura un esempio di programma di campionamento per le fasi di assorbimento e di eliminazione delle prove di bioaccumulo su lombrichi e enchitreidi.

43. Un campione di terreno è prelevato dai recipienti di prova per determinare la concentrazione della sostanza in esame prima dell'introduzione degli animali e durante le fasi di assorbimento e di eliminazione. Durante la prova le concentrazioni della sostanza in esame sono determinate negli animali e nel terreno. In linea di principio, si misurano le concentrazioni totali nel terreno, ma si possono misurare anche le concentrazioni nell'acqua interstiziale, nel qual caso, prima dell'inizio della prova, occorre spiegarne la ragione e descrivere i metodi appropriati previsti, riportando poi tali informazioni nella relazione.

44. Gli animali e il terreno sono campionati almeno a sei riprese durante le fasi di assorbimento e di eliminazione. Se la stabilità di una sostanza di prova è dimostrata, il numero di analisi del terreno può essere ridotto. Si raccomanda di analizzare almeno tre repliche all'inizio e alla fine della fase di assorbimento. Se la differenza tra la concentrazione misurata nel terreno alla fine della fase di assorbimento e la concentrazione iniziale è superiore al 30 %, occorre analizzare i campioni di terreno prelevati in altre date.

45. Ad ogni campionamento, togliere dal terreno gli animali della replica (ad esempio, dopo aver sparso il terreno della replica su un contenitore poco profondo e prelevato gli animali con pinzette da orafo), sciacquarli rapidamente con acqua in un piatto di vetro o di acciaio e asciugarli dell'acqua in eccesso (cfr. paragrafo 34). Trasferirli delicatamente in un recipiente tarato e pesarli immediatamente, contenuto intestinale compreso.

46. Lasciare i lombrichi (*Eisenia* sp.) evacuare l'intestino per una notte, ad esempio su carta da filtro inumidita su una capsula Petri incoperchiata (cfr. paragrafo 34), poi pesarli per valutare l'eventuale perdita di biomassa durante la prova (si vedano i criteri di validità al paragrafo 17). La pesatura e l'analisi dei tessuti degli enchitreidi sono effettuate senza evacuazione intestinale, operazione tecnicamente difficile a causa delle piccole dimensioni di questi animali. Una volta determinato il peso finale, sopprimere immediatamente gli animali con il metodo più appropriato (ad esempio, con azoto liquido o congelandoli a una temperatura inferiore a - 18 °C).

47. Durante la fase di eliminazione, questi animali sostituiscono il contenuto intestinale contaminato con terreno pulito. Ciò significa che le misure relative a un campione di animali a intestino pieno (nella fattispecie gli enchitreidi) eseguite subito prima della fase di eliminazione includono il terreno contaminato ivi presente. Per quanto concerne gli oligocheti acquatici, si presume che dopo le prime 4-24 ore della fase di eliminazione, la maggior parte del contenuto intestinale contaminato sia stato sostituito da sedimento pulito [cfr. ad esempio (46)]. Osservazioni analoghe sono state riferite per i lombrichi in studi sull'accumulo di cadmio e zinco radiomarcati (78). Per quanto riguarda gli enchitreidi con contenuto intestinale intatto, la concentrazione di questo primo campione della fase di eliminazione può essere considerata come la concentrazione dei tessuti dopo evacuazione intestinale. Per tenere conto del fatto che la concentrazione della sostanza in esame viene diluita da terreno non contaminato durante la fase di eliminazione, è possibile stimare il peso del contenuto intestinale in base ai rapporti peso umido degli organismi/peso delle ceneri degli organismi oppure peso secco degli organismi/peso delle ceneri degli organismi.

▼M4

48. È preferibile analizzare i campioni di terreno e di animali subito dopo averli prelevati (ossia entro 1-2 giorni), per evitare il degrado o altre perdite, e si raccomanda di calcolare la velocità approssimativa di assorbimento ed eliminazione durante lo svolgimento della prova. Se l'analisi è posticipata, conservare i campioni in modo idoneo, ad esempio surgelandoli ≤ - 18 °C).

49. Controllare che la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica e che il recupero della sostanza in esame dai campioni di terreno e di animali siano soddisfacenti per il metodo in oggetto; riportare nella relazione l'efficacia di estrazione, il limite di rivelabilità (LOD) e il limite di quantificazione. Verificare inoltre che la sostanza in esame non sia rilevabile nei recipienti di controllo in concentrazioni superiori a quella di fondo. Se la concentrazione della sostanza in esame nell'organismo sperimentale, Ca, è > 0 per i controlli, includere questo dato nel calcolo dei parametri cinetici (cfr. appendice 2). Per tutta la durata della prova tutti i campioni devono essere manipolati in modo da ridurre al minimo la contaminazione e le perdite (derivanti, ad esempio, dall'adsorbimento della sostanza in esame sul dispositivo di campionamento).

50. Qualora si operi con sostanze radiomarcate, è possibile analizzare il progenitore e i metaboliti. Informazioni importanti si ricavano dalla quantificazione del composto progenitore e dei metaboliti allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento. I campioni vanno in tal caso «puliti» in modo da poter quantificare separatamente il composto progenitore. Si raccomanda di identificare gli eventuali metaboliti che rappresentano più del 10 % della radioattività totale del/i campione/i analizzato/i.

51. Annotare e riferire nella relazione il recupero complessivo e il recupero della sostanza in esame negli animali, nel terreno e, se utilizzate, nelle trappole assorbenti che trattengono la sostanza in esame evaporata.

52. È ammesso per gli enchitreidi, perché di dimensioni più piccole dei lombrichi, il raggruppamento di individui prelevati dal recipiente di prova. Se il raggruppamento implica la riduzione del numero di repliche, ciò limita le procedure statistiche che si possono applicare ai dati ricavati dal campionamento. Se sono richieste una potenza ed una procedura statistiche specifiche, includere nella prova un numero adeguato di repliche per tener conto del raggruppamento, della procedura e della potenza desiderati.

53. Si raccomanda che il BAF sia espresso sia come funzione del peso secco totale e, se necessario (ad esempio per sostanze chimiche fortemente idrofobe), come funzione del tenore lipidico. Per determinare il tenore lipidico avvalersi di metodi idonei [alcuni dei metodi esistenti, ad esempio (31) e (58), vanno adeguati a tal fine]. Questi metodi si basano su una tecnica di estrazione con cloroformio/metanolo, ma se si vuole evitare l'uso di solventi clorati, utilizzare una versione modificata del metodo di Bligh e Dyer (9) descritta in (17). Poiché i vari metodi possono non fornire valori identici, è importante precisare il metodo usato. Quando possibile, ossia se si dispone di sufficiente tessuto animale, il tenore lipidico è idealmente analizzato sullo stesso campione o estratto che è servito per l'analisi della sostanza in esame, in quanto i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica (49). In alternativa è possibile misurare il tenore lipidico sugli animali di controllo e il valore ottenuto può essere utilizzato per normalizzare i valori del BAF. Con quest'ultimo approccio la contaminazione dell'apparecchiatura con la sostanza in esame è più contenuta.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

54. La curva di assorbimento della sostanza in esame si ottiene rappresentando graficamente la sua concentrazione nel/sugli animali durante la fase di assorbimento in funzione del tempo su scale aritmetiche. Quando la curva ha raggiunto un plateau, o stato stazionario (cfr. definizioni nell'appendice 1), calcolare il fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}) secondo la seguente formula:

$$\frac{C_a \text{ allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento (media)}}{C_s \text{ allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento (media)}}$$

C_a = concentrazione della sostanza in esame nell'organismo sperimentale

C_s = concentrazione della sostanza in esame nel terreno

55. Se la curva non raggiunge lo stato stazionario, invece del BAF_{SS} determinare il BAF_K, in base alle costanti di velocità, come indicato di seguito:

— determinare il fattore di accumulo (BAF_K) come rapporto ks/ke,

— calcolare di preferenza simultaneamente le velocità di assorbimento e di eliminazione (cfr. equazione [11] nell'appendice 2),

— la costante di velocità di eliminazione (k_e) è in genere ricavata dalla curva di eliminazione (ossia dal tracciato della concentrazione della sostanza in esame negli animali durante la fase di eliminazione). Calcolare la costante di velocità di assorbimento k_s in funzione di k_e e di un valore di C_a che è derivato dalla curva di assorbimento — per la descrizione di questi metodi cfr. appendice 2. Il metodo preferito per ottenere il BAF_K e le costanti di velocità k_s e k_e consiste nell'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer. Se la curva di eliminazione non obbedisce manifestamente a una cinetica di primo ordine si dovrà ricorrere a modelli più complessi.

Relazione sulla prova

56. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

— ogni informazione disponibile sulla tossicità acuta o a lungo termine (ad esempio CE_X, CL_X, NOEC) della sostanza in esame per gli oligocheti terrestri,

— purezza, natura fisica e proprietà fisico-chimiche, ad esempio log K_{ow}, idrosolubilità,

— dati di identificazione chimica; provenienza della sostanza in esame, identità e concentrazione di eventuali solventi utilizzati,

— in caso di utilizzo di una sostanza radiomarcata, posizione esatta degli atomi marcati, radioattività specifica e purezza radiochimica.

Specie sperimentali:

— nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, dimensioni ecc.

▼M4

Condizioni sperimentali:

— procedura di prova utilizzata,

— tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodo,

— disegno sperimentale (ad esempio numero e dimensioni dei recipienti, massa del terreno e spessore dello strato di terreno, numero di repliche, numero di animali per replica, numero di concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e di eliminazione, frequenza di campionamento),

— motivazione del materiale scelto per i recipienti di prova,

— metodo di preparazione e applicazione della sostanza di prova, nonché ragioni della scelta di tale metodo,

— concentrazioni nominali nella prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nei recipienti di prova, e metodo mediante cui sono stati ottenuti questi valori,

— provenienza dei componenti del terreno artificiale oppure, se si utilizza terreno naturale, provenienza del terreno, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati dei controlli (sopravvivenza, aumento della biomassa, riproduzione), caratteristiche del terreno (pH, tenore di carbonio organico totale, distribuzione granulometrica, percentuale di sabbia, limo e argilla), WHC_{max}, tenore di umidità all'inizio e alla fine della prova e eventuali altre misurazioni effettuate,

— informazioni particolareggiate sul trattamento dei campioni di terreno e animali, ivi compresi i dettagli su preparazione, conservazione, procedure di addizione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame negli animali e nel terreno, il tenore lipidico (se misurato) e i metodi di recupero della sostanza in esame.

Risultati:

— mortalità dei controlli e degli organismi trattati in ogni recipiente e eventuali comportamenti anomali osservati (ad esempio, comportamento non fossorio, assenza di riproduzione in una prova di bioaccumulo con enchitreidi),

— rapporto peso secco/peso umido del terreno e degli organismi sperimentali (utile per la normalizzazione),

— peso umido degli animali ad ogni campionamento; per i lombrichi, peso umido all'inizio della prova e ad ogni campionamento prima e dopo l'evacuazione intestinale,

— tenore lipidico degli organismi sperimentali (se determinato),

— curve che mostrano le costanti cinetiche di assorbimento e di eliminazione della sostanza in esame negli animali e il tempo occorso per raggiungere lo stato stazionario,

— C_a e C_s (con deviazione standard e intervallo, se necessario) per ogni campionamento (C_a espressa in g kg^{-1} di peso umido e secco del corpo intero, C_s espressa in g kg^{-1} di peso umido e secco del terreno). Se è necessario ricavare un fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF), (ad esempio per confrontare i risultati di due o più prove realizzate su animali con tenore lipidico diverso), C_a può essere espressa anche come g kg^{-1} di tenore lipidico dell'organismo e Cs come g kg^{-1} di carbonio organico (OC) del terreno,

— BAF (espresso in kg terreno kg^{-1} di animale), costante di velocità di assorbimento dal terreno k_s (espressa in g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$), e costante di velocità di eliminazione k_e (espressa in $giorno^{-1}$); eventualmente anche BSAF (espresso in kg di OC del terreno kg^{-1} di tenore lipidico dell'animale),

▼M4

— se misurate: percentuali del composto progenitore, dei metaboliti e dei residui combinati (ossia la percentuale della sostanza in esame che non può essere estratta con i normali metodi di estrazione) rilevate nel terreno e negli animali sperimentali,

— metodi usati per le analisi statistiche dei dati.

Valutazione dei risultati:

— conformità dei risultati con i criteri di validità di cui al paragrafo 17,

— risultati imprevisti o insoliti, ad esempio, eliminazione incompleta della sostanza in esame dagli animali sperimentali.

BIBLIOGRAFIA

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pagg. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OCSE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, De-Jong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi.

(49) Capitolo C.13 del presente allegato, Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo.

(50) Capitolo C.21 del presente allegato, Microrganismi del suolo: test di trasformazione dell'azoto.

(51) OCSE (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OCSE (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OCSE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates., Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Appendice 1

DEFINIZIONI

Bioaccumulo: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante. Il bioaccumulo è il risultato sia dei processi di bioconcentrazione che di quelli di biomagnificazione (cfr. di seguito).

Bioconcentrazione: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo, derivante dall'assorbimento della sostanza esclusivamente dall'ambiente circostante (ossia attraverso la superficie corporea e in terreno ingerito), rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante.

Biomagnificazione: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo, derivante principalmente dall'assorbimento di alimenti o prede contaminate, rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'alimento o nella preda. La biomagnificazione può comportare un trasferimento o un accumulo della sostanza in esame nelle reti trofiche.

Eliminazione della sostanza in esame: perdita della sostanza dai tessuti dell'organismo sperimentale mediante processi attivi o passivi che si verificano indipendentemente dalla presenza o dall'assenza della sostanza nell'ambiente circostante.

Fattore di bioaccumulo (BAF) in qualsiasi momento della fase di assorbimento della prova: concentrazione della sostanza in esame in o sull'organismo sperimentale (C_a in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco dell'animale) diviso per la concentrazione della sostanza chimica nell'ambiente circostante (C_s espressa in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco del terreno); il BAF è espresso in kg di terreno$\cdot kg^{-1}$ di animale.

Fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}): BAF allo stato stazionario, che non varia in modo significativo per un lungo periodo, periodo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante (C_s in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco del terreno) rimane costante.

Fattori di bioaccumulo cinetico (BAF_K): fattori di bioaccumulo calcolati direttamente dal rapporto tra la costante di velocità di assorbimento dal terreno e la costante di velocità di eliminazione (k_s and k_e, cfr. di seguito).

Fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF): concentrazione normalizzata per il tenore lipidico della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale divisa per la concentrazione normalizzata per il tenore di carbonio organico della sostanza in esame nel terreno allo stato stazionario. C_a è pertanto espressa in $g \cdot kg^{-1}$ di tenore in lipidi dell'organismo, e C_s in $g \cdot kg^{-1}$ di tenore in carbonio organico del terreno; il BSAF è espresso in kg di carbonio organico kg^{-1} di lipidi.

Plateau o **stato stazionario**: equilibrio tra il processo di assorbimento e di eliminazione che si verificano simultaneamente nella fase di esposizione. Lo stato stazionario, nel tracciato del BAF in funzione del tempo, viene raggiunto quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive del BAF su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni differiscono di non oltre il ± 20 % una dall'altra, e non vi sono differenze statisticamente significative tra i tre periodi di campionamento. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente, intervalli di sette giorni saranno più idonei (49).

Coefficiente di ripartizione carbone organico-acqua (K_{oc}): rapporto tra la concentrazione di una sostanza chimica nella o sulla frazione di carbonio organico di un terreno e la concentrazione della sostanza all'equilibrio.

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}): rapporto tra la solubilità di una sostanza chimica in n-ottanolo e quella in acqua all'equilibrio, espresso anche come P_{ow}. Il logaritmo di K_{ow} (log K_{ow}) viene usato come indicazione del potenziale di bioaccumulo di una sostanza chimica da parte di organismi acquatici.

▼M4

Fase di assorbimento o esposizione: tempo durante il quale gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza chimica in esame.

Costante di velocità di assorbimento dal terreno (k_s): valore numerico che definisce la velocità di aumento della concentrazione della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale derivante dall'assorbimento dalla fase del terreno. k_s è espressa in g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$.

Fase di eliminazione: tempo, dopo il trasferimento dell'organismo sperimentale da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza, durante il quale viene studiata l'eliminazione (o perdita netta) della sostanza dall'organismo sperimentale.

Costante di velocità di eliminazione (k_e): valore numerico che definisce la velocità di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale dopo il trasferimento di quest'ultimo da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza; k_e è espressa in $giorno^{-1}$.

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

▼M4

Appendice 2

Calcolo dei parametri di assorbimento ed eliminazione

Il principale endpoint di una prova di bioaccumulo è il fattore di bioaccumulo BAF. Per calcolare il BAF si divide la concentrazione nell'organismo sperimentale, C_a, per la concentrazione del terreno C_s, allo stato stazionario. Se lo stato stazionario non è raggiunto durante la fase di assorbimento, il BAF_K è calcolato a partire dalle costanti di velocità invece che dal BAF_{SS}. Va tuttavia annotato se il BAF si basa o meno sulle concentrazioni allo stato stazionario.

La procedura abituale per ottenere il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), la costante di velocità di assorbimento dal terreno (k_s) e la costante di velocità di eliminazione (k_e) consiste nel ricorrere a metodi informatici non lineari di stima dei parametri, ad esempio sulla base dei modelli descritti in (68). Data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo e le equazioni dei modelli

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [1]}$$

oppure

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \quad t > t_c \qquad \text{equazione [2]}$$

dove:

C_a = concentrazione della sostanza negli animali [$g \cdot kg^{-1}$ di peso umido o secco]

k_s = costante di velocità di assorbimento nei tessuti [g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$]

C_a = concentrazione della sostanza nel terreno [$g \cdot kg^{-1}$ di peso umido o secco]

k_e = costante di velocità di eliminazione [$giorno^{-1}$]

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento,

questi programmi informatici calcolano i valori di BAF_K, k_s e k_e.

Quando la concentrazione di fondo negli animali non esposti, ad esempio il giorno 0, è significativamente diversa da zero (come può essere il caso dei metalli), tale concentrazione ($C_{a,0}$) deve essere inclusa in queste equazioni, come segue:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [3]}$$

e

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{equazione [4]}$$

Se si osserva un forte calo della concentrazione della sostanza di prova nel terreno durante la fase di assorbimento, è possibile utilizzare i seguenti modelli, ad esempio (67) e (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{equazione [5]}$$

▼**M4**

dove:

C_s = concentrazione della sostanza nel terreno [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

k_0 = costante di velocità di degradazione nel terreno [d-1]

C_0 = concentrazione iniziale della sostanza nel terreno [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{equazione [7]}$$

dove:

C_a = concentrazione della sostanza negli animali [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

k_s = costante di velocità di assorbimento nei tessuti [g di terreno·kg^{-1} di animale giorno^{-1}]

k_0 = costante di velocità di degradazione nel terreno [giorno^{-1}]

k_e = costante di velocità di eliminazione [giorno^{-1}]

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento.

Quando si è raggiunto uno stato stazionario durante la fase di assorbimento (ossia $t = \infty$), è possibile ridurre l'equazione

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [1]}$$

all'equazione:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

oppure

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{equazione [8]}$$

In seguito $k_s/k_e \times C_s$ dà un'approssimazione della concentrazione della sostanza in esame nel tessuto dell'animale allo stato stazionario ($C_{a,ss}$).

Il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF) può essere calcolato come segue:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{equazione [9]}$$

dove f_{oc} è la frazione di carbonio organico nel terreno e f_{lip} è la frazione di lipidi negli animali, entrambe determinate di preferenza su campioni prelevati dalla prova, e basate rispettivamente sul peso secco o sul peso umido.

Per modellizzare le costanti cinetiche di eliminazione si possono utilizzare i dati ricavati dalla fase di eliminazione e applicare la seguente equazione del modello e un metodo informatico non lineare di stima dei parametri. Se il tracciato dei dati in funzione del tempo indica una diminuzione esponenziale costante della concentrazione della sostanza in esame negli animali, il decorso dell'eliminazione può essere descritto da un modello a compartimento singolo (equazione [9]).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{equazione [10]}$$

▼**M4**

I processi di eliminazione paiono talvolta avvenire in due fasi: dapprima una rapida diminuzione di C_a, che nelle fasi successive dell'eliminazione evolve in una perdita più lenta delle sostanze in esame, ad esempio (27) e (68). Le due fasi possono essere interpretate ipotizzando l'esistenza di due compartimenti nell'organismo, a partire dai quali la sostanza in esame è eliminata a velocità diverse. In questi casi è opportuno studiare la letteratura pertinente, ad esempio (38) (39) (40) e (78).

Le equazioni del modello illustrate sopra possono servire a calcolare simultaneamente i parametri cinetici (k_s and k_e), applicando un modello di cinetica di primo ordine a tutti i dati delle fasi di assorbimento e di eliminazione simultaneamente. Per una descrizione di un metodo che permetta un tale calcolo combinato delle costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione, consultare ad esempio (41), (73) e (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{equazione [11]}$$

NB: quando i parametri di assorbimento e di eliminazione sono stimati simultaneamente sulla base dei dati combinati di assorbimento ed eliminazione, «m» di cui all'equazione [11] è un descrittore che consente al programma informatico di attribuire i sottotermini dell'equazione alle serie di dati della fase corrispondente e eseguire una valutazione corretta (m = 1 per la fase di assorbimento; m = 2 per la fase di eliminazione).

Ciononostante, queste equazioni di modelli vanno utilizzate con cautela, in particolare se nella prova si verificano cambiamenti della biodisponibilità o della (bio)degradazione della sostanza in esame [cfr. ad esempio (79)].

▼M4

Appendice 3

ESEMPI DI PROGRAMMI PER LE PROVE DI BIOACCUMULO NEL TERRENO

Prova sui lombrichi

a) Fase di assorbimento con 8 date di campionamento per il calcolo dei parametri cinetici

Giorno	Attività
- 6	Condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Addizione della soluzione della sostanza in esame alla frazione di terreno; evaporazione degli eventuali solventi; miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; equilibrazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni (3 settimane per i terreni addizionati di metalli).
da - 3 a - 1	Rimozione degli organismi sperimentali dal terreno di allevamento per acclimatazione; preparazione e umidificazione dei componenti del terreno.
0	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; prelievo di campioni di terreno dai recipienti trattati e dai controlli con solvente per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame; introduzione di una razione di cibo; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; accantonamento di un numero sufficiente di sottocampioni di animali per determinare i valori analitici di fondo, del peso umido e secco e del tenore lipidico; pesatura di tutti i recipienti di prova per il controllo dell'umidità del terreno; controllo del flusso d'aria, se si utilizza un sistema sperimentale chiuso.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura; prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1º giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1º giorno.
5 - 6	Idem come il 3º giorno.
7	Idem come il 1º giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
8 - 9	Idem come il 3º giorno.
10	Idem come il 1º giorno.
11 - 13	Idem come il 3º giorno.
14	Idem come il 1º giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
15 - 16	Idem come il 3º giorno.
17	Idem come il 1º giorno.
18 - 20	Idem come il 3º giorno.

▼**M4**

Giorno	Attività
21	Idem come il 1º giorno; misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; fine della fase di assorbimento; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito per la fase di eliminazione (senza evacuazione dell'intestino); prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	Le attività che precedono l'esposizione (fase di equilibrazione) sono programmate tenendo conto delle proprietà della sostanza chimica in esame.
	Le attività descritte per il 3º giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

b) Fase di eliminazione

Giorno	Attività
- 6	Preparazione e umidificazione dei componenti del terreno; condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; incubazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni.
0 (fine della fase di assorbimento)	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; introduzione di una razione di cibo; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito; prelievo di campioni di terreno e di animali dopo 4-6 ore per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura. prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1º giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1º giorno.
5 - 6	Idem come il 3º giorno.
7	Idem come il 1º giorno. introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
8 - 9	Idem come il 3º giorno.
10	Idem come il 1º giorno.
11 - 13	Idem come il 3º giorno.
14	Idem come il 1º giorno. introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
15 - 16	Idem come il 3º giorno.
17	Idem come il 1º giorno.

▼M4

Giorno	Attività
18 - 20	Idem come il 3º giorno.
21	Idem come il 1º giorno. misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	La preparazione del terreno per la fase di eliminazione è eseguita come per la fase di assorbimento.
	Le attività descritte per il 3º giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

Prova sugli enchitreidi

a) Fase di assorbimento con 8 date di campionamento per il calcolo dei parametri cinetici

Giorno	Attività
- 6	Condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Addizione della soluzione della sostanza in esame alla frazione di terreno; evaporazione degli eventuali solventi; miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; equilibrazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni (3 settimane per i terreni addizionati di metalli).
da - 3 a - 1	Rimozione degli organismi sperimentali dal terreno di allevamento per acclimatazione; preparazione e umidificazione dei componenti del terreno.
0	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; prelievo di campioni di terreno dai recipienti trattati e dai controlli con solvente per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame; introduzione di una razione di cibo; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; accantonamento di un numero sufficiente di sottocampioni di animali per la determinazione dei valori analitici di fondo, del peso umido e secco e del tenore lipidico; pesatura di tutti i recipienti di prova il controllo dell'umidità del terreno; controllo del flusso d'aria, se si utilizza un sistema sperimentale chiuso.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura; prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1º giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1º giorno.
5 - 6	Idem come il 3º giorno.
7	Idem come il 1º giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
9	Idem come il 1º giorno.
10	Idem come il 3º giorno.

▼**M4**

Giorno	Attività
11	Idem come il 1º giorno.
12 - 13	Idem come il 3º giorno.
14	Idem come il 1º giorno; introduzione di una razione di cibo; misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; fine della fase di assorbimento; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito per la fase di eliminazione (senza evacuazione dell'intestino); prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	Le attività che precedono l'esposizione (fase di equilibrazione) sono programmate tenendo conto delle proprietà della sostanza chimica in esame.
	Le attività descritte per il 3º giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

▼M4

Appendice 4

Terreno artificiale — indicazioni per la preparazione e la conservazione

Poiché, nel corso dell'anno, non sempre si può disporre di terreno naturale di una determinata origine e dato che gli organismi indigeni e i microinquinanti in esso presenti possono influire sull'esito della prova, si raccomanda di utilizzare in questa prova il terreno artificiale di cui al capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi (48). Si tratta di un terreno in cui possono sopravvivere, crescere e riprodursi varie specie sperimentali e che offre sia una standardizzazione massima sia la comparabilità intra e interlaboratorio delle condizioni di prova e di allevamento.

Componenti

Torba	10 %	Torba di sfagno in conformità con la linea guida OCSE n. 207 (48)
Sabbia di quarzo	70 %	Sabbia di quarzo industriale (asciugata all'aria); granulometria: > 50 % delle particelle comprese tra 50 e 200 μm, ma tutte ≤ 2 mm
Argilla caolinica	20 %	Tenore di caolinite ≥ 30 %
Carbonato di calcio	≤ 1 %	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro

Il tenore di carbonio organico del terreno artificiale può anche essere ridotto, diminuendo, ad esempio, la percentuale di torba al 4-5 % di terreno secco e aumentando proporzionalmente il contenuto di sabbia. Con un tenore inferiore di carbonio organico, può risultare inferiore l'adsorbimento della sostanza in esame nel terreno (carbonio organico) e aumentare la disponibilità della sostanza in esame per gli animali (74). È stato dimostrato che *Enchytraeus albidus* e *Eisenia fetida* possono soddisfare i criteri di validità relativi alla riproduzione quando saggiati in terreni naturali con un tenore più basso di carbonio organico, ad esempio 2,7 % (33) e (61), ed è stato sperimentalmente constatato che ciò vale anche con un terreno artificiale contenente 5 % di torba.

Preparazione

Mescolare accuratamente i componenti secchi del terreno (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio), operazione che può essere eseguita circa una settimana prima dell'inizio della prova. Inumidire la miscela con acqua deionizzata almeno 48 ore prima di applicarvi la sostanza in esame per equilibrare/stabilizzare l'acidità. Per determinare il pH, utilizzare una miscela di terreno con una soluzione di 1 M KCl in rapporto 1:5. Se il pH non rientra nell'intervallo richiesto (6,0 ± 0,5), aggiungere al terreno $CaCO_3$ in quantità sufficiente oppure preparare un nuovo lotto di terreno.

Determinare la capacità massima di ritenzione idrica (WHC_{max}) del terreno artificiale in base alla norma ISO 11268-2 (35). Almeno due giorni prima dell'inizio della prova, inumidire il terreno aggiungendo acqua deionizzata o acqua artificiale in quantità sufficiente a ottenere circa la metà del tenore d'umidità finale. Il tenore di umidità finale deve rappresentare dal 40 % al 60 % della WHC_{max}. Suddividere, all'inizio della prova, il terreno preinumidito in un numero di lotti pari al numero delle concentrazioni sperimentali e dei controlli da utilizzarsi nella prova, e aggiustare il tenore di umidità al 40 – 60 % della WHC_{max} aggiungendo la soluzione della sostanza in esame e/o acqua deionizzata o artificiale. Misurare il tenore di umidità all'inizio e alla fine della prova (a 105 °C) per accertarsi che soddisfi in modo ottimale le esigenze delle specie sperimentali (ad esempio, se stringendo leggermente in mano un pugno di terreno, tra le dita compaiono delle goccioline d'acqua).

▼M4

Conservazione

Conservare i componenti secchi del terreno artificiale a temperatura ambiente fino al momento dell'uso. Conservare il terreno preparato e preinumidito in luogo fresco per tre giorni al massimo prima di addizionarvi la sostanza in esame, avendo cura di ridurre al minimo l'evaporazione d'acqua. Una volta addizionata la sostanza in esame, utilizzare il terreno immediatamente, salvo vi siano informazioni che indicano la possibilità di conservarlo senza alterare la tossicità e la biodisponibilità della sostanza di prova. Conservare fino all'analisi i campioni di terreno addizionato alle condizioni raccomandate per la sostanza in esame.

▼M4

Appendice 5

Specie di oligocheti terrestri raccomandate per le prove di bioaccumulo nel suolo

Lombrichi

La specie raccomandata per questa prova è *Eisenia fetida* (Savigny 1826) della famiglia dei Lumbricidi. Dal 1972, la si suddivide in due sottospecie [*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (10)]. Secondo Jaenike (36), si tratta di due specie a sé stanti. *Eisenia fetida* è facilmente riconoscibile per le strisce giallo acceso intersegmentarie, mentre *Eisenia andrei* ha una livrea uniforme color rosso scuro. Probabilmente originarie della regione del Mar Nero, sono oggi diffuse in tutto il mondo, soprattutto in habitat modificati dalle attività antropiche, come i mucchi di compost. Entrambe si prestano ad essere utilizzate nelle prove ecotossicologiche e di bioaccumulo.

Eisenia fetida e *Eisenia andrei* sono disponibili in commercio, ad esempio come esche per la pesca. Rispetto ad altri lumbricidi, hanno un ciclo di vita breve e raggiungono la maturità in 2-3 mesi (a temperatura ambiente). Prosperano a temperature oscillanti tra i 20 e i 24 °C e prediligono substrati relativamente umidi, con pH pressoché neutro e a forte tenore di materia organica. Dato che si tratta di specie ampiamente utilizzate da 25 anni in prove ecotossicologiche standardizzate, il loro allevamento è ormai diffuso (48) (77).

Entrambe le specie possono essere allevate in deiezioni animali di vario tipo. Il mezzo di allevamento raccomandato dall'ISO (35) è una miscela di letame di equini o bovini e torba in parti uguali. Il mezzo deve avere un pH di circa 6-7 (aggiustato con carbonato di calcio), una conduttività ionica bassa (minore di 6 mS/cm o concentrazione di sali inferiore a 0,5 %) e non essere troppo contaminato da ammoniaca o urina animale. Si può utilizzare anche la terra da giardino che si trova in commercio, priva di additivi, oppure terreno artificiale quale definito dall'OCSE (48), o ancora una miscela di entrambi in parti uguali. Il substrato dovrebbe essere umido ma non troppo bagnato. Le cassette d'allevamento più idonee hanno capacità compresa tra 10 e 50 litri.

Per ottenere una popolazione di lombrichi omogenea per età e massa, è consigliabile iniziare l'allevamento con i bozzoli. A tal fine introdurre una quantità di animali adulti in una cassetta d'allevamento contenente substrato fresco. L'esperienza dimostra che si ottengono buoni tassi di riproduzione con una densità demografica di circa 100 lombrichi adulti per kg di substrato (peso umido). Dopo 28 giorni togliere i lombrichi adulti. I lombrichi nati dai bozzoli sono utilizzati per le prove una volta adulti, ossia dopo almeno 2 mesi dalla schiusa ma non oltre 12 mesi.

Si può ritenere che i lombrichi delle specie qui descritte godano di buona salute se si muovono nel substrato, non tentano di fuggire e si riproducono continuamente. Una certa inazione o una colorazione gialla dell'estremità posteriore (nel caso di *Eisenia fetida*) sono indici di impoverimento del substrato. In tal caso si raccomanda di utilizzare substrato fresco e/o ridurre il numero di animali per cassetta.

Bibliografia scelta di approfondimento

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchitreidi

La specie consigliata per questa prova è *Enchytraeus albidus* (Henle 1837 — verme bianco). *Enchytraeus albidus* è una delle specie di maggiori dimensioni (fino a 15 mm) della famiglia di anellidi oligocheti degli Enchitreidi ed è diffusa in tutto il mondo (8). La si ritrova in ambiente marino, dulciacquicolo e terrestre, principalmente nella materia organica in putrefazione (alghe, compost), talvolta nei terreni prativi (42). L'ampia valenza ecologica che caratterizza questa specie e alcune sue variazioni morfologiche indicano che potrebbero esistere varie razze.

Enchytraeus albidus è reperibile in commercio, sotto forma di mangime per pesci. Occorre verificare se l'allevamento è contaminato da altre specie, generalmente più piccole (60), nel qual caso gli animali vanno lavati con acqua in una capsula Petri. Per avviare un nuovo allevamento, scegliere gli esemplari adulti di grandi dimensioni (prelevandoli con un microscopio stereoscopico) e scartare tutti gli altri. Il ciclo di vita di questo animale è breve, dato che raggiunge la maturità in un tempo oscillante tra 33 (a 18 °C) e 74 giorni (a 12 °C). Utilizzare per questa prova solo gli animali che siano stati tenuti in laboratorio almeno 5 settimane (una generazione) e che non abbiano mostrato complicazioni.

Anche altre specie del genere *Enchytraeus* sono adatte per questa prova, in particolare *Enchytraeus luxuriosus.* Questa specie è prevalentemente terricola, come è stato recentemente descritto in (65). Se si impiegano altre specie di *Enchytraeus* occorre identificarle in modo chiaro e giustificare tale scelta nella relazione.

La specie *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) appartiene allo stesso gruppo di *Enchytraeus luxuriosus*. Poiché questa specie è stata descritta solo negli allevamenti di lombrichi e nei mucchi di compost (Römbke 2003), la sua esistenza in natura non è certa e quindi non se ne conoscono le esigenze ecologiche. Pur tuttavia, alcuni studi recenti di laboratorio condotti su vari tipi di terreno hanno confermato la grande tolleranza di questa specie verso caratteristiche del suolo quali ph e struttura (Jänsch *et al.* 2005). Negli ultimi anni essa è stata spesso utilizzata negli studi ecotossicologici proprio perché semplice da allevare e da saggiare (Kuperman *et al.* 2003). Presenta tuttavia l'inconveniente delle piccole dimensioni, che, essendo in media da 3 a 12 mm (Westheide & Müller 1996), ne rendono difficoltosa la manipolazione rispetto a *Enchytraeus albidus*. Quando si utilizza questa specie invece di *Enchytraeus albidus*, i recipienti di prova possono essere più piccoli, ma non necessariamente. Va inoltre tenuto in considerazione che questa specie si riproduce molto rapidamente, con un tempo di moltiplicazione inferiore a 20 giorni a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) se non ancor più basso a temperature più elevate.

Gli enchitreidi della specie *Enchytraeus albidus* (così come di altre specie di enchitreidi) possono essere allevati in grandi cassette di plastica (di dimensioni, ad esempio, 30 × 60 × 10 cm oppure, per vermi piccoli, 20 × 12 × 8 cm) riempite di una miscela di terreno artificiale e terra da giardino reperibile in commercio, non contaminata e priva di additivi. Il compost è da evitare poiché può contenere sostanze tossiche, come i metalli pesanti. Prima dell'utilizzo, eliminare la fauna indigena dal terreno di allevamento surgelandolo tre volte. È possibile utilizzare un terreno completamente artificiale, tenendo presente che il tasso di riproduzione potrebbe essere più lento rispetto a quello che si osserva con i substrati misti. Il substrato deve avere un pH di 6,0 ± 0,5. Tenere gli animali al buio, in un'incubatrice con temperatura di 15 ± 2 °C, evitando in ogni caso temperature superiori a 23 °C. Il terreno artificiale o naturale deve essere umido, ma non bagnato, tale che, se premuto leggermente con la mano, lasci filtrare in superficie solo qualche gocciolina d'acqua. Evitare di creare condizioni anossiche (se si utilizza un coperchio, accertarsi che abbia un numero di fori sufficienti a garantire un congruo ricambio d'aria). Il terreno va aerato rimescolandolo delicatamente una volta la settimana.

▼M4

Alimentare gli animali almeno a cadenza settimanale, a volontà, con fiocchi d'avena posti in una cavità sulla superficie del terreno e ricoperti di terra. Se rimane cibo dalla volta precedente, adeguare la nuova razione in funzione della quantità rimasta. Se il cibo restante presenta muffa, sostituirlo con una nuova razione di fiocchi d'avena. Per stimolare la riproduzione, i fiocchi d'avena possono essere sostituiti, ogni due settimane, da una polvere proteica, reperibile in commercio, arricchita di vitamine. Dopo tre mesi trasferire gli animali in un substrato di allevamento fresco. Conservare i fiocchi d'avena in recipienti ermeticamente chiusi e sterilizzarli in autoclave o riscaldarli prima di somministrarli, onde prevenire eventuali infestazioni da acari della farina (ad esempio *Glycyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) o da acari predatori [ad esempio *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina]. Una volta disinfettato, macinare l'alimento in modo da poterlo distribuire con facilità sulla superficie del terreno. In alternativa ai fiocchi d'avena si può utilizzare lievito per panificazione o mangime per pesci TetraMin®.

In linea di principio, le condizioni di allevamento sono soddisfacenti se gli animali non cercano di scappare dal substrato, si spostano rapidamente su di esso, presentano una livrea brillante, di colore bianco più o meno intenso, sulla quale le particelle di terreno non aderiscono e sono rappresentati da varie fasce d'età. Di fatto, si può ritenere che gli animali godano di buona salute se si riproducono continuamente.

Bibliografia scelta di approfondimento

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.