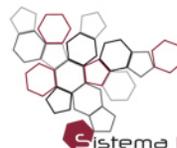




ISPRA

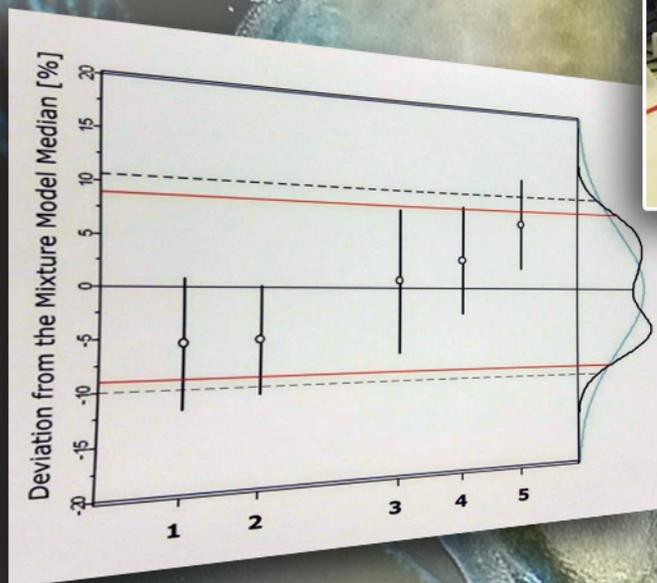
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Indicazioni per l'accreditamento del saggio di tossicità acuta con *Daphnia Magna*

Prodotto nell'ambito dell'Accordo
di Collaborazione ISPRA-ACCREDIA



MANUALI E LINEE GUIDA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Indicazioni per l'accreditamento del saggio di tossicità acuta con *Daphnia Magna*

Prodotto nell'ambito dell'Accordo
di Collaborazione ISPRA-ACCREDIA

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del **Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente** (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 186/2019
ISBN 978-88-448-0920-1

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Giovanna Giacomina Sentina

ISPRA

Coordinamento pubblicazione on line:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

Marzo 2019

Curatori del Manuale

Elisa Raso, Maria Gabriella Simeone (ISPRA), Beatrice Bargellini, Federico Pecoraro, Silvia Tramontin (ACCREDIA)

Il Manuale è una attività promossa dal Comitato di Coordinamento per l'attuazione dell'Accordo di Collaborazione ISPRA-ACCREDIA siglato nel 2010, finalizzato a rafforzare i rapporti di collaborazione tra il Sistema ISPRA/ARPA/APPA e ACCREDIA (Ente Unico Nazionale di accreditamento) sui temi inerenti la qualità e l'accreditamento.

Autori

Elisa Raso, Maria Gabriella Simeone, Cristian Mugnai (ISPRA), Alessandra Arizzi Novelli, Giulio Surrichio (ARTA Abruzzo), Elisabetta Ciccarelli (ARPA Umbria), Fabrizio Bandini (ARPAE Emilia Romagna), Chiara Suraci (ARPA Friuli Venezia Giulia), Marco Vincenzi, Mario Aragno (ARPA Piemonte), Laura Aguzzi (ARPA Lazio), Raffaella Verni (ARPA Lombardia), Francesco Vigna Guidi (ARPA Toscana), Stefano Comin, Rita Frate, Franco Rigoli (ARPA Veneto), Tristano Leoni (ARPA Marche).

Referee

Il documento è stato approvato dal Consiglio SNPA del 12 febbraio 2019 - Delibera 50/2019

Ringraziamenti

Si ringrazia ACCREDIA e il Comitato di Coordinamento per l'azione di guida e di sostegno.

INDICE

LISTA DELLE DEFINIZIONI, DEGLI ACRONIMI E RIFERIMENTI NORMATIVI 4

1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL DOCUMENTO.....	8
2. NORMATIVA DI RIFERIMENTO.....	8
2.1 La norma 17025 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura .	8
2.2 Il saggio con <i>Daphnia magna</i> nella normativa	9
3. REQUISITI PER LE RISORSE	11
3.1 Il Personale	11
3.2 Strutture condizioni ambientali	13
3.3 Dotazioni, taratura e riferibilità metrologica.....	14
3.3.1 Tarature.....	15
3.3.2 Taratura e controllo della temperatura negli apparecchi termostatati	15
3.3.3 Taratura e controllo delle bilance	17
3.3.4 Taratura e controllo della intensità luminosa negli apparecchi termostatati e nella stanza climatizzata	17
3.3.5 Taratura e controllo del sistema di ossigenazione.....	17
3.3.6 Taratura e controllo del pHmetro	17
3.4 Reagenti e materiali di laboratorio	17
3.4.1 Gestione dei materiali di laboratorio.....	19
3.5 Organismi	20
3.5.1 Gestione allevamento organismi di <i>Daphnia magna</i>	20
3.5.2 Alimentazione organismi.....	22
4. REQUISITI DI PROCESSO.....	25
4.1 Selezione, verifica e validazione del metodo di prova.....	25
4.1.1 Selezione	25
4.1.2 Validazione e verifica delle prestazioni del metodo.....	26
4.1.3 Parametri per la validazione.....	27
4.1.4 Circuiti interlaboratorio	28
4.1.5 Riesame periodico della validazione/verifica delle prestazioni dei metodi	28
4.2 Valutazione dell'incertezza	29
4.2.1 Valutazione dei fattori influenti sull'incertezza.	29
4.2.2 Approcci alla valutazione dell'incertezza nella prova di tossicità con <i>Daphnia magna</i>	30
4.2.3 L'incertezza sul parametro EC_{50} (EC_x)	31
4.2.4 Valutazione dell'incertezza sull'inibizione percentuale ai fini dell'accettabilità di un effluente.	33
4.3 Campionamento, trasporto e conservazione del campione	41
4.3.1 Campionamento e trasporto	41
4.3.2 Conservazione del campione.....	41
4.3.3 Trattamento del campione prima della analisi	42
4.4 Assicurazione della validità dei risultati	42
4.4.1 Controllo di qualità analitico interno	42
4.4.2 Controllo di qualità analitico esterno	43
4.5 Presentazione dei risultati.....	44
4.5.1 Criteri e requisiti per l'approvazione dei risultati.....	44
4.5.2 Rapporto di prova	45
Allegato A.....	47
“Caratteristiche generali e confronto dei metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i>”	47

LISTA DELLE DEFINIZIONI, DEGLI ACRONIMI E RIFERIMENTI NORMATIVI

Accreditamento: attestazione da parte di un Organismo Nazionale di Accreditamento che certifica che un determinato Organismo di Valutazione della Conformità soddisfa i criteri stabiliti da norme armonizzate e, ove appropriato, ogni altro requisito supplementare, compresi quelli definiti nei rilevanti programmi settoriali, per svolgere una specifica attività di valutazione della conformità (Reg. CE N. 765 Capo 1, Art. 2, Comma 10).

Accuratezza: Grado di concordanza fra un valore misurato e il valore vero di un misurando. (VIM “Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) “UNI CEI 70099).

Campione di riferimento: Oggetto o apparecchio per la misurazione usato per definire, realizzare, conservare o riprodurre un'unità ovvero uno o più valori noti di una grandezza per trasmetterli per confronto ad altri strumenti di misurazione.

CAS: numero di registro attribuito dal Chemical Abstract Service (CAS), divisione della American Chemical Society (Columbus, Ohio, USA) che assegna questo numero identificativo univoco ad ogni sostanza chimica descritta in letteratura.

CE o EC: numero CE presente in ESIS che comprende N° EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances - GU C 146 A del 15.6.1990), il numero ELINCS (European List of Notified Chemical Substances) per le sostanze nuove ed il numero NLP (No-Longer Polymers).

Coefficiente di Variazione (CV): rapporto percentuale scarto tipo (deviazione standard) di una serie di misurazioni eseguite su aliquote diverse di uno stesso campione sul valore medio di tali misurazioni.

EA: European Accreditation. Network Europeo degli enti di accreditamento (<http://www.european-accreditation.org/>).

EC50: *Effective Concentration 50*. Concentrazione di Effetto mediana. Rappresenta la concentrazione che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla morte (ad es. immobilizzazione, ritardo di crescita, ecc.) in saggi sia acuti che cronici. E' da riferirsi al tempo di esposizione. Si può calcolare anche rispetto a percentuali di mortalità diverse, es. del 100% (EC₁₀₀).

Endpoint tossicologico: il *tipo di effetto* (“tipo di danno, ovvero la funzione biologica compromessa) che viene misurato in un saggio ecotossicologico (mortalità, immobilizzazione, effetti sulla riproduzione, effetti sulla crescita degli individui, effetti sulla crescita di una popolazione, alterazione di parametri metabolici o fisiologici, alterazioni di caratteristiche comportamentali).

ESIS: European chemical Substances Information System. Sistema di informazione europeo sulle sostanze chimiche.

IUPAC: acronimo di International Union of Pure and Applied Chemistry (in italiano *Unione Internazionale di Chimica Pura ed Applicata*), che opera in accordo ed armonizza la propria nomenclatura e terminologia, ove necessario, con la IUPAP e la ISO ed adotta il Sistema internazionale di unità di misura.

LC₀: *Lethal Concentration 0*, Concentrazione Letale 0. Concentrazione che non determina alcuna mortalità della popolazione. Generalmente estrapolata dalle curve di tossicità in saggi acuti.

LC₅₀: *Lethal Concentration 50*. Concentrazione Letale mediana. Rappresenta la concentrazione che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per esposizione ambientale (es. tossicità acquatica o inalatoria). Si deve riferire al tempo di esposizione (es. LC₅₀ 48 ore).

LD₀: *Lethal Dose 0*. Dose che non determina alcuna mortalità della popolazione. Generalmente estrapolata dalle curve di tossicità in saggi acuti.

LD₅₀: *Lethal Dose 50*. Dose Letale mediana. Dose della sostanza che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per *somministrazione diretta*. Si esprime generalmente per unità di peso corporeo dell'individuo (es. mg/kg di peso corporeo). Si può considerare anche l'effetto su percentuali di mortalità diverse, (es. 90% LD90).

LL₅₀: *Lethal Loading 50*. Carico Letale mediano. Concettualmente analogo alla LC₅₀ ma riferito ad una quantità scaricata nel sistema ambientale esposto.

Loading rate concentration: tasso di carico, la quantità del prodotto che si deve mettere in equilibrio con il mezzo acquoso del test al fine di produrre un determinato “livello di effetto”.

LOAEL: Lowest-Observed Adverse-Effect Level. Rappresenta il livello (generalmente dose) più basso al quale è possibile evidenziare un effetto negativo.

LOEC: Lowest-Observed Effect Concentration. Rappresenta la concentrazione più bassa alla quale è possibile evidenziare un effetto.

LOEL: Lowest-Observed-Effect Level. Rappresenta il livello più basso al quale è stato possibile evidenziare un effetto.

LT₅₀: *Lethal Time 50*. Tempo Letale mediano. Rappresenta il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui esposti a una concentrazione determinata di una sostanza.

Materiale di Laboratorio: Materiale o sostanza utilizzata in Laboratorio necessaria per l'esecuzione delle attività di prova. (es.: reagenti, kit, vetreria, etc.)

Materiale di riferimento (RM): Materiale, sufficientemente omogeneo e stabile rispetto a una o più proprietà specificate, che è stato stabilito essere idoneo per il suo utilizzo previsto in un processo di misurazione (UNI CEI EN ISO 17034).

Materiale di riferimento certificato (CRM): Materiale di riferimento caratterizzato mediante una procedura metrologicamente valida per una o più proprietà specificate, accompagnato da un certificato del materiale di riferimento che fornisce il valore della proprietà specificata, dalla sua incertezza associata, e da una dichiarazione sulla riferibilità metrologica (UNI CEI EN ISO 17034).

Metodo di prova: Procedura tecnica specificata per eseguire una prova (ACCREDIA RT-08).

Metodo di prova normalizzato: metodo approvato da organismi di normazione nazionali, europei o internazionali (ad es. UNI, CEI, CEN, ISO, UNICHIM, ASTM, AOAC, ecc) o da organismi pubblici autorevoli (es. USDA, FDA, EPA, NIOSH, IUPAC, APHA, OIV, OIE, WHO, APAT, CNR, IRSA, ISPRA, NMKL, ecc.) (ACCREDIA RT-08).

Metodo di prova non normalizzato: metodo emesso da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali e metodo sviluppato da laboratori/centri di riferimento nazionali o comunitari o da centri di referenza nazionali accreditati. Elemento discriminante è che la responsabilità dei dati forniti è riferita non all'organizzazione che lo ha emesso, ma ai singoli autori (ACCREDIA RT-08).

Metodo di prova ufficiale: metodo di prova riportato o richiamato in documenti normativi cogenti e/o pubblicato su Gazzetta Ufficiale Italiana (GU) o dell'Unione Europea (GUCE) o comunque richiamato o riportato in un documento emesso da una autorità quale Regione, Provincia, ecc. La qualifica di "ufficiale" è una proprietà trasversale indipendente dal grado di esaustività dei contenuti. Un metodo ufficiale può essere "normalizzato" o "non normalizzato"NOTA: gli articoli pubblicati su riviste (es. pubblicati sul Journal AOAC, Bollettino dei Chimici Igienisti, ecc.) non possono essere considerati metodi ufficiali in quanto la responsabilità del metodo è degli autori, e non dell'editore.

Metodo di prova sviluppato dal laboratorio (interno): metodo di prova messo a punto o adottato da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall'esperienza pratica. Il metodo interno può essere sia un metodo sviluppato dal laboratorio che un metodo normalizzato o non normalizzato che è stato sostanzialmente modificato a seguito di particolari esigenze del laboratorio (ACCREDIA RT-08).

NOAEC: *No-Adverse Effect Concentrations*. Concentrazione che non produce effetti avversi.

NOEC: *No-Observed Effect Concentration*. Concentrazione di nessun effetto osservato.

NOEL: *No-Observed Effect Level*. Rappresenta il livello più alto (concentrazione o dose) al quale non si è manifestato alcun effetto. Di norma si riferisce a saggi di tossicità cronica a lungo termine, ma può essere riferito anche a saggi di tossicità acuta.

Norma: Documento prodotto mediante consenso e approvato da un organismo riconosciuto che fornisce, per usi comuni e ripetuti, regole, linee guida o caratteristiche relative a determinate attività o ai loro risultati, al fine di ottenere il miglior ordine in un determinato contesto.

Organismo test: Organismo sul quale viene effettuato il test ecotossicologico.

Precisione: Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite (ISO 5725-1 "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions").

Procedura di prova: Documento nel quale vengono dettagliate le modalità esecutive adottate dal laboratorio non compiutamente descritte dal metodo di prova. (ACCREDIA RT-08)

Prova: Determinazione di una o più caratteristiche di un oggetto di valutazione della conformità, secondo una procedura (ACCREDIA RT-08)

Reagente: Sostanza pura o soluzione pronta per l'utilizzo, acquistata dal laboratorio.

Ripetibilità: Precisione in condizioni di ripetibilità (ISO 5725-1).

Riproducibilità: Precisione in condizioni di riproducibilità (ISO 5725-1)

Risposta: Quantificazione dell'effetto che si vuole misurare e si può esprimere come percentuale di incidenza in una certa popolazione dell'effetto stesso.

Robustezza: La robustezza di una procedura analitica è una misura della sua capacità di non essere influenzata da piccole, ma deliberate variazioni nei parametri del metodo e fornisce una indicazione della sua attendibilità durante il suo normale utilizzo (ISO 5725-1).

Saggio di tossicità: Prova sperimentale che definisce in termini quantitativi la relazione tra esposizione ed effetto. Tradizionalmente gli studi per la stima di tossicità prendono in considerazione l'effetto mortalità. In tal senso, un saggio di tossicità consiste nel sottoporre alcuni organismi, a dosi

crescenti di campione tossico, per un determinato periodo di tempo, al termine del quale sono contati, per ogni dose, il numero di organismi morti.

Saggio di ecotossicità o saggio ecotossicologico: Saggio di tossicità che utilizza modelli biologici (batteri, alghe, crostacei, pesci, vermi, ecc..) per misurare l'attività di sostanze potenzialmente tossiche per l'ambiente.

Saggio di tossicità acuta o a breve termine: Prova sperimentale che valuta gli effetti derivanti dall'esposizione di una popolazione ad un campione tossico, somministrato in una volta, per un breve periodo di tempo (24-96 ore). E' detto anche saggio di tossicità a breve termine perché copre un arco temporale ridotto rispetto al ciclo di vita dell'organismo saggiato.

Saggio di tossicità prolungata (o a lungo termine): Prova sperimentale che valuta gli effetti derivanti dall'esposizione di una popolazione ad un campione tossico, somministrato in una volta, per periodi di tempo che coprono l'intero ciclo vitale, o una parte significativa di esso, o più cicli, dell'organismo saggiato.

Saggio di tossicità cronica: Valutazione degli effetti derivanti dall'esposizione di una popolazione all'azione di un campione tossico, somministrato a basse dosi, nel tempo. L'effetto valutato è generalmente subletale, sulla riproduzione, velocità di crescita, modificazioni del comportamento, ecc.

Scarto tipo (deviazione standard): (di una variabile casuale o di una distribuzione di probabilità) radice quadrata della varianza (UNI CEI 70098-3)

SQA: Standard di Qualità Ambientale.

Validazione: Verifica nella quale i requisiti specificati sono adeguati a un utilizzo previsto (UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Verifica: Messa a disposizione dell'evidenza oggettiva che un dato elemento soddisfa uno o più requisiti specificati (UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

RIFERIMENTI NORMATIVI

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018	Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
UNI CEI EN ISO 17034:2017	Requisiti generali per la competenza dei produttori di materiali di riferimento
UNI EN ISO 9001:2015	Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti.
UNI CEI 70099:2008	Vocabolario internazionale di metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)
UNI CEI 70098-3:2016	Incertezza di misura - Parte 3: Guida all'espressione dell'incertezza di misura
UNI ISO 5725 - 1: 2004	Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 1: principi generali e definizioni
UNI ISO 5725 – 2:2004	Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 2: metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato.
Guide ISO/IEC 98-3:2008 (JCGM 100:2008)	Uncertainty in measurement - Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement
ISO 13528:2015	Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
ACCREDIA RT-08 Rev.04	Prescrizioni per l'accreditamento dei Laboratori di prova
Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	8020. Metodi di valutazione della tossicità con <i>Daphnia</i>
Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Determinazione dell'inibizione della mobilità di <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta
Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	Saggio di immobilizzazione acuta in <i>Daphnia sp.</i>
UNI EN ISO 7218:2013	Titolo:Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche
UNI EN ISO 10012:2004	"Sistemi di gestione della misurazione: Requisiti per i processi e le apparecchiature di misurazione";

EA-4-02 - 2013	Expression of uncertainty of measurement in calibration
EURACHEM 2013	Accreditation for Microbiological Laboratories 2013.
UNI EN ISO 13843:2017	Qualità dell'acqua - Requisiti per la definizione delle caratteristiche prestazionali di metodi microbiologici di tipo quantitativo
UNI EN ISO 10523:2012	Qualità dell'acqua - Determinazione del pH
UNI EN ISO 5814:2013	Qualità dell'acqua - Determinazione dell'ossigeno disciolto - Metodo elettrochimico a sonda
UNI EN ISO 5667-16:2017	Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 16: Guida al saggio biologico di campioni
OECD n° 23: 2000	Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals
ISO/TS 20281:2006	Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data

1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL DOCUMENTO

Negli ultimi anni il ricorso ai saggi ecotossicologici come indicatori per valutare gli effetti dell'inquinamento su matrici ambientali è aumentato considerevolmente e il richiamo al loro impiego si ritrova in molte delle più recenti normative nazionali ed europee.

Il documento è stato realizzato nell'ambito del piano di attività per l'attuazione del protocollo d'intesa ISPRA- ACCREDIA, siglato tra i due Enti per rafforzare i rapporti di collaborazione tra quest'ultima, ISPRA e le Agenzie Ambientali. Basato sull'esperienza e il confronto degli operatori dei laboratori del SNPA che hanno già l'accreditamento per questa prova o lo stanno programmando, e sul prezioso contributo dei colleghi di ACCREDIA, il documento ha lo scopo di fornire indicazioni operative per condurre le diverse fasi della prova con *Daphnia magna*, uno tra i saggi ecotossicologici più utilizzati, in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e alle prescrizioni ACCREDIA.

Per ciascun argomento nel testo sono sempre riportati i riferimenti espliciti ai requisiti che **devono** essere soddisfatti per l'accreditamento, punto della norma e della prescrizione ACCREDIA, seguiti da indicazioni/esempi operativi. Questi ultimi sono quindi da intendersi come possibili modalità per operare in conformità a tali requisiti/prescrizioni, basate sull'esperienza degli operatori. Tali indicazioni non sono obbligatorie e il ricorso al verbo dovere, declinato in tutte le sue forme, è da intendersi finalizzato solo al caso si intenda applicare le indicazioni presentate.

Infine, considerando che nel caso del saggio con *Daphnia magna* esistono tre metodi di prova normalizzati, il testo fornisce una analisi comparata tra questi per favorire la scelta di quello che meglio risponde agli obiettivi del laboratorio stesso.

2. NORMATIVA DI RIFERIMENTO

In seguito al Regolamento Europeo n. 765, del 9 luglio 2008 ACCREDIA (associazione senza scopo di lucro nata dalla fusione di SINAL e SINCERT con il contributo di SIT - INRIM, ENEA e ISS) è stata designata dal Governo Italiano come l'Ente unico per l'Italia per l'accreditamento.

Le è stato così affidato il compito di attestare che gli organismi di valutazione della conformità, come ad esempio gli organismi di certificazione ed ispezione, i laboratori di prova/taratura (inclusi quelli per la sicurezza alimentare), abbiano le competenze per valutare la conformità dei prodotti, dei processi e dei sistemi agli standard di riferimento. ACCREDIA opera sotto la vigilanza del Ministero dello Sviluppo Economico e svolge un servizio di pubblico interesse. A tal fine esso valuta la competenza, l'indipendenza e l'imparzialità degli operatori di valutazione della conformità (Laboratori e Organismi), accertandone la conformità a regole obbligatorie e norme volontarie, per assicurare il valore e la credibilità delle certificazioni, ispezioni, prove e tarature.

L'accreditamento consente ai laboratori di emettere, per le prove accreditate, rapporti di prova con il marchio ACCREDIA, attestando quindi che le stesse sono state eseguite in conformità al metodo di prova e nel rispetto delle prescrizioni della 17025 e di ACCREDIA, a valle di una costante e rigorosa azione di sorveglianza sul comportamento del laboratorio stesso. Grazie agli accordi di mutuo riconoscimento che ACCREDIA ha stipulato in ambito europeo (EA MLA) e mondiale (ILAC MRA), i rapporti di prova emessi sotto accreditamento sono riconosciuti a livello internazionale.

2.1 La norma 17025 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura

Il documento riferisce alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. La norma esplicita nell'ordine i requisiti generali, quelli strutturali, relativi alle risorse, di processo e, infine, del sistema di gestione.

L'accreditamento attesta la competenza tecnica del Laboratorio di prova ad effettuare le prove indicate nello scopo di accreditamento e l'attuazione presso il Laboratorio stesso di un sistema gestionale per la qualità allineato ai principi della UNI EN ISO 9001.

I requisiti per l'accreditamento prevedono che il laboratorio abbia un organigramma gestito dal Sistema di Gestione Qualità (SGQ), che rifletta chiaramente la sua organizzazione esplicitando le responsabilità e le relazioni tra le funzioni che influenzano l'operatività del laboratorio. Per le funzioni preposte al mantenimento del SGQ è chiaramente richiesto che siano in grado di presidiare adeguatamente il Sistema assicurando l'attuazione e l'operatività in ogni momento.

Il laboratorio deve stabilire e mantenere attive procedure per il controllo e la gestione di tutto il sistema, compresa la documentazione relativa alla competenza di ogni funzione preposta ad attività

che hanno influenza sulle attività di laboratorio, a partire da una chiara identificazione, documentata da apposita autorizzazione, delle attività specifiche assegnate.

Con riferimento alla correttezza e affidabilità delle prove e/o delle tarature, il laboratorio deve ad esempio assicurare di tenere sotto controllo fattori quali i metodi, le procedure di prova e di taratura, la formazione, l'addestramento e la qualifica del personale, la scelta e la taratura delle apparecchiature da utilizzare, la postazione di lavoro e le condizioni ambientali.

Uno schema semplificato del processo di accreditamento è riportato in figura 1.

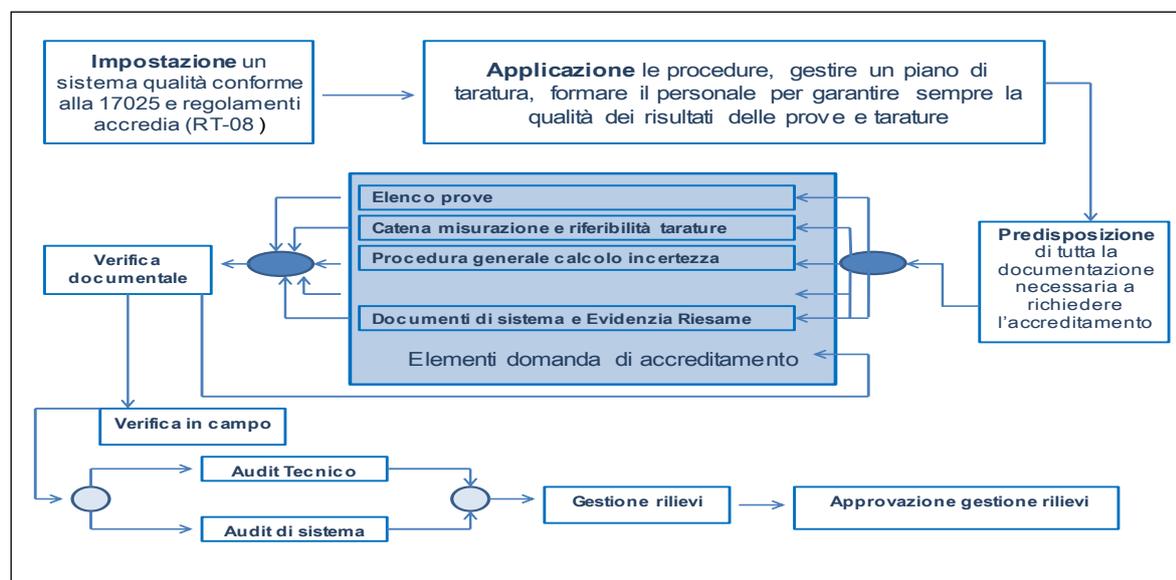


Figura1- Schema del processo di accreditamento di un laboratorio

2.2 Il saggio con *Daphnia magna* nella normativa

Le norme nazionali e i Regolamenti Europei che richiedono il saggio con *Daphnia magna*, sono diversi; nella tabella sottostante, tabella 1, è riportato un elenco a titolo di panoramica non esaustiva.

Tabella 1

Normativa	Campo di applicazione	Richiesta
Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH)	Registrazione delle sostanze prodotte in quantità ≥ 1 ton/anno (Allegato VII punto 9.1.1) in mancanza di dati ecotossicologici disponibili.	Sperimentazione della tossicità a breve termine su invertebrati (specie preferita <i>Daphnia magna</i>)
Decreto Legislativo 210/2010 e s.m. (che modifica la parte IV del D.Lgs. 152/2006) ¹	Rifiuti a composizione non determinabile e voci specchio ² per i quali va determinata la caratteristica di pericolo "ecotossico" H14 ³ .	Valutazione di EC50-48h con <i>Daphnia magna</i> (metodo TG OECD 202) ⁴
Decreto Legislativo 152/2006	• Accettabilità delle acque di scarico (in acque superficiali, in fognatura e sul suolo)	Obbligatorio il saggio di tossicità acuta (24 h) con <i>Daphnia magna</i>
	• Classificazione della qualità dei corsi d'acqua: analisi supplementari sulla matrice acquosa (da effettuarsi a giudizio dell'autorità che effettua il monitoraggio in caso di degrado del corpo idrico)	Saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i>
	• Fissazione degli EQS per acqua, sedimenti e biota	Valutazione dei dati relativi agli effetti acuti e cronici di <i>Daphnia magna</i>
Regolamento (CE) n° 1272/2008 (Regolamento CLP)	Classificazione delle sostanze come pericolose per l'ambiente acquatico, in assenza di dati, (categoria acuto 1) e per le sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica (categoria cronico 1, 2 e 3)	Determinazione di EC50-48h con crostacei

Note:

¹ Recepimento della Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti

² Sono definite voci specchio (*mirror entries*) quei rifiuti che possono essere pericolosi e non pericolosi in funzione della presenza o meno di sostanze pericolose e che al superamento di determinati valori limite, conferiscono al rifiuto una o più caratteristiche di pericolo (da H1 → H15).

³ Per la caratteristica di pericolo “ecotossico” H14 è lasciato agli SM l’onere dello studio e dell’applicazione di metodi adeguati per la valutazione. In Italia la legge n° 28 del 2012 (art. 3 punto 6) stabilisce che la caratteristica H14 debba essere attribuita ai rifiuti secondo le modalità dell’accordo ADR per la classe 9-M6 e M7”.

⁴ Anche metodi equivalenti conformi alle Buone Pratiche di Laboratorio

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) (con i suoi aggiornamenti e allegati tecnici <http://reach.sviluppoeconomico.gov.it/testo-del-regolamento>). Questo Regolamento prevede la registrazione di tutte le sostanze prodotte o importate nella Comunità in quantità maggiori di una tonnellata per anno. La registrazione di una sostanza comporta la presentazione da parte dei fabbricanti/importatori, di alcune informazioni di base sulle sue caratteristiche e, in mancanza di dati disponibili, nell'esecuzione di test sperimentali per caratterizzare le relative proprietà fisico-chimiche, tossicologiche e ambientali. Nel caso di sostanze prodotte in quantità ≥ 1 ton/anno e in assenza di dati ecotossicologici su organismi acquatici, il crostaceo *Daphnia magna* è considerato preferibile per la valutazione della tossicità a breve termine su invertebrati.

Il 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 detto anche Regolamento CLP. Prevede per la classificazione delle sostanze come pericolose per l'ambiente acquatico, in assenza di dati, (pericolo a breve termine – categoria acuto 1) e per le sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica (categoria cronico 1, 2 e 3) la determinazione della EC50 a 48 ore con i crostacei.

Il Decreto Legislativo 152/2006 ha come obiettivo primario la promozione dei livelli di qualità della vita umana, da realizzare attraverso la salvaguardia ed il miglioramento delle condizioni dell'ambiente e l'utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali.

Nello specifico il decreto nella parte terza che disciplina la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche; indica come obbligatorio nell' Allegato 5 - Limiti di emissione degli scarichi idrici l'utilizzo del saggio su *Daphnia magna*. Oltre a questo per scarichi di acqua salata è possibile eseguire saggi di tossicità acuta su *Ceriodaphnia dubia*, *Selenastrum capricornutum*, batteri bioluminescenti o organismi quali *Artemia salina*, o altri organismi tra quelli indicati ai sensi del punto 4 dello stesso allegato. Infine stabilisce che, in caso di esecuzione di più test di tossicità, si debba considerare quello che fornisce il risultato peggiore.

Lo stesso decreto nell'Allegato 1 - Monitoraggio e classificazione delle acque in funzione degli obiettivi di qualità ambientale per il monitoraggio e classificazione: acque superficiali, punto 3, nel caso dei corsi d'acqua, punto 3.2.1, per la determinazione degli Indicatori di qualità e analisi da effettuare richiama nel caso del biota, 3.2.1.2, e dei sedimenti, 3.2.1.3, il saggio con *Daphnia magna*

Il Decreto Legislativo 210/2010 e ss.mm.ii che modifica la parte IV del decreto legislativo 152/2006 riguardante le “Norme in materia di gestione dei rifiuti e di bonifica dei siti inquinati”, recepisce la Direttiva Europea sui rifiuti 2008/98/CE e stabilisce che un rifiuto è classificato come pericoloso solo se le sostanze (pericolose) raggiungono determinate concentrazioni, tali da conferire al rifiuto in questione, una o più delle proprietà di pericolosità da HP1 ad HP15. Tuttavia, a differenza dei rifiuti la cui caratteristica è definita a priori sulla base delle sostanze pericolose contenute in esso ed è vincolante, nel caso dei rifiuti a composizione non determinabile e per le voci specchio (*mirror entries*), la pericolosità del rifiuto deve essere valutata. In particolare, per la valutazione di ecotossicità (pericolo HP14) di un rifiuto (essendo stata lasciata agli Stati Membri l’onere dello studio e dell’applicazione di metodi adeguati) l’Italia per il momento ha stabilito di attribuire tale caratteristica secondo le modalità dell’Accordo Europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose su strada (ADR) (<http://www.mit.gov.it/mit/site.php?p=cm&o=vd&id=3689>). L’accordo prevede, oltre ai saggi con alghe e pesci, anche il saggio di tossicità acuta con *D. magna* per la determinazione del valore di EC50 a 48 h, secondo il metodo OECD TG 202 o altri metodi equivalenti.

3. REQUISITI PER LE RISORSE

3.1 Il Personale

I requisiti e le relative prescrizioni ACCREDIA per il personale sono fissati al punto 6.2 della norma 17025 e del RT-08.

In generale il laboratorio deve disporre di procedure per la determinazione dei requisiti di competenza necessaria per la specifica attività, sulla base dei quali individuare il personale da autorizzare all'esecuzione della stessa. Questa autorizzazione deve essere rilasciata a valle di un percorso di valutazione documentato del possesso dei requisiti individuati, che consenta anche l'individuazione della necessità di attività formative. L'autorizzazione così ottenuta deve essere monitorata secondo un percorso individuato, ovvero alla sua sospensione in caso di mancato raggiungimento dei criteri stabiliti.

Di queste attività, la norma chiede la conservazione delle registrazioni con le relative evidenze.

Di seguito un esempio di procedura per l'impostazione di un percorso di formazione e del suo monitoraggio:

Formazione

Individuazione dei requisiti: il responsabile della prova stabilisce i requisiti per l'esecuzione della specifica attività e del percorso per determinare la necessità di formazione.

Individuazione del personale: individua gli operatori e valuta la necessità di un percorso formativo e di addestramento.

Percorso formativo: la parte teorica può essere lo studio del metodo di prova, ciclo vitale dell'organismo test e altro; per quella relativa all'esecuzione pratica può definito un percorso di affiancamento a personale esperto specifico per un periodo stabilito calcolato anche in funzione del carico di lavoro e dello scopo dell'accreditamento.

Autorizzazione: a valle del percorso formativo segue la verifica del possesso dei requisiti prestabiliti per quella specifica prova. Di seguito si suggeriscono alcune tipologie di verifiche:

verifica del rispetto dei criteri riportati nel metodo di prova normalizzato ad esempio parametri di precisione e/o accuratezza;

esecuzione del test con prova in doppio con tossico di riferimento ad una concentrazione prefissata;

verifica del grado di accuratezza (grado di concordanza tra valore misurato e valore atteso) mediante effettuazione della prova con un tossico di riferimento;

partecipazione all'iter di validazione del metodo da accreditare;

esito della partecipazione a circuiti interlaboratorio rientrante nei limiti di accettabilità definiti dall'organizzatore.

Monitoraggio

L'abilitazione ottenuta per effettuare un dato saggio ecotossicologico deve essere periodicamente verificata con prove finalizzate al mantenimento in qualifica, ovvero alla sua sospensione in caso di mancato raggiungimento del criterio prestazionale previsto. In generale non è necessario per il mantenimento in qualifica ripercorrere tutte le attività necessarie per l'abilitazione. Il mantenimento della qualifica deve essere effettuato periodicamente, anche in funzione della frequenza di esecuzione delle prove stesse e esplicitamente indicate.

Un esempio di percorso per il mantenimento della qualifica si può riassumere con l'esecuzione di una prova in doppio, l'utilizzo di carte di controllo e la partecipazione a circuiti interlaboratorio.

Tipologia di verifiche:

Prova in doppio: esecuzione, in condizioni di ripetibilità, di una prova in doppio ad una sola concentrazione del tossico di riferimento scelta, ad esempio, vicino al valore di EC50 del tossico di riferimento in fase di validazione. Alternativamente la prova può essere la determinazione della percentuale di immobilizzazione ad una o più concentrazioni del tossico di riferimento utilizzato in fase di validazione, possibilmente vicino ai limiti di accettabilità definiti dal metodo utilizzato.

La differenza tra la percentuale di effetto di ciascuna replica dovrà rispettare la seguente relazione:

$$|x_1 - x_2| \leq r$$

dove r è il limite di ripetibilità, generalmente espresso in percentuale, calcolato in fase di validazione del metodo o riportato nel metodo normalizzato e x_1 e x_2 sono i risultati di immobilizzazione ottenuti nelle due prove. Per il calcolo del limite di ripetibilità si rimanda al paragrafo 4.4.

*Valutazione della capacità riproduttiva di *Daphnia magna*:* secondo una periodicità scelta dal laboratorio, vengono isolate singolarmente dafnie adulte in attiva riproduzione partenogenetica, in

prossimità del parto, di età compresa tra il terzo parto e il 50° giorno di vita. L'isolamento viene effettuato mantenendo le medesime condizioni dell'allevamento.

Le condizioni di prossimità al parto sono verificabili tramite l'osservazione della presenza di uova di colore aranciato o scuro nella camera di incubazione.

A parto avvenuto, per il cui inizio e completamento può essere necessario un tempo variabile da poche ore fino a circa un giorno, si effettua il conteggio del numero di dafnidi vivi presenti nel mezzo di isolamento.

Il laboratorio stabilisce un numero medio minimo di neonati vivi accettabile, generalmente maggiore di 20 e prossimo a 60.

Valutazione della vita media: con questa prova, effettuata con periodicità scelta dal laboratorio, si verifica la durata della vita media degli organismi allevati. Le dafnie sono mantenute nelle condizioni di allevamento per un periodo scelto dal laboratorio in base alle proprie modalità di gestione e al termine del periodo viene valutata la mortalità degli organismi.

Utilizzo delle carte di controllo (CC): in ecotossicologia le carte di controllo possono essere utilizzate per verificare se la risposta del modello biologico è confrontabile con quella prodotta in precedenza nello stesso laboratorio di prova e con lo stesso protocollo metodologico.

Per il saggio con *Daphnia magna*, trattandosi di dati quantali, quindi binari, è possibile realizzare CC sia per controlli negativi, che per controlli positivi (tossico di riferimento). Quest'ultimo caso prevede l'esecuzione di un saggio in singolo con tossico di riferimento e calcolo dell'EC50, che dovrà ricadere entro i limiti di riferimento riportati nel metodo, derivanti da circuiti interlaboratorio, da risultati di validazione del metodo o scelti dal laboratorio avvalendosi di dati riportati in letteratura; gli stessi limiti costituiscono, almeno nella fase iniziale, anche i limiti della carta di controllo del laboratorio. Per la realizzazione di una carta di controllo sono necessari minimo 10 valori, preferibilmente 20, con i quali procedere alla definizione degli indici caratteristici della carta stessa e, fino a quando la carta di controllo non è realizzata, ciascun valore di EC50 ottenuto sperimentalmente dovrà rientrare nel range $EC50 \pm 2$ volte la deviazione standard, utilizzando i dati riportati sul metodo di riferimento o scelti dal laboratorio.

Il limite di attenzione è costituito dalla soglia $EC50 \pm 2$ volte la deviazione standard, mentre quello di allarme è calcolato come $EC50 \pm 3$ volte la deviazione standard; nel caso di allarme occorre individuare e correggere le cause che hanno portato al superamento.

Ulteriori informazioni possono essere ottenute utilizzando la carta di controllo negativo del test di tossicità che viene costruita con almeno 20 valori delle percentuali di non conformità (p) ottenute dalle letture del numero di non conformità (np), risposte positive degli organismi esposti alla sola acqua di controllo o bianco. Dal valore medio delle percentuali di non conformità (\bar{p}) si ottengono i due valori di limite inferiore (LCL) e superiore (UCL) attraverso le seguenti formule:

$$UCL = \bar{p} + 3 \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n}}$$

$$LCL = \bar{p} - 3 \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n}}$$

dove n rappresenta il numero di organismi esposti.

Esecuzione di Test Intralaboratorio: viene effettuata una prova con una sostanza di riferimento; il risultato viene ritenuto accettabile se all'interno dell'intervallo stabilito dal Laboratorio sulla base di dati normati o bibliografici. Il risultato della prova viene registrato e validato mediante la firma dell'operatore che l'ha eseguita e dal responsabile.

Partecipazione a circuiti interlaboratorio: per il controllo di qualità dei dati è necessario che il laboratorio partecipi a circuiti interlaboratorio rivolgendosi, dove possibile, ad organizzazioni che operino in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043. Maggiori dettagli sono al §4.1

3.2 Strutture condizioni ambientali

I requisiti e le relative prescrizioni ACCREDIA sono fissati al punto 6.3 della norma 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08; da considerare inoltre la possibile presenza di norme ad hoc e /o di apparecchiature i cui manuali richiedono specifiche condizioni ambientali.

Le strutture e le relative condizioni ambientali dedicate alle attività legate alla esecuzione del saggio devono essere adeguate allo scopo e non devono influire negativamente sulla validità dei risultati. Le aree di lavoro su cui si suggerisce di porre maggiore attenzione sono quelle dedicate a:

- allevamento degli organismi (stabulario);
- schiusa delle cisti di ephippi;
- esecuzione della prova;
- attività di preparazione e conservazione/deposito dei reagenti/campioni ambientali;
- conservazione del materiale di laboratorio di uso comune e della vetreria;
- stoccaggio dei rifiuti.

Queste aree potranno essere costituite da locali veri e propri o da spazi appositi ricavati mediante separazione con porte e/o divisori o con altre delimitazioni per specifiche attività (ad esempio cappa dedicata, armadio termostato, banchi di lavoro dedicati, ecc.) al fine di evitare la contaminazione incrociata.

Tra gli aspetti da considerare:

- l' idoneità in termini di struttura, dimensioni ed ubicazione al fine di ridurre al minimo le interferenze con altre attività rispetto a quelle previste e permettere la corretta esecuzione della prova senza inficiarne la validità;
- la spaziosità per evitare rischi di danni/pericoli e per permettere agli operatori di muoversi comodamente; inoltre i locali non devono presentare condizioni ambientali tali da influenzare negativamente le attività che vi si devono svolgere;
- il mantenimento delle condizioni ambientali idonee, attraverso impianti di climatizzazione inverno/estate;
- il monitoraggio dei parametri ambientali (temperatura, intensità di luce, fotoperiodo ecc.) che lo necessitano (area allevamento, aree conservazione/deposito, ecc.);
- le modalità di distinzione ed identificazione delle diverse aree di lavoro previste;
- le modalità di accesso controllato del personale;
- le modalità di pulizia delle diverse aree;
- le informazioni riguardanti le misure di sicurezza;
- la predisposizione di idonei locali/spazi per l'archiviazione del materiale;
- la predisposizione di sistemi informatici per consentire la conservazione dei dati digitali;
- la gestione delle procedure di backup.

Di seguito si dettagliano alcune aree di lavoro specifiche per il test oggetto di questa trattazione.

➤ Area destinata all'allevamento degli organismi

Nel caso si ricorra all'allevamento e al mantenimento degli organismi di *Daphnia magna* si suggerisce l'allestimento di un locale/spazio che garantisca le condizioni idonee di mantenimento degli stessi nelle diverse fasi di vita. Quale ad esempio una stanza opportunamente climatizzata o un incubatore o un frigo termostato, ponendo sempre attenzione alla copresenza di eventuali attività che possano causare contaminazione incrociata.

Per il monitoraggio delle condizioni ambientali idonee all'allevamento, facendo anche riferimento alle indicazioni riportate sul metodo di prova utilizzato prescelto, si suggerisce di predisporre un piano che preveda la frequenza di esecuzione e il controllo di parametri quali:

- la temperatura, l'intensità di illuminazione ed il fotoperiodo;
- il sistema di areazione (concentrazione O₂), i filtri a carbone, i filtri da siringa, i diffusori a pietra porosa o altro sistema adsorbente;
- la dieta per il mantenimento degli organismi (ad esempio lievito di birra, alga *Pseudokirchneriella/Raphidocelis*) predisponendo, se necessario, uno spazio/area adeguata per la conservazione.

Maggiori informazioni sulla gestione degli allevamenti sono riportate la §3.5.1.

➤ **Area destinata alla schiusa degli ephippi**

Nel caso si decida di seguire il metodo ISO 6341 utilizzando organismi ottenuti da uova dormienti durature, ephippi, per i locali è necessario considerare:

- le modalità di conservazione degli ephippi fino al momento della prova;
- il controllo della temperatura e dell'intensità luminosa durante la fase di schiusa e di incubazione;
- la predisposizione di un sistema di areazione per l'acqua ISO Standard.

➤ **Area per l'esecuzione della prova**

L'area del laboratorio dedicata all'esecuzione del saggio di tossicità con *Daphnia magna* deve prevedere:

- uno spazio sufficiente per il posizionamento del numero di contenitori previsti per la prova;
- un'area adatta all'esecuzione della prova per l'esposizione dei neonati di *Daphnia magna*, al buio o che permetta la regolazione del fotoperiodo;
- il controllo della temperatura nella fase di esposizione;
- una tavola luminosa o uno stereo microscopio per l'osservazione e la conta degli organismi al termine dell'esposizione.

➤ **Area per le attività di preparazione, conservazione/deposito dei reagenti/campioni ambientali**

Il laboratorio deve disporre di un locale/area per le attività di manipolazione e preparazione dei reagenti/campioni ambientali e per la loro conservazione/deposito.

In quest'area sono presenti di solito cappe chimiche di aspirazione e tutti i reagenti (sali, acidi, basi e solventi) sono conservati in appositi spazi sottostanti alle cappe, o in armadi di sicurezza ventilati. I laboratori che intendono accreditare la prova, devono avere procedure/istruzioni operative nelle quali vengono descritte le modalità di preparazione, conservazione/deposito dei reagenti e dei campioni ambientali.

➤ **Area per la conservazione del materiale di uso comune e della vetreria**

Il laboratorio deve disporre di un locale/area appositamente dedicato alla conservazione dei materiali di uso comune nel laboratorio e della vetreria. La vetreria utilizzata per la prova e per gli allevamenti di *Daphnia magna* e delle alghe, dovrebbe essere lavata separatamente; la vetreria di classe A, utilizzata per la preparazione delle soluzioni di prova, dovrebbe essere conservata separatamente da quella ordinaria, in spazi appositamente identificati e qui nuovamente riposta dopo le operazioni di pulizia e/o sterilizzazione.

Le modalità di gestione e conservazione del materiale di uso comune e della vetreria, dovrebbero essere riportate in apposite procedure/istruzioni operative.

➤ **Area per lo stoccaggio dei rifiuti**

Le aree destinate alle attività di allevamento e di esecuzione della prova sono incompatibili con quelle per lo stoccaggio dei rifiuti; pertanto i laboratorio dovranno adottare misure per evitare la contaminazione incrociata.

Per le prescrizioni sulla sicurezza e la gestione dei rifiuti dovrebbero essere adottate specifiche istruzioni operative.

3.3 Dotazioni, taratura e riferibilità metrologica

La norma 17025 richiede che il laboratorio disponga delle dotazioni necessarie per eseguire correttamente le attività del laboratorio e che possono influire sui risultati, punto 6.4.1, e di una procedura per la manipolazione, il trasporto, la conservazione, l'utilizzo e la manutenzione programmata di queste, per assicurarne il corretto funzionamento, prevenirne la contaminazione o deterioramento, punto 6.4.3.

Si sottolinea che tutti i materiali e le attrezzature utilizzati non devono rilasciare sostanze tossiche e per quelle dotazioni che possono influire sulle attività di laboratorio di conservare le registrazioni che comprendano almeno quanto indicato al punto 6.4.13. Il laboratorio deve assicurare che le

apparecchiature utilizzate per le misurazioni consentano di ottenere risultati validi rispetto alla accuratezza e incertezza di misura richiesta.

Per l'esecuzione di prove con *Daphnia magna* di seguito si riporta un elenco indicativo delle attrezzature e apparecchiature necessarie.

Attrezzature

Matracci da 1000 mL in vetro
Matracci da 200mL in vetro
Matracci da 2 L
Becker in vetro da 100 mL
Becker in vetro da 50 mL
Pipette graduate monouso
Piano luminoso
Stereomicroscopio
Vasche in vetro (cristallizzatori) di capacità di 3÷5 L
Setaccio
Bottiglie di vetro con tappo a vite
Pipette Pasteur
Dispositivi di filtrazione su membrana Sistema di aerazione a bassa portata e pressione

Apparecchiature

Frigotermostato
Frigotermostato illuminato
Computer con software per elaborazione dati
Frigorifero
Congelatore
Contaparticelle
Camera per conta cellule
Microscopio
Stanza climatizzata in condizioni di luce e di temperatura controllate
Sistema di illuminazione per ottenere 1000 lux a livello delle vasche e 4000 lux per le alghe dotato di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
Termometri Data-Logger;
pHmetro
Bilancia tecnica
Ossimetro
Centrifuga
Luxmetro
Autoclave
Impianto di produzione di acqua bidistillata

3.3.1 Tarature

Per assicurare risultati affidabili è necessario che le apparecchiature che hanno influenza sulla accuratezza o sull'incertezza di misura siano tarate per stabilire la riferibilità metrologica dei risultati stessi, come prescritto dal punto 6.4.6 al 6.5.3 della norma 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08. Se le tarature sono affidate a centri esterni questi devono essere accreditati per le grandezze e le incertezze di interesse da Istituti Metrologici Nazionali e Istituti designati (NMI) coperti dall'accordo CIPM-MRA, o da Laboratori di taratura accreditati, firmatari dell'accordo EA-MLA o ILAC-RLA. Nel caso non siano disponibili, si ricorda quanto previsto dai casi 3a e 3b del punto 6.5 del Regolamento ACCREDIA RT-08. Se il laboratorio effettua tarature interne queste devono essere eseguite da personale qualificato secondo procedure ad hoc, utilizzando campioni di riferimento riferibili per le grandezze di interesse, per campi di misura ed incertezze appropriati. Questi devono essere dedicati esclusivamente alle attività di tarature e a quelle per i controlli intermedi dello stato di taratura. Per le tarature interne si deve fare ricorso alla normativa tecnica, linee guida ACCREDIA, EURAMET, EURACHEM. Il Regolamento ACCREDIA RT-08 riporta le indicazioni minime richieste da indicare nella procedura di taratura.

La norma richiede che le apparecchiature siano tarate, secondo un programma documentato, che includa lo scadenziario ad intervalli regolari (determinato in relazione a quanto previsto dai documenti tecnici di riferimento) e le responsabilità; che sia riesaminato e aggiornato al fine di mantenere la fiducia nello stato di taratura stesso.

Tutte le apparecchiature soggette a taratura devono essere etichettate in modo da rendere chiaro lo stato di taratura e/o il periodo di validità.

Di seguito si forniscono alcune indicazioni per le tarature di dotazioni, generalmente impiegate.

3.3.2 Taratura e controllo della temperatura negli apparecchi termostatati

Le norme di riferimento per le tarature sono:

- SIT/Tec-002/01 rev.0 08/11/2001: Linea guida per la taratura di misuratori di temperatura;

-
- UNI EN ISO 10012 “Sistemi di gestione della misurazione: Requisiti per i processi e le apparecchiature di misurazione”;
 - EURACHEM Accreditation for Microbiological Laboratories.

- **Termometro di riferimento**

La taratura periodica dei misuratori di temperatura, deve essere affidata a un centro esterno che risponda a quanto richiesto dalla norma 17025 e dal Regolamento ACCREDIA RT-08, al punto 6.5.1. Il laboratorio utilizza i dati di correzione e l'incertezza riportati nel certificato di taratura.

La taratura è accettata quando:

- a) l'incertezza dichiarata è compatibile con quella richiesta;
- b) la deriva del termometro è accettabile. La deriva è valutata calcolando l'errore normalizzato sulla correzione dell'ultima taratura rispetto alla taratura precedente, per ogni punto di misura.

La verifica intermedia di taratura si esegue annualmente effettuando 10 letture a 0°C, al punto di ghiaccio fondente.

- **Termometri di lavoro**

I termometri di lavoro devono essere tarati rispetto al termometro di riferimento. Di questa si deve effettuare la verifica intermedia, definendone le frequenze.

Sono utilizzati per il controllo delle apparecchiature di prova (es. incubatori), delle apparecchiature destinate alla conservazione dei campioni/reagenti (es. frigoriferi, congelatori), della temperatura ambiente.

La taratura è periodica e si esegue per confronto del termometro di lavoro con il termometro di riferimento tarato. Per ogni punto di taratura previsto si eseguono 10 letture del termometro di riferimento e contemporaneamente altrettante letture del termometro in taratura.

L'incertezza di misura composta è valutata considerando:

- la ripetibilità a breve termine dello strumento (scarto tipo delle misure)
- l'incertezza di tipo B del termometro di riferimento certificato LAT
- l'unità di formato di lettura dello strumento in taratura

Se si opera secondo le condizioni previste dalla norma EA-4/02, l'incertezza estesa (U) espressa a livello di fiducia di circa 95% è pari a 2 volte la radice quadrata della somma quadratica delle incertezze tipo (u) dei singoli contributi considerati.

L'incertezza estesa dello strumento in taratura è calcolata dall'incertezza composta assumendo un fattore di copertura k pari a 2 corrispondente al limite di confidenza di circa il 95% (incertezza estesa = incertezza composta x 2).

Per i termometri di lavoro deve essere garantita, di norma, una risoluzione estesa di taratura non superiore a 1/4 dell'errore massimo ammesso (o tolleranza) che lo strumento deve monitorare [UNI EN ISO 7218].

Per alcune apparecchiature utilizzate in ecotossicologia (es. camera termostatica 20±1°C) l'incertezza estesa di taratura non deve essere superiore a 1/3 dell'errore massimo ammesso (EMA).

- **Termometri ambientali**

Considerando i range di temperatura per i locali di prova, è opportuno eseguire la taratura su 3 punti ad es. 18°C, 22°C e 27°C.

Si calcola il “coefficiente di determinazione R²” che dovrebbe soddisfare i criteri di accettabilità previsti nella procedura di taratura dei termometri.

La verifica intermedia dei termometri ambientali è fatta al punto intermedio della taratura, affiancando il termometro di riferimento.

- **Data Loggers**

La taratura dei registratori di temperatura in continuo dovrebbe essere effettuata almeno su 3 punti, in un campo che comprenda la temperatura di esercizio dell'apparecchiatura in cui verrà inserito.

Si esegue il calcolo del “coefficiente di determinazione R²” che dovrebbe soddisfare i criteri di accettabilità previsti nella procedura di taratura dei termometri.

La verifica intermedia dei Data Loggers è fatta alla temperatura di esercizio dell'apparecchiatura in cui è inserito, affiancando il termometro di riferimento.

La differenza tra la temperatura reale media della verifica intermedia di taratura in corso e la temperatura reale media della verifica intermedia di taratura precedente in valore assoluto, deve essere uguale o inferiore al valore dello scostamento determinato in fase di taratura.

3.3.3 Taratura e controllo delle bilance

Le bilance dovrebbero essere tarate secondo la Calibration Guide n°18 versione 4.0 (11/2015), per l'incertezza d'uso della bilancia è espressa secondo EURAMET e secondo EA-4-02 Expression of uncertainty of measurement in calibration.

La taratura può essere eseguita da un centro LAT o eseguita internamente mediante l'uso di una pesiera certificata LAT.

La verifica intermedia di taratura si esegue all'uso attraverso una massa non tarata nel campo di misura, adatta all'uso che si fa della bilancia stessa.

3.3.4 Taratura e controllo della intensità luminosa negli apparecchi termostati e nella stanza climatizzata

Il valore di luce è misurato periodicamente con luxmetro tarato nel range di luminosità 50-10000 lux.

3.3.5 Taratura e controllo del sistema di ossigenazione

Il sistema di ossigenazione è controllato con ossimetro gestito con istruzione operativa.

3.3.6 Taratura e controllo del pHmetro

Il pHmetro è controllato con apposita istruzione operativa.

3.4 Reagenti e materiali di laboratorio

Il laboratorio deve possedere procedure per l'acquisto, l'accettazione e la conservazione dei reagenti e dei materiali di consumo del laboratorio che riguardano le prove e le tarature. Deve assicurare che le forniture, dei reagenti e dei materiali di consumo acquistati, che hanno influenza sulla qualità delle prove e/o delle tarature, non siano utilizzati prima di essere verificati come conformi ai requisiti definiti nei metodi di prova e/o alle tarature e deve mantenere le registrazioni di tali controlli di conformità.

In procedura sarebbe opportuno definire inoltre:

- periodo di validità di utilizzo/scadenza dopo l'apertura della confezione originaria o, eventualmente, le modalità con le quali si assicura la verifica del mantenimento delle caratteristiche fino alla data di scadenza definita dal produttore;
- livelli minimi di scorta.

I materiali di laboratorio in uso presso il laboratorio possono essere suddivisi nei seguenti gruppi:

1. reagenti e soluzioni pronte all'uso;
2. vetreria;
3. materiale vario (carta da filtro, materiale a perdere, ecc.);
4. campioni e Materiali di riferimento;
5. soluzioni preparate.

- **Reagenti e soluzioni pronte all'uso**

Il laboratorio deve garantire che tutti i reagenti siano adeguatamente etichettati per indicare l'identità, la concentrazione, le condizioni di conservazione, la data di preparazione, la data di scadenza ed eventuale lotto. La persona responsabile della preparazione deve essere identificabile tramite registrazioni.

La data di scadenza e le informazioni per la conservazione, salvo espresse indicazioni della ditta fornitrice o del metodo analitico per il quale la preparazione è utilizzata, vengono stabilite in procedura/istruzione operativa.

I Reagenti "Tossici e Nocivi", i Corrosivi e gli infiammabili sono conservati in appositi armadi di sicurezza presenti all'interno del laboratorio. Lo stoccaggio, la manipolazione, la conservazione e lo smaltimento dei reagenti devono avvenire nel rispetto delle indicazioni riportate nella scheda di sicurezza dal produttore e delle procedure sulla sicurezza. La scheda di sicurezza dei prodotti pericolosi deve essere conservata in luogo noto ed accessibile a tutti coloro che operano in laboratorio. Presso ogni laboratorio deve essere disponibile il materiale per l'assorbimento e la neutralizzazione di eventuali versamenti, così come indicato nelle schede di sicurezza dei prodotti.

Nelle zone dove sono svolte le attività di Prova (sui banchi di lavoro, sotto cappa, ecc.), le confezioni dei “Reagenti” sono presenti nelle quantità minime necessarie a garantire lo svolgimento delle Prove in corso infatti, dopo il loro utilizzo gli addetti provvedono a riporre i “Reagenti” nel loro luogo di conservazione.

- **Vetreria**

Il materiale di vetreria è rappresentato dalla vetreria tecnica compresa quella di classe A, dagli articoli in vetro di consumo (becker, cristallizzatori, beute, provette, bottiglie, ecc.).

La vetreria di Classe A, utilizzata per la preparazione delle soluzioni standard, viene conservata separata da quella ordinaria, in cassetti o ripiani appositamente identificati del laboratorio; una volta utilizzata e lavata deve essere immediatamente ricollocata al posto assegnatogli per evitare che si possa confondere con la vetreria di categoria inferiore.

- **Lavaggio vetreria contenitori utilizzati per il prelievo e conservazione campioni, allevamento organismi e allestimento dei test con *Daphnia magna***

Tutti i recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorurate o altri materiali chimicamente inerti (recipienti di allevamento, bottiglie, becker, palloni, beute, cilindri, provette, pipette, contenitori per il prelievo e la conservazione dei campioni, ecc...), che vengono a contatto con le soluzioni utilizzate per l'allevamento e l'allestimento dei test ecotossicologici con *Daphnia magna* devono essere lavati separatamente dagli altri materiali di Laboratorio, in modo da assicurare che non ci sia la contaminazione con sostanze tossiche che potrebbero interferire sui saggi. Il lavaggio prevede le seguenti operazioni:

- a. eliminare eventuali scritte con acetone o alcool;
- b. lavare accuratamente in acqua calda con sapone privo di fosforo (oppure lavare senza sapone) in modo da eliminare ogni eventuale residuo;
- c. sottoporre gli oggetti ad un trattamento con acido (es: cloridrico o acetico);
- d. risciacquare;
- e. asciugare all'aria o in stufa a ventilazione forzata regolata alla temperatura di 70 °C per 3 ore.

Per la vetreria che viene a contatto direttamente con le colture algali o con le soluzioni utilizzate per l'allestimento di tali colture, sono previste due fasi aggiuntive:

- f. confezionamento con carta termoresistente o fogli di alluminio, in modo da consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione;
- g. sterilizzazione in autoclave a 121±3°C per 20 min. Siglare i contenitori con la data dell'avvenuta sterilizzazione e utilizzare entro 2 mesi da tale data;
- h. stoccaggio in appositi armadi.

- **Campioni e materiali di riferimento**

Il laboratorio deve disporre di adeguate procedure per la gestione dei Campioni di riferimento (CR), dei Materiali di Riferimento Certificati (CRM) e dei materiali di Riferimento (RM), che includano indicazioni per l'acquisto, la manipolazione in sicurezza, il trasporto, l'immagazzinamento, la taratura e i controlli intermedi ove previsto, l'utilizzo dei campioni e dei materiali di riferimento al fine di prevenirne la contaminazione o il deterioramento e proteggerne l'integrità, nonché l'identificazione del personale responsabile per le specifiche attività.

Devono essere acquistati da fornitori qualificati conservati in armadietti, scaffali e frigoriferi localizzati in zone ben definite del laboratorio di prova gestiti in forma controllata. Il luogo e le modalità di conservazione sono in funzione delle caratteristiche del prodotto, dei suggerimenti delle case produttrici e delle indicazioni dei metodi di prova; in ogni caso CR, CRM o RM devono essere conservati separatamente dagli altri materiali di laboratorio.

Tutti i campioni e materiali di riferimento certificati e non, utilizzati, devono essere identificati univocamente, per garantirne la rintracciabilità.

Al fine di tenere sotto controllo la gestione dei CR, CRM e RM, è opportuno che il laboratorio si doti di elenchi/registri, che contengano almeno le seguenti informazioni: il nome del prodotto, il numero di identificazione, luogo di conservazione, la data di scadenza. Tali registrazioni devono essere mantenuti aggiornati da personale appositamente identificato.

L'utilizzo dei CR, CRM, RM deve essere strettamente limitato al tempo necessario per le operazioni previste.

I certificati, ove presenti, devono essere gestiti come documentazione di origine esterna, devono essere a disposizione del personale tecnico, archiviati e conservati, generalmente per 10 anni, in accordo alla normativa vigente o specifiche richieste del cliente.

Il laboratorio deve disporre di un programma di taratura dei propri campioni di riferimento, che includa anche le verifiche e i controlli intermedi, ove applicabile.

La data di scadenza di un materiale di riferimento, indicata dal produttore, può essere prorogata solo dopo aver eseguito gli opportuni accertamenti analitici che garantiscano e diano evidenza del mantenimento delle proprietà certificate. I dati relativi a tali verifiche devono essere opportunamente registrati, approvati, conservati.

- **Soluzioni preparate all'interno del laboratorio a partire da CRM o RM:**

Tutte le soluzioni sono preparate da personale qualificato secondo le indicazioni riportate su apposite Procedure /Istruzioni Operative o sulle confezioni dei CRM o RM, o sugli stessi metodi di prova di riferimento.

Tali soluzioni devono essere registrate e vengono conservate in armadietti, scaffali o frigoriferi appositi ed identificate da un'etichetta posta sopra il contenitore riportante il nome della soluzione, la concentrazione, la firma del preparatore, la data di preparazione e la data di scadenza;

Ogni analista prima di utilizzare una soluzione deve assicurarsi che non sia scaduta ed in caso contrario, deve prepararne una nuova seguendo le indicazioni definite o testarne la validità prima dell'uso. Appena usata, la soluzione deve essere ricollocata al proprio posto. Le soluzioni "di lavoro", preparate prima dell'uso, vengono gestite tramite apposizione sul contenitore del nome della soluzione, della concentrazione, della data di preparazione e della data di scadenza e della firma del preparatore.

La data di scadenza delle preparazioni a partire da CRM o RM non può essere posteriore a quella dei materiali di partenza.

3.4.1 Gestione dei materiali di laboratorio

L'approvvigionamento dei materiali di laboratorio essere gestito direttamente dal Laboratorio o essere in carico a ditte appaltanti, che sono garanti di tutti i prodotti forniti e dei tempi di consegna degli stessi secondo il capitolato di gara.

Il personale tecnico provvede a verificare la presenza e la scadenza delle scorte e alla compilazione dell'ordine che deve contenere le seguenti informazioni:

- codice numerico;
- descrizione del prodotto;
- fornitore;
- categoria (es: colonne cromatografiche, consumabili per strumentazione, plastica, vetreria, kit microbiologia, ceppi batterici, materiali di riferimento certificati ecc...);
- unità di misura (es: ml, pz, 100 fiale da 5ml, flacone ecc...);
- caratteristiche tecniche del prodotto/prestazioni richieste;
- prezzo prodotto.

Devono esistere procedure e registrazioni per la verifica al ricevimento e per l'utilizzo, per quei prodotti che hanno una scadenza, o richiedono condizioni di conservazione particolari (per esempio, conservazione a bassa temperatura, al buio, ecc.). Nel caso si tratti di materiale la cui conservazione dipende dalla temperatura (trasporto refrigerato) è necessario la verifica/misurazione della temperatura che va registrata su apposito modulo.

All'arrivo del prodotto ordinato, l'addetto effettua un controllo visivo del materiale e il rispetto della corrispondenza all'ordine e per testimoniare la conformità della merce ricevuta (quantità, tipologia, caratteristiche generali, stato e integrità, date di scadenza, presenza certificato di lotto) apporrà una sigla per approvazione della merce ricevuta sul Documento di Trasporto (DDT) o su altro documento di registrazione, che va archiviato.

Tutte le deviazioni rispetto all'ordine o i casi in cui emerga in seguito all'utilizzo del materiale una situazione non conforme ai requisiti richiesti e garantiti dai fornitori vengono registrati come Non Conformità, che sarà risolta, oltre alle opportune misure sulle prove già effettuate e sui rapporti di prova già emessi, con la restituzione del prodotto alla ditta e alla sua sostituzione nel più breve tempo possibile con il prodotto rispondente alle specifiche richieste in fase di ordine.

La ditta appaltante, o direttamente il laboratorio, valuteranno quindi le azioni più opportune da intraprendere con il proprio fornitore per il prodotto non conforme. La sistemazione dei materiali in uso nel reparto analitico tiene conto della loro compatibilità e tipologia e delle necessità di eventuali particolarità di conservazione.

I materiali e i reagenti necessari per l'esecuzione dei saggi secondo i diversi metodi, per la gestione allevamento *Daphnia magna*, sono riportati in **Allegato A** – “Caratteristiche generali e confronto dei metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*”

3.5 Organismi

L'origine degli organismi deve essere dichiarata nella procedura operativa sulla gestione dell'allevamento; deve essere assicurata la tracciabilità della loro origine, deve essere conservata la documentazione che la attesta e gli eventuali certificati che indicano la sensibilità ai tossici di riferimento.

Gli organismi di *Daphnia magna* Straus, da utilizzare per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici, possono essere ottenuti da allevamenti allestiti in laboratorio o dalla schiusa di ephippi (strutture contenenti uova inattive che si formano in seguito a riproduzione sessuata) disponibili in kit commercializzati o da colture di dafnie. Per il loro utilizzo valutare quanto previsto dai singoli metodi (Allegato A – Metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*.)

Gli organismi della specie *Daphnia magna* Straus, forniti da laboratori di idrobiologia o tossicologia acquatica, vengono allevati in recipienti di vetro borosilicato contenenti acqua di allevamento, in quantità tali da avere una densità di organismi adulti non superiore a circa 100 individui/L (è consigliabile mantenere una densità di almeno 1 individuo/20ml di acqua).

Ogni 20 giorni circa, o comunque a secondo delle necessità, alcune dafnie in attiva riproduzione partenogenetica vengono isolate in un recipiente e i neonati utilizzati per avviare un nuovo allevamento. Sui recipienti viene indicata la data di allestimento della coltura. Generalmente vengono mantenuti contemporaneamente almeno due allevamenti sfalsati di alcuni giorni, evitando in tal modo che un qualsiasi inconveniente comporti la perdita dell'organismo e si disponga in modo pressoché continuo dei dafnidi necessari per l'allestimento dei saggi. Gli organismi sono pronti per la produzione di dafnidi da poter utilizzare per l'esecuzione dei saggi di tossicità dopo la terza schiusa, che generalmente avviene entro 15 giorni circa dall'avvio dell'allevamento.

3.5.1 Gestione allevamento organismi di *Daphnia magna*

Ottenuti gli organismi è necessario monitorare l'allevamento, e di seguito vengono fornite le indicazioni sulle principali attività:

- **Idoneità degli organismi**

Si deve controllare che nell'allevamento non si differenzino individui maschi (riconoscibili per il loro dimorfismo sessuale e per la loro taglia più piccola), non si formino ephippi, non venga registrata mortalità e che dopo circa 7-10 giorni si abbia la prima schiusa.

E' opportuno registrare tali osservazioni, insieme alla data di allestimento e di eliminazione della coltura, al volume di acqua di allevamento/numero di individui utilizzati, alla data delle prime tre schiuse, al numero medio complessivo di neonati per femmina alla terza schiusa, al cibo somministrato ed ai cambi settimanali effettuati.

Gli allevamenti con elevata mortalità ($\geq 20\%$), con bassa natalità (numero medio complessivo di neonati per femmina < 20), con presenza di individui maschi ed ephippi, vengono eliminati. Periodicamente con cadenza stabilita, ad esempio bimestrale, deve essere eseguita una verifica delle condizioni generali dell'allevamento mediante un test di controllo con il materiale di riferimento bicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$ (24h EC50).

La soluzione madre di bicromato di potassio utilizzata per allestire l'EC50 è acquistata pronta all'uso o viene preparata. La soluzione è gestita come materiale di riferimento ed è conservata al buio in frigo fino a 12 mesi.

Durante la preparazione della soluzione gli operatori devono seguire nella manipolazione del bicromato tutte le avvertenze e precauzioni riportate nella scheda di sicurezza del prodotto, ai fini della protezione del personale e dell'ambiente. I dati di 24hEC50 per il bicromato di potassio vengono considerati accettabili se risultano compresi nell'intervallo 0,6–2,1 mg/l. Per la valutazione dell'accettabilità si può far riferimento anche a valori soglia definiti mediante una carta di controllo per l'24hEC50 con il bicromato di potassio.

In sostituzione del bicromato, essendo un prodotto cancerogeno, sono proposti composti come il cloruro di potassio, solfato di zinco, utilizzati in occasione di confronti interlaboratorio. I dati e la valutazione di accettabilità vanno registrati e conservati.

- **Acqua di allevamento**

L'acqua di allevamento preparata secondo le indicazioni riportate nell'Allegato A – Metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*, viene aerata per 24 ore prima dell'utilizzo.

Il rinnovo parziale dell'acqua di allevamento degli organismi viene effettuato con una frequenza stabilita, almeno due volte a settimana, analogamente va stabilita anche la frequenza di reintegro dell'acqua, ad esempio giornalmente.

Da sottolineare che il metodo APAT richiede la valutazione dell'idoneità dell'acqua così preparata ai fini dell'allevamento mediante una prova allestita con un gruppo di almeno 10 organismi, di età inferiore alle 24h, mantenuti in 500 ml di acqua ed alle condizioni ambientali previste per l'allevamento. Ogni 48h si provvede al trasferimento in altri 500 ml di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate e alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti. La prova ha una durata di circa 14 giorni corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;
- la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità. I dati ottenuti vanno registrati.

- **Condizioni ambientali**

Gli organismi di *Daphnia magna* sono allevati in condizioni di temperatura, di illuminazione, fotoperiodo e concentrazione di ossigeno controllati (per i valori da rispettare è necessario fare riferimento ai singoli metodi utilizzati).

- **Monitoraggio temperatura e controllo visivo temperatura di esercizio**

Nel caso di utilizzo di frigoriferi per l'allevamento di *Daphnia magna*, per la crescita delle alghe utilizzate per l'alimentazione o per l'esecuzione del test è necessario prevedere la registrazione delle operazioni iniziali di settaggio alla temperatura desiderata (mediante uso del campione di riferimento) e la verifica della omogeneità della temperatura all'interno della camera termostata. Questa deve essere fornita di un sistema di registrazione grafica o di un sistema di registrazione in continuo (data logger, registratori grafici, sonda trasmettitrice) per il controllo della temperatura nelle 24 ore. Tali dispositivi devono essere tarati come descritto nei paragrafi precedenti e scelti di risoluzione idonea allo scopo.

Di seguito si forniscono alcune indicazioni per l'esecuzione del monitoraggio. Si ricorda che è necessario individuare un tecnico preposto al monitoraggio, di competenza adeguata, che registri l'esito del monitoraggio e in caso di anomalie o malfunzionamenti, o evidenza di attività non conforme, esegua le opportune considerazioni tecniche sul problema riscontrato e le decisioni in merito compresa l'eventuale opportunità di segnalare una non conformità.

- **Datalogger**

Per il data logger posizionato all'interno dello strumento è necessaria una procedura di gestione: di seguito si fornisce una breve descrizione delle operazioni di monitoraggio da eseguire da parte del tecnico preposto.

Il tecnico incaricato del controllo visivo della temperatura dell'apparecchio è tenuto a verificare, almeno una volta al giorno, la presenza o meno dell'allarme e a registrare il risultato della verifica. In caso positivo provvederà a scaricare i dati acquisiti. Il grafico e relativo file delle temperature registrate sono valutati per le opportune considerazioni tecniche sul problema riscontrato e le decisioni in merito compresa l'eventuale opportunità di aprire una Non Conformità.

In ogni caso deve essere effettuato uno scarico dei dati del data logger con periodicità mensile. Il grafico e/o i dati su carta vanno conservati. A scopo precauzionale può essere collocato nello strumento un termometro a minima e massima da usare come dispositivo secondario nel caso di rottura del data logger.

Il termometro va azzerato ogni giorno solo dopo aver controllato il normale funzionamento del datalogger e in caso di rottura di quest'ultimo vanno registrate le temperature minima e massima del termometro.

- **Registratore grafico**

Nel caso di apparecchiature dotate del registratore grafico della temperatura il tecnico incaricato del controllo visivo della temperatura dell'apparecchio è tenuto a visionare almeno una volta al giorno il grafico della temperatura, a registrarla su apposito modulo e a verificare che lo scostamento tra la temperatura di utilizzo/esercizio e quella rilevata non sia superiore a quanto previsto.

- **Sonde radio trasmettitori**

Le apparecchiature controllate con sonde trasmettitori, posizionate all'interno dello strumento in contenitori contenenti liquido adatto alla temperatura di esercizio, ad esempio glicerina o paraffina, vengono monitorate mediante un software. Tutti i giorni e almeno una volta al giorno è necessario procedere alla verifica e alla sua registrazione. Nel caso di superamento della temperatura di lavoro per un determinato tempo, il sistema genera un messaggio di allarme, in tal caso è necessario stampare il report per la sua valutazione.

- **Monitoraggio illuminazione e fotoperiodo**

Per il controllo dell'illuminazione prodotto dal sistema di lampade fluorescenti usate per l'allevamento di *Daphnia magna*, si utilizza il luxmetro. I valori del fattore di correzione e dell'incertezza determinati per le diverse luminosità, riportati nel certificato di taratura, vengono utilizzati per valutare, l'accettabilità dei dati di taratura ed esprimere un giudizio sull'idoneità dello strumento. Sullo strumento deve essere apposta un'etichetta con la data di scadenza della taratura.

Per l'esecuzione delle misure si fa riferimento al manuale dello strumento di misura per intensità luminosa.

Il sistema di illuminazione è collegato ad un timer per la regolazione dell'accensione delle lampade in modo da ottenere un fotoperiodo di 16 ± 1 ore di luce ed 8 ± 1 ore di buio.

periodicamente deve essere verificata l'accensione delle lampade all'ora impostata nel timer. Nel caso in cui l'accensione/spengimento delle lampade non avvenga regolarmente, il tecnico addetto controlla che la programmazione del timer corrisponda a quella richiesta per il rispetto del fotoperiodo e, se necessario, procede alla sua riprogrammazione. Nel caso non si è forniti di un luxmetro che registra i dati in continuo, è opportuno eseguire periodicamente il controllo del fotoperiodo. Il controllo puntuale della luminosità di utilizzo per l'allevamento di *Daphnia magna* e per l'allevamento alghe verdi deve essere eseguito con frequenza almeno bimensile.

- **Monitoraggio Ossigeno Disciolto**

L'aria è insufflata mediante un sistema di aerazione fornito di una cartuccia di carbone attivo o filtro da $0,2 \mu\text{m}$, che devono essere sostituiti con frequenza almeno semestrale e di diffusori che devono essere sottoposti periodicamente a pulizia, in modo da garantire la completa rimozione dei depositi di alghe presenti.

Il controllo dell'ossigeno nell'acqua di allevamento deve avvenire settimanalmente e il valore rilevato deve essere registrato.

Per la determinazione della quantità di ossigeno disciolto si utilizza un'apposita sonda per la misura di valori compresi nel range 0,00-19,99 mg/l. Per assicurare che il processo di misurazione eseguito con l'apparecchio sia sotto controllo, prima di ogni determinazione viene effettuata la calibrazione del sistema elettrodico e periodicamente viene eseguita un'operazione di taratura. Conservare i dati registrati e valutarne l'accettabilità.

3.5.2 Alimentazione organismi

Le daphnie vengono alimentate con l'alga verde *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

La somministrazione avviene giornalmente, in quantità tale da garantire nel mezzo di allevamento una densità di circa 300.000 cellule/ml per ciascuno dei due alimenti.

Il permanere di una torbidità e/o colorazione verde del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale può essere rinviata la somministrazione del cibo o ridotte le quantità.

Il venerdì e nei giorni prefestivi si può provvedere alla somministrazione di una quantità dei due alimenti tale da garantire comunque la dose giornaliera (di circa 300.000 cellule/ml) anche per i giorni che non potranno essere alimentate.

E' necessario prevedere la registrazione del mantenimento delle colture algali e delle preparazioni di soluzioni algali e di lievito utilizzate per l'alimentazione.

- **Coltura e preparazione della sospensione algale**

L'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* viene allevata in un mezzo di coltura preparato a partire da 4 soluzioni in acqua bidistillata o MilliQ sterile dei sali di seguito indicati e contraddistinte come:

SOLUZIONE 1

NaNO ₃	25,500 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	12,164 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,410 g/L
H ₃ BO ₃	185,520 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	415,380 mg/L
ZnCl ₂	3,270 mg/L
*CoCl ₂ .6H ₂ O	1,428 mg/L
**CuCl ₂ .2H ₂ O	0,012 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,260 mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	160,000 mg/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	300,000 mg/L

SOLUZIONE 2

MgSO ₄ .7H ₂ O	14,700 g/L
--------------------------------------	------------

SOLUZIONE 3

K ₂ HPO ₄	1,044 g/L
---------------------------------	-----------

SOLUZIONE 4

NaHCO ₃	15,000 g/L
--------------------	------------

*Pesare 142,8 mg e portare a 100ml. Prendere 10ml di tale soluzione concentrata per preparare la SOLUZIONE 1.

**Pesare 120mg e portare a 100ml. Prendere 0,1ml di tale soluzione concentrata per preparare la SOLUZIONE 1.

Le soluzioni filtrate con filtri da 0,45µm sono conservate al buio in frigo a 4±2°C per un tempo massimo di 6 mesi.

Il mezzo di coltura è ottenuto mediante la diluizione di 2 ml di ciascuna delle 4 soluzioni al volume finale di 1 litro di acqua MilliQ sterile. Per allestire la coltura aggiungere al mezzo colturale l'inoculo algale in quantità tale da raggiungere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/ml.

Incubare la coltura algale per 5-6 giorni, alla temperatura di 20±2°C, con una illuminazione di circa 4000 lux e fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, mantenere in agitazione continua insufflando aria filtrata su carbone attivo.

Separare la biomassa algale dal mezzo di coltura mediante centrifugazione (3000 rpm) per 10 minuti mediante provettoni sterili. Scartare il soprannatante e risospendere le alghe nel mezzo di allevamento di durezza ridotta a 30-50 mg CaCO₃/L, ottenuta diluendo 1:10 l'acqua di allevamento con acqua MilliQ sterile.

Eseguire una seconda centrifugazione, raccogliere le alghe e risospenderle nel mezzo usato per il lavaggio in modo da ottenere una densità d'impiego che è di circa 100 milioni di cellule/ml.

La densità cellulare viene determinata mediante conteggio delle alghe al microscopio ottico con la camera di conta.

Per ogni stock di alghe preparate viene eseguito il calcolo del volume di sospensione algale necessario per alimentare la *Daphnia magna* rispettando la densità di 300.000 cell/ml e il volume da utilizzare come inoculo per l'allestimento di una nuova coltura algale. Tali dati sono riportati sull'apposito modulo di registrazione.

Le alghe vengono conservate in provette sterili con tappo a vite al buio in frigo a 4±2°C per un tempo massimo di 30 giorni quelle da utilizzare per le colture algali e di 90 giorni quelle da aggiungere al mezzo acquoso per l'alimentazione di *Daphnia magna*.

- **Preparazione sospensione lievito**

Per la preparazione della sospensione di *Saccharomyces cerevisiae* viene utilizzato il lievito delle confezioni commercializzate per la panificazione sciolto in acqua di durezza di 30-50 mg CaCO₃/l.

La densità di impiego è di circa 100 milioni di cellule/ml.

Dopo aver eseguito il conteggio cellulare al microscopio ottico con la camera di conta, viene eseguito il calcolo del volume di sospensione di lievito necessario per alimentare la *Daphnia magna* rispettando la densità di 300.000 cell/ml. Tali dati sono riportati sull'apposito modulo di registrazione. Il lievito viene conservato al buio in frigo a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ fino a tre mesi e comunque non va conservato oltre la data di scadenza riportata nella confezione commerciale.

4. REQUISITI DI PROCESSO

4.1 Selezione, verifica e validazione del metodo di prova

I requisiti e le prescrizioni ACCREDIA sono indicati al punto 7.2 della norma 17025 e del RT-08.

In generale, il laboratorio deve utilizzare metodi di prova appropriati per tutte le attività del laboratorio e, ove opportuno, per la valutazione dell'incertezza di misura, così come tecniche statistiche dei dati.

I metodi devono essere preferibilmente metodi pubblicati nelle norme internazionali, regionali o nazionali; il laboratorio deve assicurarsi che sia utilizzata l'ultima edizione valida.

Tutti i metodi e la relativa documentazione di supporto devono essere mantenuti aggiornati e prontamente disponibili per personale.

4.1.1 Selezione

Nella scelta del metodo, oltre ai requisiti tecnici, devono essere considerati, anche i requisiti economici; deve essere garantita la disponibilità delle risorse necessarie in termini di apparecchiature, reattivi, materiali di riferimento nonché devono essere valutati i costi e i tempi di esecuzione della prova.

Nel caso del test di tossicità con *Daphnia magna* sono a disposizione diversi metodi ufficiali, la cui scelta viene ad essere guidata dallo scopo della prova stessa. Nell'**Allegato A** sono riassunte e messe a confronto le caratteristiche dei metodi più utilizzati, in corso di validità alla data di pubblicazione:

- UNI EN ISO 6341:2013
- APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003
- Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n. 202 2004

È, comunque, possibile sviluppare un metodo interno, ad esempio attraverso l'integrazione di due o più metodi, seguendo quanto previsto dalla norma per la validazione dei metodi interni.

Il test può essere eseguito anche attraverso l'uso di kit commerciali, che devono essere gestiti come metodi interni a meno che il kit non sia sottoposto, da parte del produttore, ad una validazione da parte di un ente terzo riconosciuto, che ne certifichi l'affidabilità e/o che sia espressamente richiamato in una norma di prova o in un metodo ufficiale.

In particolare i laboratori che utilizzano ephippi, disponibili commercialmente e validati, non devono eseguire una validazione completa in quanto si ritiene valida quella del fabbricante. È necessario, comunque:

- effettuare il test per valutazione della percentuale di immobilizzazione con una soluzione di bicromato di potassio come riportato alla voce "Ripetibilità";
- determinare l'EC50-24 h del bicromato di potassio per ogni lotto di ephippi e verificare che tale valore rientri in carta di controllo appositamente costruita o, nel caso si utilizzi il metodo UNI EN ISO 6341, che sia compreso nell'intervallo 0,6 -2,1 mg/L di bicromato di potassio.

Nel momento in cui ci si decide di accreditare un metodo è importante compilare correttamente la domanda di accreditamento. Nello schema sottostante sono forniti degli esempi riguardo la denominazione della prova, la matrice e il misurando.

Materiale/Prodotto/Matrice	Misurando/Proprietà misurata/Denominazione della prova	Norma/ metodo di prova
Acque	Valutazione della tossicità con <i>Daphnia Magna</i>	APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003
Sostanze chimiche solubili Effluenti industriali o fognari Acqua di scarico Estratti acquosi e lisciviati Acqua dolce (acqua di superficie e di falda) Eluati di sedimenti di acqua dolce Acqua trattenuta interstiziale di sedimenti di acqua dolce	Inibizione della mobilità di <i>Daphnia magna</i> Straus. Prova di tossicità acuta	UNI EN ISO 6341:2013

Il laboratorio può limitare il campo di applicazione di un metodo di prova, mentre l'applicazione a materiali/prodotti/matrici non indicati nel metodo richiede la trasformazione in un metodo di prova interno.

Si raccomanda al momento della richiesta di accreditamento della prova di consultare i Regolamenti ACCREDIA per la compilazione della domanda di accreditamento.

4.1.2 Validazione e verifica delle prestazioni del metodo

Nel caso di un metodo normalizzato o ufficiale il laboratorio può limitarsi ad effettuare una verifica di corretta applicazione del metodo, determinando la ripetibilità e l'accuratezza che è in grado di garantire nella esecuzione; tali parametri, determinati dal laboratorio, rappresenteranno i valori di riferimento con cui confrontarsi nel tempo.

Il laboratorio deve validare i metodi sviluppati al proprio interno, i metodi non normalizzati, i metodi normalizzati e ufficiali che sono utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione, modificati significativamente dal laboratorio o che non riportino i dati di precisione ed accuratezza.

Il laboratorio deve definire i criteri per il riesame periodico della validazione dei metodi (es. risultanze positive da prove valutative, conferme da prove su materiali di riferimento), sia in termini di frequenza che di compatibilità dei risultati ottenuti.

La validazione/ verifica delle prestazioni di un metodo analitico comporta:

- una fase di progettazione iniziale che tenga conto per quanto possibile del campo di applicazione
- l'attività di sviluppo e la registrazione dei risultati di ogni singola fase della validazione
- la valutazione finale comportante una dichiarazione di validità del metodo all'interno del campo di applicazione stabilito

I dati che devono essere raccolti sono i seguenti:

- documento di progettazione
- fogli di lavoro, report strumentali
- bozza della procedura di prova
- eventuali riesami
- risultati ottenuti e loro elaborazione

Alla fine della validazione/verifica delle prestazioni si emette un rapporto finale contenente la dichiarazione di idoneità del metodo.

Il laboratorio deve conservare le registrazioni delle attività di validazione e le relative evidenze.

Nella tabella 2 sottostante sono analizzati i casi in cui applicare la validazione o la verifica delle prestazioni.

Tabella 2

Metodo d'analisi	Validazione	Verifica prestazioni
Metodo ufficiale/normalizzato che riporta parametri di prestazione (anche applicato a matrici assimilabili o al quale siano state apportate modifiche migliorative)	-----	Verifica di corretta applicazione. Verificare che, in condizioni di ripetibilità, le prestazioni del laboratorio siano compatibili con quelle indicate nel metodo. Verificare/determinare l'accuratezza.
Metodo ufficiale/normalizzato senza parametri di prestazione (anche applicato a matrici assimilabili o al quale siano state apportate modifiche migliorative)	-----	Verifica di corretta applicazione. Determinare la precisione/ripetibilità che il laboratorio è in grado di garantire nell'esecuzione della prova. Verificare/determinare l'accuratezza.
Metodo non normalizzato ma validato (ad esempio, AFNOR, AOAC, NORDVAL, ecc.)	-----	Verifica di corretta applicazione. Verificare che in condizioni di ripetibilità, le prestazioni del laboratorio siano compatibili con quelle indicate nel metodo. Verificare/determinare l'accuratezza.
Metodo normalizzato (con o senza parametri di prestazione) applicato a matrici non assimilabili o al quale siano state apportate modifiche sostanziali: è necessaria la trasformazione in metodo interno.	Validazione/caratterizzazione (secondo i requisiti indicati al punto 7.2.2.1. della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025).	-----
Metodo non normalizzato (con o senza parametri di prestazione)		-----

Metodo sviluppato dal laboratorio	Validazione/caratterizzazione (secondo i requisiti indicati al punto 7.2.2.1. della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025).	-----
Metodo descritto in letteratura/riviste/publicazioni (con o senza parametri di prestazione)		-----

4.1.3 Parametri per la validazione

Precisione

La UNI EN ISO 13843 definisce: *“La precisione della misurazione viene solitamente espressa numericamente mediante misure di imprecisione, come deviazione standard, varianza o coefficiente di variazione, in specificate condizioni di misurazione.”*

È espressa tramite lo scarto tipo che descrive la diffusione dei risultati, ottenuti effettuando misurazioni ripetute in circostanze specifiche, su un materiale, in determinate condizioni di lavoro.

A volte può essere espressa come coefficiente di variazione (CV).

La valutazione della precisione del metodo prevede il confronto con i dati di precisione, nel caso siano riportati nelle norme, il calcolo del limite di ripetibilità, da confrontare con quello del metodo adottato se presente, e la verifica nel tempo.

Ripetibilità

Per calcolare il limite di ripetibilità r si effettuano una serie di prove in doppio (almeno da 6 a 15 dati) su materiale di riferimento, in condizioni di ripetibilità ovvero stesso campione, stesso operatore.

In particolare:

- Per la % di immobilizzazione si può utilizzare una soluzione di bicromato di potassio preferibilmente a 2 livelli di concentrazione tali da ottenere valori di immobilizzazione dell'organismo prossimi al 50% e all'80%, ossia i valori limiti individuati dalla normativa per valutare l'accettabilità dello scarico, o in alternativa a una sola concentrazione, prossima al 50% di immobilizzazione.
- Il test dell'EC50 può essere effettuato su campioni reali o, in alternativa, con soluzioni di bicromato di potassio. Valutare se calcolare la ripetibilità a più livelli di tossicità all'interno del campo di applicazione.

Il limite di ripetibilità r si calcola secondo la seguente equazione, dove:

$$r = s_r \times t_{n-1} \times \sqrt{2}$$

- t = variabile di Student, dipendente dal livello di fiducia e dal numero dei gradi di libertà della sperimentazione per il calcolo del limite di ripetibilità
- s_r = scarto tipo di ripetibilità

Verificare la normalità della distribuzione mediante test quali, per esempio, Shapiro-Wilk e successivamente la presenza di eventuali dati anomali mediante appositi test (ad esempio Test di Dixon). Calcolare lo scarto tipo o il coefficiente di variazione e confrontare i dati ottenuti dal laboratorio con i dati di precisione, eventualmente riportati nelle norme (esempio UNI EN ISO 6341 Annex E) mediante il test F di Fischer ed il test t di Student.

Nel caso il metodo non riporti dati di precisione, il laboratorio deve darsi un criterio di accettabilità compatibile con l'utilizzo del metodo.

Stabilito il limite di ripetibilità, le successive prove in doppio devono rispettare la seguente espressione, dove:

$$|x_1 - x_2| \leq r$$

- x_1 e x_2 sono i valori ottenuti
- r è il limite di ripetibilità

Per il calcolo del limite di ripetibilità è utile sviluppare dei fogli di calcolo dove poter elaborare i dati ottenuti.

Nel caso in cui ci siano più operatori abilitati, valutare se:

- solo uno di essi effettua le prove di verifica di corretta applicazione del metodo con calcolo del limite di ripetibilità (determinato in condizioni di ripetibilità stretta), che rappresenterà il valore di riferimento del laboratorio, con il quale gli altri tecnici si confronteranno mediante prova in doppio;

b) tutti gli operatori debbano effettuare le prove di verifica del metodo, eseguendo ciascuno un numero di repliche statisticamente significativo. In tal caso ognuno di essi avrà un proprio valore di ripetibilità, con il quale si confronterà periodicamente mediante prova in doppio. Il limite di ripetibilità del laboratorio potrà essere rappresentato dalla media, previa verifica della omogeneità dei valori di ripetibilità dei diversi operatori.

Riproducibilità

- *Riproducibilità intra-laboratorio o ripetibilità intermedia*

Si intende la ripetibilità intermedia (o riproducibilità intra-laboratorio) e fornisce una stima della variazione dei risultati quando le misure sono effettuate in un unico laboratorio ma in condizioni di routine (diversi analisti, tempi estesi, diverse attrezzature, ecc).

Effettuare una serie di prove in doppio, su materiale di riferimento (almeno da 6 a 15 dati), in condizioni di ripetibilità intermedia. Verificare la normalità della distribuzione mediante test quali, per esempio, Shapiro-Wilk e successivamente la presenza di eventuali dati anomali mediante appositi test (ad esempio Test di Dixon). Calcolare lo scarto tipo o il coefficiente di variazione e confrontare i dati ottenuti dal laboratorio con i dati di precisione, eventualmente riportati nelle norme (es Annex E della UNI 6341) mediante il test F di Fischer ed il test t di Student.

Nel caso il metodo non riporti dati di precisione, il laboratorio deve darsi un criterio di accettabilità compatibile con l'utilizzo del metodo.

- *Riproducibilità inter-laboratorio*

Generalmente viene valutata tramite partecipazione a circuiti interlaboratorio (vedere § 4.4.2).

Accuratezza

Per stimare l'accuratezza è possibile:

- effettuare, con una scadenza prestabilita, prove di EC50- 24h con una sostanza di riferimento quale il bicromato di potassio (o altre più sostenibili per l'ambiente come il cloruro di potassio) e confrontare il risultato con i dati di una carta di controllo appositamente predisposti o con i dati presenti per esempio nella norma UNI 6341 (0,6-2,1mg/L di bicromato di potassio);
- partecipazione a circuiti interlaboratorio.

Robustezza

Ogni volta che si effettua un cambiamento rispetto quanto previsto dal metodo (per esempio il cambio del tipo di acqua utilizzata per l'allevamento) si deve verificare se le performance del laboratorio abbiano subito delle variazioni, effettuando delle prove in doppio o prove su materiali di riferimento.

4.1.4 Circuiti interlaboratorio

La partecipazione ai circuiti interlaboratorio è utile per avere indicazioni sulla riproducibilità del metodo e indicazione sull'accuratezza e la stima dell'incertezza. Il Laboratorio deve, ove possibile, rivolgersi ad organizzatori che operino in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043. Per la politica di partecipazione si rimanda al Regolamento ACCREDIA RT-24.

- Il rapporto di prova rilasciato riporta per ogni risultato trasmesso dai laboratori partecipanti una valutazione di competenza secondo modalità proprie dell'organizzatore del PT, per es. può essere assegnato ad ogni risultato uno z-score o indicatore analogo, che mette in evidenza i risultati critici o anomali. Nel caso si ricorra allo z-score, il risultato è da leggere secondo le indicazioni dell'organizzatore che, in generale prevede:
 - conformi: se lo $|z\ score| \leq 2$
 - dubbi: se lo $|z\ score|$ è compreso tra 2 e 3
 - non conforme: se lo $|z\ score| \geq 3$

4.1.5 Riesame periodico della validazione/verifica delle prestazioni dei metodi

Il laboratorio deve definire i criteri per il riesame periodico della validazione dei metodi e stabilire i casi in cui può rendersi necessaria una nuova validazione (rivalidazione), come ad esempio:

- variazioni alle normative di riferimento che apportino, ad esempio, modifiche ai limiti di legge, alle modalità di espressione di parametri oggetto di prove ecc.
- revisione dei metodi.
- acquisizione e messa in uso di apparecchi di misura differenti.

Nella tabella seguente (tabella 3) vengono suggeriti i possibili parametri da rivalidare in base alle modifiche apportate.

Tabella 3

Modifiche	Parametri
Variazione dell'operatore/analista	Verifica dell'adeguata qualificazione Verifica della ripetibilità Verifica dell'accuratezza
Modifiche alla strumentazione di misura	Precisione
Modifica nella preparazione del campione (diverso solvente, diverso intervallo di concentrazione)	Verifica completa di tutti i parametri di validazione
Estensione del campo di applicazione	Verifica di tutti i parametri di validazione nell'estensione
Utilizzo al di fuori dello scopo e campo di applicazione previsti	Verifica di tutti i parametri di validazione nell'estensione

4.2 Valutazione dell'incertezza

La valutazione dell'incertezza di misura è un elemento fondamentale per la caratterizzazione di un metodo di prova ed un requisito essenziale per il suo accreditamento. Si raccomanda di seguire quanto riportato al 7.6 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08.

Nel caso delle prove ecotossicologiche, l'applicazione di requisiti e prescrizioni deve prendere in considerazione un ulteriore elemento di variabilità costituito dall'impiego di organismi viventi come "sonda" di misura. I metodi presi in considerazione in questo documento non specificano in modo sistematico e dettagliato delle modalità di valutazione dell'incertezza. Di conseguenza diviene importante definire degli orientamenti che possano essere di utilità per il laboratorio. Prima di entrare in una trattazione più dettagliata è opportuno richiamare la definizione di incertezza di misura riportata nella UNI CEI 70098-3:

L'incertezza di misura è un parametro associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.

La definizione richiama l'assunto ben noto delle scienze sperimentali che l'esito di una misurazione non definisce il valore "vero" di una grandezza, ma ne rappresenta soltanto una stima, un'approssimazione. Il risultato si completa quando al valore di misura si accompagna una valutazione dell'incertezza associata alla misura stessa.

Nel caso specifico del saggio con *Daphnia magna*, trattato in questo volume le grandezze misurate e refertate (i "misurandi") sono sostanzialmente due: a) l'Inibizione percentuale, che caratterizza il numero di organismi test immobili dopo esposizione ad un campione, rispetto ad un controllo di organismi non esposti. b) la Concentrazione Efficace a produrre un determinato effetto ECx. Il valore di ECx più diffuso è EC₅₀, ossia la concentrazione di matrice o di agente tossico che provoca un effetto pari al 50% dell'endpoint considerato. Il laboratorio ecotossicologico che esegue test con *Daphnia magna*, ed emette i relativi rapporti di prova deve pertanto adottare una procedura di valutazione dell'incertezza associata alla misura di entrambi i parametri.

Preliminare a qualsiasi approccio alla stima dell'incertezza è la valutazione dei fattori che hanno influenza sull'incertezza stessa.

4.2.1 Valutazione dei fattori influenti sull'incertezza.

La stima dell'incertezza di misura implica che il laboratorio abbia consapevolezza dei molteplici fattori tecnici, ambientali, umani che contribuiscono all'incertezza delle proprie misure, e che tali fattori oltre ad esser noti siano anche ragionevolmente posti sotto controllo. Perciò il primo passo per il laboratorio che intenda stimare l'incertezza sul test con *Daphnia magna*, consisterà nel prendere coscienza dei fattori influenti sul risultato dei test, e della loro importanza relativa. Il passo successivo consisterà nell'elaborare delle procedure di controllo e monitoraggio di tali fattori (discusse in altre sezioni di questo volume), la cui applicazione consenta l'esecuzione del protocollo analitico in condizioni standardizzate.

Sull'importanza di questo elemento la norma 17025, punto 7.6.1, manifesta nuovamente un orientamento molto preciso:

i laboratori devono identificare i contributi all'incertezza di misura. Quando si valuta l'incertezza di misura si deve tener conto di tutti i contributi significativi, compresi quelli derivati dal campionamento, utilizzando appropriati metodi di analisi.

La consolidata esperienza pluridecennale di applicazione del test con *Daphnia magna*, documentata da una estesa letteratura consente di individuare i principali fattori potenzialmente rilevanti per l'incertezza. Essi sono:

1. campionamento
2. conservazione del campione
3. condizioni sperimentali
4. reattivi e loro purezza (ove utilizzati)
5. variabilità biologica degli organismi test
6. variabilità tra operatori

Fattore 1. Campionamento. Qualora il metodo da accreditare non contempli obbligatoriamente anche il campionamento, esso può essere considerato una operazione separata rispetto alla prova di laboratorio. Tale è il caso dei saggi esaminati nel presente manuale. Per gli scopi del presente lavoro si assumerà dunque che il campione sia stato correttamente prelevato in modo indipendente da soggetti terzi rispetto al laboratorio e sia rappresentativo del materiale di partenza. Il laboratorio richiederà l'accreditamento per la sola esecuzione del saggio di tossicità. Il laboratorio dovrà comunque assicurare che:

- il campione giunga in laboratorio in idonee condizioni di trasporto e conservazione di cui il committente prelevatore sarà preventivamente informato;
- il rapporto di prova riporti una dichiarazione che il campionamento è avvenuto a cura di committenti terzi (clienti, servizi di controllo ambientale sul territorio...);
- il rapporto di prova riporti una dichiarazione che il campionamento non è oggetto di accreditamento.

I fattori 2,3,4 sono discussi in altre sezioni di questo documento e ad esse si rimanda. Il laboratorio si doterà di procedure che garantiscano il controllo di tali fattori. Qui è sufficiente sottolineare come la standardizzazione delle variabili sperimentali (conservazione del campione già durante il trasporto al laboratorio, condizioni microclimatiche, fotoperiodi, illuminazione controllata, controllo della conduzione dell'allevamento e dei nutrienti) consentirà di mantenerle entro valori noti ed accettabili, riducendone le oscillazioni. Il mantenimento di condizioni sperimentali standardizzate si traduce anche su un miglior controllo della variabilità biologica. Molto importante è anche l'elaborazione di una procedura per la gestione dei reattivi, che ne definisca i requisiti di accettabilità, le modalità di controllo, la gestione delle scadenze e dei materiali scaduti ecc.

Fattore 5. Variabilità biologica. E' verosimilmente il fattore di variabilità più importante perché determina l'entità e la dispersione delle risposte dei singoli organismi al test. E' riconducibile alla variabilità intrinseca degli organismi utilizzati (allevamenti o kit) cui si sovrappone l'effetto delle oscillazioni nelle condizioni sperimentali e ambientali e della diversa abilità degli operatori. Il suo controllo richiede una rigorosa standardizzazione procedurale dell'allevamento come anche il ricorso a fornitori qualificati e materiali (uova, cisti) adeguatamente certificate.

Fattore 6. Variabilità interoperatore. Si tratta di un altro fattore alquanto importante, soprattutto se si considera che il metodo è interamente manuale. Questo fattore si manifesta nella diversa capacità raggiunta dal personale tecnico addetto nelle operazioni di manipolazione degli organismi, nella conduzione degli allevamenti, nel separare le generazioni di *Daphnia magna*, nel distinguere gli organismi immobili da quelli vitali e così via.

Quando le fonti di variabilità sono note, controllate, verificate e monitorate, si assume che gli effetti sistematici (bias) siano identificati e posti, per quanto possibile, sotto controllo. In tale situazione la metodica fornisce risultati per cui le variazioni nelle misure ripetute si riducono agli effetti casuali ed il metodo è applicato sotto controllo statistico in cui il laboratorio avrà cura di mantenere la prova (ad es. mediante carte di controllo). Gli effetti casuali sono all'origine della variabilità intralaboratorio che può essere stimata come varianza in condizioni di ripetibilità ristretta o intermedia grazie a serie di prove ripetute in situazioni diversificate (in diversi momenti temporali, con differenti operatori o generazioni di *Daphnia magna*, ecc.). Le misure effettuate in condizioni di ripetibilità intermedia possono essere considerate – se ben pianificate – una buona approssimazione delle condizioni di riproducibilità (l'unico fattore invariante è la sede del laboratorio).

4.2.2 Approcci alla valutazione dell'incertezza nella prova di tossicità con *Daphnia magna*

Una volta acquisito il controllo dei fattori concorrenti all'incertezza di misura, il laboratorio avrà cura di elaborare un approccio quanto più rigoroso possibile alla stima quantitativa dell'incertezza. In termini molto generali si può ricordare a questo riguardo come la UNI CEI 70098-3 distingue tra valutazioni di categoria A e valutazioni di categoria B, dove il metodo A richiede l'analisi statistica di una serie di osservazioni, mentre il secondo (B) si accosta alla valutazione dell'incertezza con un approccio non basato su un'analisi statistica di una serie di osservazioni.

La distinzione tra componenti A e componenti B all'incertezza è più marcata e riveste una particolare utilità nelle prove chimiche e fisiche, per le quali è relativamente semplice individuare e separare i diversi contributi all'incertezza, nonché trattarli da un punto di vista statistico. Peraltro nei test ecotossicologici le componenti non sono facilmente separabili e così anche il loro contributo all'incertezza in termini di varianze.

Di queste problematiche la norma 17025 dimostra di avere piena consapevolezza quando afferma al punto 7.6.3 che:

“...quando il metodo di prova precluda una valutazione rigorosa dell'incertezza di misura, deve essere fatta una stima basata sulla conoscenza dei principi teorici o sull'esperienza pratica circa le prestazioni del metodo”.

Nel caso del saggio con *Daphnia magna*, è preferibile un approccio sperimentale olistico (approccio top-down) imperniato su set di misurazioni in condizioni di ripetibilità ristretta, intermedia o di riproducibilità. L'incertezza complessiva non deriverà allora da una valutazione separata delle varianze e loro combinazione mediante propagazione degli errori, ma dalla stima di una varianza complessiva comprendente in sé tutte le componenti. L'approccio sperimentale assume che i singoli contributi non siano necessariamente quantificati, ma lo è la varianza complessiva (olistica) che è rappresentativa dell'insieme di essi.

Tra i contributi di categoria B rientrano attività quali diluizioni e pesate. Pur non giungendo ad una caratterizzazione precisa di tali contributi, il laboratorio avrà cura di verificare che essi non comportino effetti additivi significativi all'incertezza stimata con l'approccio sperimentale. Il laboratorio verificherà che gli errori dovuti ad attività quali le diluizioni nella preparazione dei volumi di test, delle pesate e diluizioni dei tossici di riferimento siano trascurabili rispetto alla variabilità dovuta ai fattori citati precedentemente.

4.2.3 L'incertezza sul parametro EC_{50} (EC_x)

Come è noto e riportato altrove nel presente Manuale, la EC_{50} (*median effective concentration*) rappresenta la concentrazione di campione (ad esempio di acqua reflua) che causa uno specifico effetto (endpoint) sul 50% degli organismi sottoposti a test. EC_x ha il medesimo significato riferito a effetti percentuali differenti; si parlerà dunque di EC_{20} per indicare la concentrazione di campione che determina un effetto tossico sul 20% degli organismi testati e così via.

Quando si saggia la tossicità di composti chimici, anziché di matrici ambientali, si preferisce fare riferimento al parametro ED_{50} (*median effective dose*), che rappresenta la dose (concentrazione di sostanza) che determina un effetto sul 50% degli organismi testati. E' evidente l'analogia di significato tra EC_{50} e ED_{50} . Nell'ambito degli scopi della presente Linea Guida, nel seguito si farà riferimento sempre ad EC_{50} .

Per esprimere l'incertezza associata alla valutazione di EC_{50} è sufficiente ricavare i limiti di confidenza (*confidence intervals*, *CI*, *confidence limits*, o limiti fiduciali) che individuano il corrispondente intervallo di fiducia: essi rappresentano le concentrazioni superiore (CI_{sup}) e inferiore (CI_{inf}) entro le quali il valore “vero” di EC_{50} si situa ad un determinato livello di probabilità (generalmente al 95%).

Il valore di EC_{50} ed i relativi limiti di confidenza sono ricavabili mediante calcolo utilizzando un modello concentrazione-effetto non lineare. Per approfondimenti sui modelli di elaborazione delle curve concentrazione-effetto si rimanda a testi specializzati.

- **Procedimento generale per la stima dell'incertezza su EC_{50}**

L'approccio generale alla determinazione di EC_{50} e della relativa incertezza consiste nei seguenti passaggi:

- Si espongono gli organismi a opportune diluizioni del campione in esame per lo stesso periodo di tempo e si misura l'effetto percentuale ad ogni diluizione (si vedano i protocolli previsti dai singoli metodi). Le concentrazioni saggiate dovranno esser uniformemente distribuite entro l'intervallo di misura (0-100%). Frequentemente si utilizzano diluizioni scalari: 100% (reflugo non diluito), 50%, 25%, 12,5% e così via.
- Terminata la fase sperimentale, il laboratorio procede ad elaborare statisticamente – il set di coppie concentrazione-effetto per ricavarne una curva da cui si ricava il valore di EC_{50} ed i corrispondenti valori di limiti di confidenza. Per i calcoli si utilizzano generalmente software di statistica disponibili in commercio, i quali sono in grado di generare le curve concentrazione-effetto da un set di dati, di determinare EC_{50} (o altri EC_x) e di calcolare gli intervalli di confidenza. Relativamente al test con *Daphnia magna* è ampiamente diffuso il modello di analisi dei probit.

- Verifica dei requisiti di validità e accettabilità del modello di regressione. Si veda il paragrafo successivo.
- Noti i valori di EC₅₀ e CI, il risultato finale sarà riportato nel rapporto di prova, ad esempio, nella forma seguente:

Tabella 4

Parametro Tossicità con <i>Daphnia magna</i> (24 h)	Valore EC ₅₀ (% v/v)	Incertezza CI _{inf.} ÷ CI _{sup.} (% v/v)
Risultato Esempio 1	9,8 %	8,2 ÷ 11,8
Risultato Esempio 2	36,0 %	28,9 ÷ 44,3

La tabella riporta l'esito di test con *Daphnia magna* effettuati con la metodica UNI EN ISO 6341 su due campioni di acque reflue industriali, utilizzando per entrambi 5 diluizioni del campione originario (oltre al un controllo non esposto al campione) ed applicando il modello probit.

Nell'esempio 1 il 50% dell'immobilità si raggiunge ad una diluizione del campione pari al 9,8%, con un intervallo di confidenza pari a 11,8-8,2 = 3,6 %. Nell'esempio 2 il 50% di effetto si raggiunge con un reflu diluito al 36% ed un intervallo di confidenza pari a 44,3 – 28,9 = 15,4 %.

Va sottolineato che gli intervalli di fiducia così calcolati sono relativi al set di dati sotto indagine, cioè alla curva di risposta dell'organismo esposto a diluizioni di uno specifico campione, pertanto essi si riferiscono soltanto al campione in esame e non possono essere generalizzati ad altri campioni. Per inciso, i limiti di confidenza al 95% indicano anche che vi è una probabilità residua del 5% che il valore "vero" si trovi al di fuori di tale intervallo.

Considerando che la curva concentrazione-effetto è una curva di interpolazione di dati sperimentali, l'estrapolazione di risultati al di fuori del *range* di concentrazioni indagate va evitata.

Si noti che gli intervalli di confidenza risultano in genere non simmetrici rispetto al valore di EC₅₀. Questa è una caratteristica legata al comportamento della curva concentrazione-effetto ed al modello di analisi utilizzato.

Per la sua precisione, l'elaborazione di una curva concentrazione-effetto (o dose-risposta, nel caso di saggio di effetti di composti chimici) per mezzo di un software è il sistema più diffuso. Tuttavia è anche possibile (vedi Metodo APAT CNR IRSA 8020 e Metodo OECD 202) far ricorso a metodi grafici manuali.

• Verifica dei requisiti di applicabilità del modello di regressione

Per poter applicare l'analisi dei probit è richiesto che siano soddisfatti i seguenti criteri di accettabilità (generalmente sono effettuati automaticamente dai software):

- vi sia una numerosità di diluizioni sufficiente (ad Es. ISO 6341 propone almeno tre diluizioni tra il 10% ed il 90%);
- sia verificata la condizione di normalità della distribuzione dei dati sperimentali (ad es. mediante test Shapiro-Wilk);
- sia superato un test di valutazione della "fitness" del *dataset* sperimentale con la curva concentrazione-effetto, generalmente eseguito mediante test χ^2 .

Per quest'ultimo test la condizione da soddisfare è che il χ^2 calcolato dai dati sperimentali risulti inferiore ad un valore critico tabulato ad un livello di probabilità α per v gradi di libertà

$$\chi_{sperimentale}^2 \leq \chi_{\alpha, v}^2 \quad (1)$$

con:

$$\chi_{sperimentale}^2 = \sum_i^k \frac{(f_i - np_i)^2}{np_i} \quad (2)$$

dove:

k : è il numero di diluizioni effettuate

n : numero di organismi esposti per singolo test (ad es. $n=20$)

f_i : il numero di daphnie immobili per ciascuna diluizione

p_i : la frazione nominale di daphnie immobili ricavata dalla curva alla diluizione i

v : gradi di libertà del sistema pari a $k-2$

α : livello di probabilità del test (generalmente $\alpha=0,95$)

Qualora i requisiti generali di accettabilità non siano verificati, il laboratorio potrà valutare di adottare metodi alternativi di valutazione della EC₅₀ e dei relativi intervalli di fiducia. In generale possono presentarsi i seguenti casi:

- requisito della numerosità non soddisfatto. Si può fare ricorso a metodi grafici come il metodo Litchfield e Wilcoxon, al metodo della media geometrica (APAT CNR IRSA 8020) oppure al metodo Spearman-Kärber applicabile in presenza di effetti al 100%, 0% ed una sola diluizione parziale;
- requisito della normalità non soddisfatto. In tal caso è preferibile adottare il modello di regressione logistica (logit);
- test χ^2 non superato: è necessario verificare l'affidabilità dei dati sperimentali.

• **Indicazioni operative per l'accreditamento**

Premesso quanto sviluppato nei paragrafi precedenti, il laboratorio che intenda accreditare il saggio con *Daphnia magna* dovrà curare in particolare gli aspetti, vedi elenco a seguire, legati alla determinazione dell'EC₅₀ e alla relativa incertezza.

- Gestire i dati e le informazioni, secondo quanto previsto dalla norma 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08.
- Qualora il laboratorio intenda dotarsi di un programma di calcolo autorealizzato (es. foglio elettronico) esso dovrà essere sottoposto a validazione, adeguatamente protetto da utilizzi impropri che ne possano involontariamente modificare gli algoritmi e quindi condizionare l'esattezza degli output. I fogli elettronici di calcolo dovranno anche essere sottoposti a verifiche periodiche che ne garantiscano il funzionamento nel tempo. Inoltre occorrerà tenere traccia degli aggiornamenti del foglio di calcolo stesso e fornire agli operatori sempre l'ultima versione valida.
- I software devono essere dotati di istruzioni d'uso adeguate rese disponibili al personale che le utilizza.
- Definire quale modello di curva concentrazione -effetto intende applicare per il calcolo di EC₅₀ e degli intervalli fiduciali.
- Definire i criteri di accettabilità per gli intervalli di confidenza. Ciò in quanto i modelli sono in grado di restituire valori di EC₅₀ e intervalli di confidenza anche in presenza di set di dati scadenti (carenza di dati o dati molto dispersi).
- Definire i criteri di azione in caso di anomalie o di inapplicabilità del modello di regressione scelto. Definire le eventuali casistiche in cui far ricorso metodi semplificati grafici come il metodo Litchfield – Wilcoxon o il metodo della media geometrica, riportati entrambi nel Metodo 8020 del Manuale 29/2003 (Appendice 2) cui si rimanda per i dettagli. Queste tecniche di elaborazione forniscono indubbiamente risultati meno precisi rispetto ai programmi statistici.
- Definire dei criteri di abilitazione e di mantenimento delle qualifiche per il personale addetto.
- Specialmente se si adottano soluzioni informatizzate, l'operatore non deve necessariamente essere a conoscenza di tutti gli algoritmi di calcolo, tuttavia alcuni principi base della regressione non lineare dovrebbero essere noti. Pertanto il laboratorio dovrà assicurare che il personale abbia ricevuto adeguata formazione e sia competente:
 - ad utilizzare correttamente il programma di calcolo e/o i metodi manuali.
 - a valutare criticamente le curve sperimentali di concentrazione-effetto ed i dati di output (ECx e CIx).
- Predisporre un modello per il rapporto di prova che consenta di indicare quanto richiesto dalla norma e dal Regolamento ACCREDIA RT-08, ed eventuali informazioni complementari quali ad esempio:
 - l'indicazione del modello statistico di curva concentrazione-effetto utilizzato (es. probit o logit);
 - il livello di affidabilità cui si riferiscono gli intervalli di confidenza riportati espresso come percentuale (generalmente il 95%) o come valore p (generalmente p= 0,05);
 - se è stato utilizzato un metodo grafico o manuale: tale circostanza sarà preferibilmente riportata come nota al rapporto di prova.

4.2.4 Valutazione dell'incertezza sull'inibizione percentuale ai fini dell'accettabilità di un effluente.

Il test è finalizzato a misurare l'inibizione percentuale cumulativa mediante esposizione degli organismi al campione non diluito per 24 o 48 h. Il parametro che si misura è l'Inibizione percentuale espressa da:

$$I \% = (\text{numero organismi immobili} / \text{numero organismi saggiati}) * 100$$

Il saggio di tossicità effettuato in questa forma semplificata ma non meno rigorosa è utilizzato dai laboratori come saggio preliminare per stabilire se sia necessario procedere con la più impegnativa ed onerosa misura di EC₅₀. Esso rappresenta uno *screening* che ha i pregi della rapidità, semplicità di esecuzione, limitato sacrificio di organismi preziosi, ma che non può essere analiticamente meno rigoroso del saggio EC₅₀. È importante sottolineare come per le acque reflue il confronto con il limite normativo ed il relativo giudizio di conformità si concretizzino proprio a questo stadio dell'analisi ecotossicologica mentre EC₅₀ ne rappresenta un complemento di informazioni.

Sulla scorta di queste considerazioni appare evidente che l'accertamento dell'avvenuto superamento del limite normativo implica che il laboratorio sia in grado di applicare al risultato un'incertezza di misura. Per sottolineare ancora l'importanza dell'incertezza in questo contesto si considerino due semplici situazioni esemplificative, vedi tabella 5: due acque reflue sottoposte al test con *Daphnia magna* restituiscono i seguenti risultati cumulativi

Tabella 5

	Organismi esposti	Organismi immobili	Inibizione %
Acqua reflua A	30	17	57%
Acqua reflua B	30	12	40%

Nel caso A si potrebbe dedurre di essere in presenza di un superamento del limite, ma in assenza di una stima dell'incertezza non si è in grado di stabilire la probabilità statistica del superamento e si rischia di dichiarare non conforme un campione che invece potrebbe esserlo. Il caso B induce a ritenere il campione conforme, ma senza una stima dell'incertezza non è possibile conoscere la probabilità che il risultato sia significativamente inferiore al valore limite, pertanto si corre il rischio di sottostimare una situazione critica e di dichiarare conforme un campione che invece non lo è. Nel primo caso si commetterebbe quello che in statistica è chiamato errore di tipo I, nel secondo si commetterebbe un errore di tipo II.

Come accennato in precedenza, una valutazione metrologica rigorosa di tutte le componenti dell'incertezza secondo i requisiti della UNI CEI 70098-3 non è praticabile nel caso dei test ecotossicologici. In alternativa possiamo individuare due approcci al calcolo dell'incertezza per le misure di inibizione percentuale:

- a) metodi basati sulla distribuzione binomiale
- b) metodi basati sulla stima di uno scarto tipo sperimentale

- **Metodo basato sulla distribuzione binomiale**

Come è noto la risposta degli organismi al test con *Daphnia magna* è di tipo *quantale*. I dati quantali sono definiti dalla ISO/TS 20281): *dati generati quando si registra una particolare proprietà presente od assente in ciascun individuo*.

Un test quantale restituisce un risultato del tipo si/no, mobile/immobile, presente/assente. Un singolo saggio con *Daphnia magna* costituisce un test quantale ripetuto n volte (n è il numero degli organismi esposti). Il risultato del saggio è esprimibile con il rapporto f (che non è altro che il rapporto di inibizione):

$$f = \text{n. totale immobili} / \text{n. totale organismi esposti} = m / n \quad (3)$$

I risultati di saggi di questo tipo possono essere elaborati statisticamente utilizzando la distribuzione binomiale. Di conseguenza la stima dell'incertezza si riconduce alla stima di intervalli di confidenza associati ad una distribuzione binomiale. Il calcolo degli intervalli di confidenza si baserà sull'assunto che il numero di immobili rilevato sia riconducibile ad una distribuzione binomiale di numerosità n e probabilità p e che tale probabilità sia rappresentata dalla proporzione f che esita dal saggio.

Perciò l'approccio binomiale per la stima dei CI di un saggio seguirà i seguenti passaggi:

A) *Verifica della sussistenza della condizione di binomialità dei dati sperimentali*

La binomialità della distribuzione implica che le cause che determinano la immobilità nel test quantale agiscano in modo indipendente su ciascun organismo e ciascuno risponda ai soli effetti di tossicità del campione. Diversamente, cioè se sugli organismi sottoposti al test agiscono fattori che influiscono in modo non indipendente sulla mortalità (es. fattori legati al controllo delle condizioni ambientali, alla

buona/cattiva salute dell'allevamento ecc.) può accadere che la distribuzione delle mortalità non segua una distribuzione binomiale, di conseguenza non sarà possibile stimare l'incertezza secondo la binomiale.

Questa verifica può essere effettuata

- ad ogni singolo saggio mediante un test χ^2 che viene eseguito ad esempio sfruttando la suddivisione – prevista dai metodi – del test in più sottoaliquote (APAT IRSA divide le 30 dafnie in tre beaker, mentre ISO e OECD dividono le 20 dafnie in 4).
- In fase di validazione o comunque in presenza di repliche mediante confronto statistico tra lo scarto tipo di prove ripetute s con lo scarto tipo teorico binomiale s_b . Dato un set di prove ripetute ciascuna di numerosità n , lo scarto tipo teorico binomiale è dato da:

$$s_b = \sqrt{\bar{m} \left(1 - \frac{\bar{m}}{n}\right)} \quad (4)$$

Dove:

n : numero di organismi esposti per singolo test

\bar{m} : media degli organismi immobili

Con questo test (una variante del F -test) si verifica il rapporto s/s_b al 95% di probabilità per $n-1$ gradi di libertà. Deve essere verificata la condizione:

$$V. \text{ minimo} \leq \frac{s}{s_b} \leq V. \text{ massimo} \quad (5)$$

I valori di accettabilità per $n-1$ gradi di libertà ed $\alpha = 0.95$ sono indicati nella tabella 6 che segue:

Tabella 6

Gradi di libertà	Valore minimo	Valore massimo
1	0,0316	2,241
2	0,16	1,921
3	0,268	1,765
4	0,348	1,669
5	0,408	1,662
6	0,454	1,551
7	0,491	1,512
8	0,522	1,48
9	0,548	1,454
10	0,57	1,431
11	0,589	1,412
12	0,606	1,395
15	0,646	1,354
20	0,692	1,307
25	0,724	1,275
30	0,748	1,251

Se tale condizione è verificata il valore di s non si discosta significativamente da s_b e possiamo assumere la binomialità dei dati. Se il test non è verificato i dati sperimentali non seguono la distribuzione binomiale.

Esempio:

si consideri, vedi tabella 7, un saggio con 20 daphnie suddivise in 4 contenitori da 5, esposte ad un refluo che fornisce i seguenti risultati:

Tabella 7

Id. Contenitore	Organismi esposti	Numero immobili <i>m</i>	Frazione immobili <i>f</i>	Calcoli	
1	5	3	0,6	Scarto tipo immobili <i>s</i>	0,816
2	5	4	0,8	Media immobili \bar{m}	3
3	5	2	0,4	Media frazione immobili \bar{f}	0,60
4	5	3	0,6		

Lo scarto tipo teorico binomiale è dato da:

$$s_b = \sqrt{\bar{m} \left(1 - \frac{\bar{m}}{n}\right)} = \sqrt{3 \left(1 - \frac{3}{5}\right)} = 1.095$$

Ed il test di confronto fra scarti tipo restituisce: $\frac{0.816}{1.095} = 0,745$

Il risultato è positivo per $n-1 = 4$ gradi di libertà, per cui si può procedere con il calcolo dei CI.

B) Calcolo dei CI ad un definito livello di probabilità mediante opportuni algoritmi di calcolo

Una volta verificato che i risultati di misura sono compatibili con una distribuzione binomiale, per il calcolo degli intervalli di fiducia si fa ricorso ad algoritmi di calcolo disponibili su software commerciali o reperibili nella letteratura scientifica. Per esempio in Excel® 2010 la formula del limite di confidenza per un numero di *m* immobili su *n* esposti è data da =INV.BETA.N(P;1+m;1+n-m), dove P=0.025 per il limite inferiore e 0.975 per quello superiore, al 95% di confidenza. La tabella 8 riporta i valori di intervalli di confidenza al 95% per una serie di valori di inibizione percentuale cumulativa. Naturalmente la tabella è valida soltanto per un numero di organismi esposti indicato, pari a 30 (analoghe tabelle si ricavano per saggi con diverso numero di esposti):

Tabella 8

Organismi immobili (su 30 esposti)	Inibizione %	Incertezza CIinf. (%)	Incertezza CIsup. (%)
0	0%	0%	11%
1	3%	1%	17%
2	7%	2%	21%
3	10%	4%	26%
4	13%	5%	30%
5	17%	7%	34%
6	20%	10%	37%
7	23%	12%	41%
8	27%	14%	45%
9	30%	17%	48%
10	33%	19%	51%
11	37%	22%	55%
12	40%	25%	58%
13	43%	27%	61%
14	47%	30%	64%
15	50%	33%	67%
16	53%	36%	70%
17	57%	39%	73%
18	60%	42%	75%

19	63%	45%	78%
20	67%	49%	81%
21	70%	52%	83%
22	73%	55%	86%
23	77%	59%	88%
24	80%	63%	90%
25	83%	66%	93%
26	87%	70%	95%
27	90%	74%	96%
28	93%	79%	98%
29	97%	83%	99%
30	100%	89%	100%

Oltre ai metodi di calcolo disponibili su software ne esistono vari altri, descritti nella letteratura specializzata¹, cui il lettore interessato può far riferimento per eventuali approfondimenti.

In definitiva l'approccio basato sulla funzione binomiale presenta i seguenti vantaggi e svantaggi:

Vantaggi	Svantaggi
Relativa semplicità di applicazione e calcolo	Restituisce intervalli di confidenza molto ampi, che implicano probabilità significative di errori di tipo II (dichiarare erroneamente la conformità del campione)
Applicazione al singolo saggio	Va verificata la condizione di binomialità dei dati sperimentali

- **Metodi basati sullo scarto tipo sperimentale**

I metodi di stima visti in precedenza restituiscono intervalli di confidenza sulla base di un numero limitato di dati sperimentali, quelli che derivano da un singolo saggio di tossicità con un numero n di daphnie esposte. Gli intervalli sono ricavati da un calcolo teorico e, a parità di risultato e di numero di organismi esposti, sono i medesimi in ogni laboratorio. Un approccio alternativo alla stima dell'incertezza U prende in considerazione i risultati ottenuti da uno specifico laboratorio in condizioni di ripetibilità (ristretta o intermedia). Nel caso di una misurazione ben caratterizzata e sotto controllo statistico è possibile, utilizzando risultati di prove multiple determinare uno scarto tipo sperimentale s_p di riferimento che possa essere ragionevolmente assimilato ad uno scarto tipo di riproducibilità. In tal caso l'incertezza estesa del laboratorio U sarà legata a s_p dalla relazione:

$$U = z_{1-\alpha/2} \cdot \sigma_R \cong t_{(\nu,p)} \cdot s_p \quad (6)$$

Dove $z_{1-\alpha/2}$ è il valore della variabile normale z al livello di confidenza p (pari a 1,96 al 5%); t è il valore della variabile di Student per ν gradi di libertà ad un livello di probabilità p ; σ_R riproducibilità. Condizione fondamentale per l'applicabilità di questo metodo è la disponibilità di un numero adeguato di risultati sperimentali distribuiti su più set di prove replicate. Lo scarto tipo su un singolo set di repliche non è generalizzabile ed è di scarso valore ai fini della stima di s_p , ma un insieme numericamente significativo di set di repliche permette una valutazione attendibile dello scarto tipo di riferimento che può essere generalizzata ad esprimere l'incertezza del laboratorio. Schematizzando, è possibile individuare due situazioni estreme tra le quali operare: A) il laboratorio dispone di set di prove eseguite in numero limitato in condizioni di ripetibilità ristretta (numero di prove inferiori a 30) e B) il laboratorio dispone di un dataset costituito da un gran numero di replicati (superiore a 30) acquisito nel tempo in condizioni di ripetibilità intermedia.

¹ Ad esempio i metodi di Wilson (con o senza correzione di continuità), di Jeffreys, di Agresti-Coull ecc.

Procedimento A

Si considerano i risultati di prove ripetute realizzate in condizioni di ripetibilità ristretta (ad es. 6 prove a 3 concentrazioni di refluo o di tossico di riferimento), scelte in modo da comprendere o essere rappresentative (corrispondenti a diversi livelli di inibizione e che ci siano quelli vicini ai limiti normativi del 50 e 80%), con le quali si costruisce una tabella sul formato della seguente:

Tabella 9

Identificativo analisi	Replica 1	Replica 2	...Replica n	Scarto tipo	Varianza
1	I_{11}	I_{12}	I_{1n}	s_1	s^2_1
2	I_{21}	I_{22}	I_{2n}	s_2	s^2_2
k	I_{k1}	I_{k2}	I_{kn}	s_k	s^2_k

Ciascuna riga riporta i dati di un set di n prove ripetute con la corrispondente varianza s^2_k

Si ottiene una serie $s^2_1, s^2_2, s^2_3, \dots, s^2_k$ di varianze ed i relativi scarti tipo.

A ciascun set si applicano i controlli di verifica della normalità dei dati (ad es. il test Shapiro-Wilk), della presenza di *outliers* (es. test di Dixon), della omogeneità delle varianze mediante test F . Dovrà essere soddisfatta la condizione:

$$F = \frac{s^2_{sup}}{s^2_{inf}} \leq F_{vs, vi, p} \quad (7)$$

Ove $F_{vs, vi, p}$ è il valore della variabile F di Fischer al valore p (generalmente 95%) di probabilità per v gradi di libertà rispettivamente della varianza superiore e inferiore;

s^2_{sup} e s^2_{inf} sono rispettivamente la varianza più elevata e quella più bassa di tutto il dataset.

In presenza di esiti negativi dovranno essere esclusi i dati anomali.

Una volta selezionati i dati che soddisfano i controlli di validità si procederà al calcolo dello scarto tipo pool così definito:

$$s_{pool} = \sqrt{\left[\frac{(n_1 - 1)s^2_1 + (n_2 - 1)s^2_2 + \dots + (n_k - 1)s^2_k}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_k - 1)} \right]} \quad (8)$$

- k : è il numero di prove ripetute considerate nel data set
- $n_1 \dots n_k$: è il numero di prove ripetute per ciascun elemento del set;
- $s^2_1 \dots s^2_k$ sono le k varianze
- s_{pool} è lo scarto tipo pool
- il denominatore sotto radice fornisce i gradi di libertà $v = \sum_1^k n_k - k$

Una volta noto lo scarto tipo pool l'incertezza su un singolo test di inibizione è data da:

$$U = t_{v, p} \cdot s_{pool} \quad (9)$$

Ove $t_{v, p}$ è il valore della variabile t di Student per v gradi di libertà ed una probabilità pari a p (ad es. $p = 0,95$).

Questo approccio assume che i singoli dati sperimentali (binomiali) possano essere descritti nel loro insieme con una distribuzione t . Il laboratorio dovrà essere consapevole di questa limitazione, tanto più rilevante quanto più il numero di dati sperimentali utilizzato è ridotto. Particolare attenzione va quindi data alla numerosità dei set ed alla verifica delle condizioni di adottabilità del modello.

Procedimento B: metodo dei doppietti

Si considerano i risultati di prove duplicate effettuate in condizioni di ripetibilità intermedia. E' possibile attingere a dati storici recenti. Le matrici considerate dovrebbero essere rappresentative dell'attività del laboratorio. E' anche possibile allestire dei set di repliche differenziati per matrice ove ciò risulti di significato per il laboratorio stesso. Ad es. un laboratorio potrebbe distinguere tra acque reflue di depurazione e acque industriali. E' comunque importante che il numero di repliche sia elevato (più elevato è e più robusta sarà la stima della varianza di pool): come punto di partenza si possono considerare almeno 30 set di valori.

I dati dovrebbero essere rappresentativi di un intervallo di tempo significativo per l'attività del laboratorio. Per un laboratorio che effettua routinariamente (giornalmente) test con *Daphnia magna* il periodo da considerare sarà indicativamente dell'ordine dei mesi. Le analisi devono essere effettuate da operatori diversi ove possibile, meglio se da tutti gli operatori abilitati al saggio.

In linea di principio il dataset può essere scelto in base a specifici requisiti o esigenze analitiche del laboratorio: un laboratorio che processa normalmente acque reflue di diversa tipologia potrà allestire dei dataset specifici per tipologia di scarico (distinguendo ad esempio acque reflue di depurazione reflui urbani da acque industriali). Possono essere allestiti diversi dataset in corrispondenza di range di inibizione definiti (ad esempio 30-50%; 50-70%; 80-100%) giungendo così a stimare incertezze corrispondenti a diversi livelli di inibizione. Il range di effetto inibitorio percentuale da esplorare dovrebbe essere significativo rispetto al limite normativo. Per un limite del 50% sarebbe preferibile esplorare un intervallo tra il 30% e l'80% di inibizione.

Il principale punto di forza di questo approccio sta nell'elevato numero di dati presi in considerazione, che permette di applicare le proprietà della distribuzione t ad un insieme di risultati binomiali.

Esempio di applicazione del metodo

Quale esempio di applicazione si consideri il set di 50 doppietti della tabella 10, acquisiti in tempi e condizioni sperimentali diverse.

Tabella 10

Id prova	Replica 1 (I%)	Replica 2 (I%)	Scarto tipo s	Varianza s^2	Id prova	Replica 1 (I%)	Replica 2 (I%)	Scarto tipo s	Varianza s^2
1	60	50	7,0711	50,00	26	45	35	7,0711	50,00
2	65	60	3,5355	12,50	27	75	100	17,6777	312,50
3	90	100	7,0711	50,00	28	90	70	14,1421	200,00
4	95	90	3,5355	12,50	29	20	25	3,5355	12,50
5	50	65	10,6066	112,50	30	90	90	0,0000	0,00
6	50	55	3,5355	12,50	31	45	55	7,0711	50,00
7	85	90	3,5355	12,50	32	85	90	3,5355	12,50
8	85	95	7,0711	50,00	33	45	45	0,0000	0,00
9	30	50	14,1421	200,00	34	90	100	7,0711	50,00
10	35	35	0,0000	0,00	35	30	25	3,5355	12,50
11	70	75	3,5355	12,50	36	35	40	3,5355	12,50
12	75	80	3,5355	12,50	37	30	20	7,0711	50,00
13	40	50	7,0711	50,00	38	95	85	7,0711	50,00
14	40	50	7,0711	50,00	39	60	60	0,0000	0,00
15	100	95	3,5355	12,50	40	100	90	7,0711	50,00
16	95	95	0,0000	0,00	41	60	65	3,5355	12,50
17	55	55	0,0000	0,00	42	90	85	3,5355	12,50
18	50	60	7,0711	50,00	43	45	45	0,0000	0,00
19	90	90	0,0000	0,00	44	75	70	3,5355	12,50
20	95	85	7,0711	50,00	45	45	45	0,0000	0,00
21	45	40	3,5355	12,50	46	100	95	3,5355	12,50
22	50	60	7,0711	50,00	47	55	35	14,1421	200,00
23	65	80	10,6066	112,50	48	50	40	7,0711	50,00
24	70	85	10,6066	112,50	49	90	80	7,0711	50,00
25	25	30	3,5355	12,50	50	80	75	3,5355	12,50

Per determinare lo scarto tipo pool del set si effettua un test F secondo la formula (7). Poiché si considerano prove in doppio i gradi di libertà superiore ed inferiore sono pari a $v_{sup} = v_{inf} = 1$ ed il corrispondente valore di $F_{vs, vi, p}$ al 95% di probabilità ($p=0,05$) è pari a 161,4

E' necessario escludere i valori di varianza pari a 0, in quanto essi rendono il test inapplicabile: per $s_{inf}^2 = 0$ infatti $F \rightarrow \infty \gg \gg F_{vs, vi, p}$.

Dei 50 valori iniziali ne rimangono 41 sui quali si procede al test F :

$$F = \frac{s_{sup}^2}{s_{inf}^2} = \frac{312,50}{12,50} = 25 < F_{vs, vi, p} = 161,4$$

a) Infine si determina lo scarto tipo pool applicando l'equazione (8):

$$s_{pool} = \sqrt{\left[\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_k - 1)} \right]} = \sqrt{\frac{\sum_1^{41} s_k^2}{\sum_1^{41} n_k - 41}} = 7,449$$

Di conseguenza l'incertezza U su una prova di Inibizione % è rappresentata da:

$$U = t_{v,p} \cdot s_{pool} = 2,021 \cdot 7,449 = 15,05 \%$$

Ove $t_{v,p} = 2,021$ per 41 gradi di libertà al 95% di probabilità.

Infine, questo approccio consente anche di stimare il limite di ripetibilità pool $r_{(pool)}$ che sarà in generale dato da:

$$r_{(pool)} = t_{v,p} \cdot s_{pool} \cdot \sqrt{2} \quad (10)$$

E nel caso dell'esempio specifico:

$$r_{(pool)} = t_{v,p} \cdot s_{pool} \cdot \sqrt{2} = 15,05 \cdot \sqrt{2} = 21,28\%$$

In definitiva il metodo B presenta i seguenti:

Vantaggi	Svantaggi
Restituisce una stima della ripetibilità intermedia del laboratorio.	
Si basa su un dataset costituito da una gran numero di dati rappresentativi, che rappresentano le reali performances del laboratorio	Richiede un ampio set di dati (almeno 30) di prove ripetute
Genera intervalli di confidenza più ristretti migliorando l'affidabilità dei risultati	Assume la normalità dei dati, E' un approccio meno rigoroso di quello basato sulla distribuzione binomiale (tabella 4.5.4) ma sicuramente più robusto.
Utilizza la distribuzione t ed i relativi calcoli	Si limita a intervalli (omoschedastici), non a tutto il campo 0-100%
Non richiede necessariamente l'esecuzione di prove di ripetibilità <i>ad hoc</i> , ma può anche far uso di dati storici acquisiti nell'attività ordinaria del laboratorio	Almeno nella fase iniziale (esecuzione prove ripetute, scelta del dataset, elaborazioni ...) è molto impegnativo

• Indicazioni operative per l'accreditamento

Il laboratorio che intenda accreditare il saggio con *Daphnia magna* curerà in particolar modo i seguenti aspetti legati alla determinazione dell'inibizione percentuale e alla relativa incertezza:

- 1) Stabilire quale metodo alla stima dell'incertezza intende adottare;
- 2) Definire delle procedure applicative per l'approccio scelto;
- 3) Stabilire dei criteri di comportamento da adottare nei casi 'border line' o in caso di anomalie e non conformità;
- 4) Il rapporto di prova indicherà, oltre ai risultati numerici comprensivi dell'incertezza, anche le seguenti informazioni complementari (si veda anche il § 4.5.3.3),
 - il metodo di calcolo dell'incertezza su I% adottato,
 - il livello di affidabilità cui si riferiscono gli intervalli di confidenza riportati (generalmente il 95%),
 - ove pertinenti, il valore di t ed i relativi gradi di libertà.
- 5) L'impiego di software commerciali dedicati e/o autorealizzati (foglio elettronico) è soggetto agli stessi requisiti discussi al § 3.4.3.3.

- **Contributi di tipo B all'incertezza**

Si tratta di contributi dovuti a operazioni quali pesate e diluizioni, per i quali si assume una distribuzione rettangolare, ovvero che l'incertezza sia rappresentabile da un intervallo al di fuori del quale si esclude possa trovarsi il valore del misurando, mentre all'interno di esso tutti i valori hanno la stessa probabilità di rappresentare il valore 'vero'. Dato un misurando X (ad esempio un volume), ed il relativo intervallo di ampiezza 2a, allora l'incertezza tipo associata è pari a:

$$U_B(X) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (11)$$

E l'incertezza relativa percentuale è:

$$U'_B(X) = \frac{U_B(X)}{X} \quad (12)$$

Ad esempio si consideri una pipetta da 10 ml, in cui la minima divisione sia pari a 0,1 ml. In tal caso i volumi misurati saranno esprimibili come Volume = $(X \pm 0,1)$ ml = $X \pm a$. L'intervallo di incertezza sarà pari a $2a = 0,2$ ml, e l'incertezza pari a

$$U_B(X) = \frac{a}{\sqrt{3}} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577 \text{ ml}$$

Pertanto su un volume prelevato di 10 ml l'incertezza relativa sarà pari a:

$$U'_B(X) = \frac{U_B(X)}{X} = \frac{0,0577}{10} = 0,00577$$

Come si può osservare si tratta di contributi di entità molto modesta che generalmente non apportano variazioni significative all'incertezza ed i cui effetti si possono in linea di massima considerare ricompresi negli approcci sperimentali olistici sopra sviluppati.

4.3 Campionamento, trasporto e conservazione del campione

Per i requisiti generali si rimanda a quanto indicato nella norma 17025 e al Regolamento ACCREDIA RT-08 ai punti 7.3, 7.4.3 e 7.5.

Di seguito si forniscono alcune indicazioni relativamente a quanto oggetto della presente trattazione.

4.3.1 Campionamento e trasporto

I contenitori di materiale chimicamente inerte usati per il campionamento (vetro, polietilene (PE), polipropilene (PP), politetrafluoroetilene (PTFE) (ISO 5667-16) devono essere riempiti fino all'orlo, al fine di evitare la dispersione di sostanze volatili eventualmente presenti.

Porre nel più breve tempo possibile il campione nell'apposito contenitore termoisolante (per mantenere durante il trasporto la temperatura fra 2-8 °C utilizzare elementi raffreddanti (ISO 5667-16) e trasportare in laboratorio.

Il volume raccomandato totale di campione prelevato dovrebbe essere sufficiente a soddisfare le esigenze per effettuare il test, per poterlo ripetere ed eventualmente dividerlo in subcampioni.

4.3.2 Conservazione del campione

I campioni da sottoporre ad analisi con *Daphnia magna* devono essere analizzati quanto prima, per evitare cambiamenti nella composizione originale dovuti a reazioni fisiche, chimiche o biologiche.

Il metodo ISO 6341 suggerisce l'analisi preferibilmente entro le 12 ore dal campionamento (entro questo tempo possono non essere refrigerati). Oltre questo tempo i campioni possono essere conservati tra 0°C e 5°C per un tempo massimo di 72 ore; per tempi superiori di conservazione, congelare il campione a temperature inferiori a -18°C per un periodo massimo di 2 mesi (ISO 6341).

Il metodo APAT CNR IRSA 8020 prevede per il metodo B, che se l'analisi è allestita entro le 6 ore dal campionamento il campione può essere non refrigerato. Oltre questo tempo è obbligatoria la refrigerazione a +4°C, l'analisi deve comunque essere eseguita entro 24 ore dal campionamento. Per il metodo A è prevista una temperatura di conservazione +4°C e l'analisi deve essere avviata entro 48h dal prelievo. Non è previsto il congelamento.

Nel caso vengano utilizzati metodi che prevedono il congelamento utilizzare solo contenitori resistenti alle basse temperature che non devono essere riempiti completamente, in modo da permettere

un'espansione del volume. Nel caso in cui si preveda il congelamento, il tempo necessario per il congelamento e per lo scongelamento dovrebbe essere ridotto al minimo; ciò si ottiene riducendo il volume del campione e quindi del contenitore.

I campioni congelati devono essere testati subito dopo il completo scongelamento che deve avvenire a temperature non superiori a 30°C (ISO 6341).

Il campione non può essere ricongelato né conservato in frigo per prove da eseguire nei giorni seguenti a quello di scongelamento (ISO 5667-16).

4.3.3 *Trattamento del campione prima della analisi*

Prima di iniziare il saggio, agitare manualmente il campione per garantirne l'omogeneità.

Se questo presenta elevata torbidità dovuta ad una notevole presenza di solidi sospesi, per evitare interferenze con le daphnie (organismi filtratori), il campione deve essere fatto sedimentare fino ad un massimo di 2 ore. La quantità necessaria del campione viene quindi aspirata, con una pipetta posizionata centralmente a circa metà altezza tra il sedimento e la superficie. Nel caso in cui vi siano interferenze residue, il campione può essere centrifugato per 10 min. a 5000 rpm (ISO 6341). ISO 5667-16:2017 suggerisce invece 10min a 4500 ±1500 rpm.

Si sconsiglia la filtrazione in quanto il materiale con cui è fatto il filtro può aggiungere una tossicità rilevabile dagli organismi oppure può assorbire sostanze tossiche (per es. i filtri di carta), rimuovendole così dal campione filtrato (vedi norma ISO 6341). Filtri di materiale inerte possono essere condizionati con acqua ultrapura in modo da assicurare l'assenza di residui tossici (ISO 5667-16).

Nel caso si debba procedere con la filtrazione, si consiglia di testare la eventuale tossicità del filtro con acqua di controllo filtrata come il campione.

Prima dell'allestimento del test, il metodo ISO 6341 prevede di misurare il pH e la concentrazione dell'ossigeno disciolto del campione. Annotare i risultati. Si ricorda che il valore della salinità dell'acqua può avere una influenza sui risultati.

Se il campione presenta un pH= 6 o un pH= 9 (ISO 6341), il valore deve essere annotato in quanto questo parametro può influire sul risultato finale. Se viene eseguito il test anche con il pH corretto (cioè riportato nei limiti di pH 6-9), le soluzioni di acido cloridrico e idrossido di sodio usate, non devono eccedere del 5% del volume finale.

Se il campione presenta una concentrazione di ossigeno < 2mg/L pre-aerare per 20 minuti prima di allestire l'analisi (ISO 6341) ed annotare che è stato aerato il campione.

Prima di eseguire il test misurare ed annotare la temperatura. Se non è quella richiesta dal metodo utilizzato, lasciare stabilizzare il campione alla temperatura richiesta fino al raggiungimento della stessa.

4.4 *Assicurazione della validità dei risultati*

L'argomento è trattato al punto 7.7 della norma 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08, cui si rimanda per una trattazione esaustiva dei requisiti.

I risultati devono essere registrati per rilevarne le tendenze ed eventualmente utilizzare tecniche statistiche per il loro riesame e deve essere disponibile una procedura per monitorare la validità dei risultati; che comprenda in termini non esaustivi e ove appropriato alcuni elementi specifici tra cui l'utilizzo di materiali di riferimento, di campioni di verifica utilizzando carte di controllo, di verifiche funzionali delle apparecchiature di prova e di misurazione, di ripetizioni di prove o tarature utilizzando metodi identici o differenti, di riesame dei risultati presentati, di partecipazione a circuiti interlaboratorio e di prove civetta.

Di seguito si indicano alcune delle verifiche per il controllo analitico della qualità dei risultati da effettuare nel caso del test oggetto della presente trattazione.

In generale controlli di qualità analitici sono utilizzati per la verifica che l'operatività del laboratorio sia conforme ai parametri definiti in fase di validazione del metodo; questi controlli possono essere classificati come CQA interni ed esterni.

4.4.1 *Controllo di qualità analitico interno*

Gli elementi fondamentali del CQA interno sono:

- il controllo negativo inserito all'interno della prova

-
- la determinazione della EC₅₀ di sostanze di riferimento con una periodicità stabilita in base al metodo e alle procedure scelte dal laboratorio
 - le analisi di campioni in doppio per la verifica del rispetto del limite di ripetibilità r determinato in fase di validazione (dato utilizzato anche per il mantenimento della abilitazione degli operatori)
- E' possibile documentare nel tempo la variabilità di questi parametri attraverso l'impiego di carte di controllo.

Controllo negativo inserito all'interno della prova: il controllo negativo dovrebbe essere inserito all'interno di ogni prova effettuata; le repliche del controllo devono essere mantenute nelle stesse condizioni delle repliche del campione in esame.

Il numero di repliche del controllo utilizzate durante un test varia secondo della tipologia:

- test che prevedono una scansione di concentrazioni (met. A - APAT CNR IRSA 8020, metodo ISO, metodo OECD): il controllo deve essere composto da almeno 4 repliche; in presenza di un agente solubilizzante è necessario inserire una ulteriore serie di controlli contenente l'agente solubilizzante.
- test effettuati ad una unica concentrazione (met. B - APAT CNR IRSA 8020, test limite ISO e OECD): il numero dei controlli deve essere uguale al numero di repliche del trattato: 3 repliche per metodo APAT e 4 repliche per il test limite.

All'interno di ciascuna replica deve essere inserito l'idoneo numero di dafnidi a seconda del metodo utilizzato.

Determinazione periodica della EC₅₀ di sostanze di riferimento: in base alle indicazioni del metodo scelto e delle procedure previste dal laboratorio, occorre effettuare la determinazione della 24/48hEC₅₀ di sostanze di riferimento; si tratta di sostanze di cui siano note le caratteristiche tossicologiche nei confronti dell'organismo test e di cui siano disponibili dati di letteratura in forma di EC₅₀; tali sostanze sono scelte in base alla loro rilevanza a livello internazionale e in base ai dati ottenuti in interconfronti.

Ad esempio, le sostanze utilizzate possono essere:

- bicromato di potassio
- cloruro di potassio
- cloruro di sodio
- zinco solfato eptaidrato

E' possibile utilizzare altre sostanze di riferimento purchè siano disponibili dati sulle caratteristiche tossicologiche nei confronti di *Daphnia magna*.

La UNI EN ISO 6341 indica per il bicromato di potassio un intervallo della 24hEC₅₀ tra 0.6 e 2.1 mg/L.

La valutazione della sensibilità ai tossici viene effettuata periodicamente: i risultati sono registrati e riportati in forma di carta di controllo conservata in formato cartaceo o elettronico.

Analisi di campioni in doppio: annualmente per la verifica periodica della ripetibilità del metodo e/o dell'abilitazione degli operatori possono essere svolte due prove in condizioni di ripetibilità con un tossico di riferimento; sulla base dei risultati ottenuti, si verifica il rispetto del limite di ripetibilità ottenuto in fase di validazione.

Le condizioni delle prove sono quelle previste dal metodo e coincidenti, per quanto possibile, con quanto effettuato nelle prove di validazione.

I valori registrati e conservati sono valutati per verificare la loro accettabilità e possono essere riportati in forma di carta di controllo, riferita al laboratorio o anche ai singoli operatori abilitati, in modo da poter valutare anche l'andamento nel tempo. Tale carta viene conservata in formato elettronico o cartaceo.

4.4.2 Controllo di qualità analitico esterno

Il controllo di qualità CQA esterno viene realizzato attraverso la partecipazione, almeno annuale, a prove valutative interlaboratorio, prediligendo, laddove possibile quelli eseguiti in conformità alla ISO 17043; i parametri sono valutati sulla base dei report forniti dall'Ente organizzatore.

Il parametro è fornito generalmente in forma di z score; i risultati dei test interlaboratorio sono giudicati:

- conformi: se lo $|z \text{ score}| \leq 2$
- dubbi: se lo $|z \text{ score}|$ è compreso tra 2 e 3
- non conforme: se lo $|z \text{ score}| \geq 3$

I risultati registrati e valutati per la loro accettabilità possono essere riportati in forma di carta di controllo, riferita al laboratorio o anche ai singoli operatori abilitati, in modo da poter valutare anche l'andamento dei singoli valori nel tempo. Tale carta viene conservata in formato elettronico o cartaceo. In caso di risultati dubbi ($|z \text{ score}|$ compreso tra 2 e 3) si verifica la conformità del risultato considerando l'apporto della incertezza di misura; il laboratorio stabilisce le procedure da seguire per la valutazione dei risultati ottenuti a seconda dei casi che si possono presentare.

In caso di risultati non conformi dal Regolamento RT- 24 di ACCREDIA:

“... Il laboratorio deve fornire evidenza di aver riesaminato l'intero processo analitico per individuare le cause della non conformità e di aver messo in atto le idonee azioni correttive. A verifica dell'efficacia dell'azione correttiva intrapresa, il laboratorio deve fare immediata richiesta all'ente organizzatore, se già non previsto a breve nella pianificazione, di poter eseguire nuovamente la ricerca oggetto della non conformità nel successivo invio di campioni. Nel caso in cui sia tecnicamente possibile, è opportuno che i laboratori ripetano la prova sullo stesso campione (re-invio di un campione identico a quello già esaminato ed oggetto di non conformità); se non possibile per ragioni organizzative e tecniche, potrà essere effettuata la ripetizione della prova (stesso misurando e metodo) anche se su un altro campione.”

Se i risultati ottenuti rientrano nei limiti di accettabilità, il metodo può essere considerato sotto controllo.

Se i risultati non conformi vengono confermati, è opportuno effettuare una analisi approfondita del metodo con eventuale sostituzione degli organismi test e dei prodotti per le prove, e sempre dal Regolamento RT-24:

“...Il laboratorio deve comunicare ad ACCREDIA le prove con esito insoddisfacente non risolto alla seconda ripetizione richiedendo la sospensione dell'utilizzo del marchio per quella specifica prova: in caso di rilevamento di omissione della comunicazione da parte di ACCREDIA o in fase di audit o in seguito a richiesta specifica fatta da ACCREDIA all'ente organizzatore, ACCREDIA si riserva la facoltà di sospendere l'accreditamento del laboratorio.”

4.5 Presentazione dei risultati

L'argomento è trattato al punto 7.8 della norma 17025 e del Regolamento ACCREDIA RT-08, al quali si rimanda per una trattazione esaustiva.

4.5.1 Criteri e requisiti per l'approvazione dei risultati

In generale i risultati devono essere riesaminati e approvati prima di essere emessi, forniti in modo chiaro, univoco e oggettivo utilizzando un rapporto, e riportare quanto concordato con il cliente e necessario per l'interpretazione dei risultati stessi, nonché tutte le informazioni eventualmente richieste dal metodo utilizzato. Se concordato con il cliente può essere utilizzata una forma semplificata di presentazione dei risultati riportando chiaramente l'identificazione di chi li ha approvati.

Di seguito si riportano alcune indicazioni specifiche nel caso del test con *Daphnia magna*.

Criteri di accettabilità della prova

Perché sia valido, il test deve rispettare i seguenti criteri di accettabilità:

- **Metodo UNI EN ISO 6341**

- nel controllo la percentuale di immobilizzazione deve essere $\leq 10\%$
- la 24hEC50 del bicromato di potassio deve essere compresa tra 0.6 e 2.1 mg/l
- la misurazione dell'ossigeno disciolto al termine del test; i test batches con una $[O_2] < 2 \text{ mg/l}$, non devono essere considerati nei calcoli finali.

- **OECD Guideline n° 202**

- nel controllo la percentuale di immobilizzazione deve essere $\leq 10\%$
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere superiore a 3 mg/l al termine del test, nel controllo e nei trattati

- **Metodo APAT CNR IRSA 8020 (metodi A e B)**

- nel controllo, la percentuale degli organismi immobili o galleggianti deve essere $\leq 10\%$
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto al termine del test deve essere $\geq 2 \text{ mg/l}$

Registrazione dei risultati

Al termine della prova vengono contati gli organismi immobili, definiti come:

- *metodo APAT CNR IRSA 8020*: incapaci di attività natatoria anche dopo una leggera agitazione del contenitore.
 - *metodo UNI EN ISO 6341*: incapaci di attività natatoria nei 15" di osservazione successivi ad una leggera agitazione del contenitore.
 - *metodo OECD Guideline n° 202*: anche in presenza di un movimento delle antenne.
- Il numero di organismi immobili viene annotato sul foglio di lavoro, mantenendo separati i risultati per ogni replica e per ogni concentrazione testata. La registrazione sul foglio di lavoro garantisce la rintracciabilità dei dati grezzi.

Calcolo ed espressione dei risultati

I calcoli effettuati sulla base dei dati grezzi sono riportati nel foglio di lavoro; in caso di utilizzo di un software di calcolo, il report del programma di calcolo viene allegato al foglio di lavoro e conservato insieme allo stesso.

Il calcolo dei risultati viene effettuato seguendo modalità differenti a seconda del metodo utilizzato; per la trattazione dei test statistici applicati si rimanda ai singoli metodi.

Metodo APAT CNR IRSA 8020: anche se non espressamente riportato, il calcolo della % di immobilizzazione (metodo B) viene effettuato come segue:

- $(n^\circ \text{ dafnidi immobili} / n^\circ \text{ dafnidi esposti}) \times 100$

In Appendice 2, per il calcolo della EC₅₀ e dei limiti fiduciali (metodo A) sono proposte 3 modalità, ognuna delle quali richiede per la corretta applicazione, un certo numero di risultati parziali, diversi cioè da 0 e 100%:

- *Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato) – Retta concentrazione effetto*: sono richiesti almeno 2 dati parziali
- *Media geometrica*: si può utilizzare in assenza di dati parziali
- *Analisi dei probits*: sono richiesti almeno 2 dati parziali

Metodo UNI EN ISO 6341: nel paragrafo 10.1 per la stima della EC₅₀ si richiede l'utilizzo di un appropriato test statistico (analisi dei probits, media mobile, metodi binomiali, metodo grafico), indicando nel contempo la letteratura di riferimento.

Metodo OECD Guideline n° 202: nei paragrafi 25 e 26 sono riportate le indicazioni per il trattamento dei dati ottenuti; si suggerisce l'utilizzo di un appropriato metodo statistico (ad esempio *analisi dei probits, ecc.*) per il calcolo della EC₅₀ e dei limiti fiduciali.

In assenza di dati intermedi si suggerisce la determinazione della media geometrica tra la concentrazione più alta che non produce effetto e quella più bassa che produce il 100% di effetto.

Per il calcolo del valore della EC₅₀ e dei relativi limiti fiduciali possono essere utilizzati software che contengono programmi statistici in grado soddisfare le richieste dei diversi metodi.

E' consigliabile utilizzare un software validato: un software si considera validato se proveniente da Enti, Organizzazioni, Agenzie di rilevanza internazionale nel campo scientifico; in alternativa, soprattutto nel caso di un foglio di calcolo prodotto dal laboratorio stesso, è consigliabile effettuare validazione del programma

La validazione può essere effettuata utilizzando un software primario, soluzione non sempre agevole, o effettuando un calcolo riportato in una Norma, soluzione sicuramente più semplice.

Il software viene verificato periodicamente effettuando un calcolo standard, utilizzando ad esempio dati riportati sul manuale del software stesso o in testi di statistica; è opportuno conservare il risultato delle verifiche periodiche.

4.5.2 Rapporto di prova

Il Rapporto di prova rappresenta il prodotto finale della attività analitica; deve contenere tutte le informazioni necessarie per garantire la tracciabilità delle attività effettuate e comunque seguire quanto riportato al p.to 7.8 nella UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e nel Documento Accredia RT-08. La prova deve essere indicata così come riportata nell'elenco delle prove accreditate.

Relativamente alla modalità di espressione si evidenzia che il metodo UNI EN ISO 6341 prevede che il risultato sia espresso come EC₅₀.

Ad eccezione del APAT CNR IRSA 8020 gli altri metodi richiedono inoltre le informazioni come specificate nella tabella di seguito:

Metodo ISO 6341, al par. 12, richiede che nel Rapporto di prova siano contenute, senza escluderne altre:

- il metodo applicato con il riferimento ISO;
- tutte le indicazioni richieste per la completa identificazione della sostanza chimica o del campione
- i metodi di preparazione del campione;
- tutte le informazioni biologiche, chimiche e fisiche richieste dal metodo, incluse l'origine e l'età della coltura di *Daphnia magna* utilizzata;
- il risultato della prova in forma di 24/48hEC₅₀, il metodo di calcolo e se possibile i limiti di confidenza al 95%;
- il risultato dell'eventuale test limite;
- la minima concentrazione testata che determina il 100% di immobilizzazione e la massima concentrazione testata che determina l'assenza di immobilizzazione nelle 24/48 ore del test;
- ogni comportamento anomalo rilevato negli organismi test durante la prova;
- ogni dettaglio operativo non specificato nel documento ISO e ogni deviazione che possa aver influito sui risultati finali;
- il risultato ottenuto nella prova con la sostanza di riferimento e la data di esecuzione del test
- i dati necessari a dimostrare il rispetto dei criteri di validità;
- identificazione del laboratorio di prova, di chi ha eseguito la prova e di chi ha approvato il Rapporto di Prova.

Metodo OECD Guideline n° 202 al par. 27, richiede che nel Rapporto di prova siano contenute, senza escluderne altre:

Identificazione della sostanza sottoposta a test:

- stato fisico e proprietà chimico fisiche, identificazione chimica della sostanza, purezza

Organismo test:

- origine e specie, fornitore (se noto) e condizioni di allevamento (con indicazione delle modalità di alimentazione)

Condizioni di esecuzione del test:

- descrizione dei contenitori utilizzati durante la prova (tipo, volume, volume di soluzione utilizzata, numero di dafnidi utilizzati per contenitore, numero di repliche per concentrazione
- modalità di preparazione della soluzione madre e delle diluizioni incluso l'uso di solventi o disperdenti, le concentrazioni utilizzate
- caratteristiche dell'acqua di diluizione: origine e caratteristiche (pH, durezza, rapporto Ca/Mg, rapporto Na/K, alcalinità, conducibilità ecc.), concentrazione della *reconstituted water* se utilizzata
- condizioni di incubazione: temperatura, intensità luminosa, ossigeno disciolto, pH ecc.

Risultati:

- il numero e la percentuale di dafnidi immobilizzati o che hanno subito un effetto avverso (incluso uno sviluppo anormale) nel controllo e in ogni trattamento, ad ogni osservazione effettuata (24/48 ore) e una descrizione della natura dell'effetto osservato
- data e risultato della prova con il tossico di riferimento, se disponibile
- le concentrazioni nominali e il risultato di tutte le analisi effettuate per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame; l'efficienza di recupero del metodo e il limite di rilevabilità
- tutte le misure chimico-fisiche effettuate (temperatura, pH e ossigeno disciolto) durante il test
- la 48hEC₅₀ e i relativi intervallo di confidenza e il modello della curva utilizzata per il loro calcolo, la pendenza della curva dose-risposta e l'errore standard
- il modello utilizzato per la determinazione della 48hEC₅₀;
- tutti i dati devono essere riportati anche per l'osservazione alle 24 ore, se effettuata
- la descrizione di ogni deviazione che possa aver influito sui risultati finali

Allegato A

“Caratteristiche generali e confronto dei metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*”

Allegato A – Caratteristiche generali e confronto dei metodi ufficiali per il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*

	Metodo APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
TITOLO	8020. Metodi di valutazione della tossicità con <i>Daphnia</i>	Determinazione dell'inibizione della mobilità di <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta	Saggio di immobilizzazione acuta in <i>Daphnia sp.</i>	
DURATA DEL TEST	– <u>Metodo A</u> (calcolo EC ₅₀): 24 o 48 h – <u>Metodo B</u> (accettabilità di un effluente): 24 h	• 24 o 48 h	• 48 ore	Il metodo APAT IRSA comprende due metodi: A e B. In particolare, il B prevede la valutazione della percentuale di organismi immobili dopo 24 h, così come richiesto dal D.lgs. 152/2006 e ss.mm.ii
SCOPO	-	Metodo per la determinazione della tossicità acuta per <i>D. magna</i> Straus.	Saggio di tossicità acuta finalizzato a determinare gli effetti di una sostanza chimica sulle daphnie.	
APPLICABILITÀ	Si applica a sostanze chimiche ed effluenti	Si applica a: sostanze chimiche, effluenti industriali o di discarica, acque di scarico trattate e non, estratti acquosi o lisciviati, acque dolci superficiali e di falda, eluati di sedimenti di acque dolci, acque interstiziali di sedimenti di acque dolci	Sostanze chimiche	

	Metodo APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
<u>1.1 Specie</u>	Crostaceo Cladocero della specie <i>Daphnia magna</i> Straus	<i>Daphnia magna</i> Straus (Crostaceo Cladocero)	<i>Daphnia magna</i> Straus (specie preferita) Anche altre specie (ad es. <i>Daphniapulex</i>)	Solo il metodo C2/OECD prevede l'utilizzo di specie diverse dalla <i>D. magna</i>
<u>1.2 Provenienza</u>	Allevamenti/Colture in laboratorio (Appendice 1 – Allevamento di <i>Daphnia magna</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Allevamenti/Colture in laboratorio (Annex C – General recommendations for stock culturing) Ephippi (uova dormienti) ottenuti in laboratorio (Annex D – Culturing of <i>Daphnia magna</i> for production of dormanteggs) o acquistati presso compagnie specializzate (es. Microbiotest distribuita da Ecotox) 	Allevamenti/Colture in laboratorio	Solo la norma UNI EN ISO 6341 prevede l'utilizzo degli ephippi. Sia il metodo APAT IRSA che l'ISO 6341 forniscono in allegato indicazioni dettagliate circa l'allevamento degli organismi e, solo nell'ISO, circa la produzione degli ephippi nel proprio laboratorio.
<u>1.3 Organismi test</u>	<ul style="list-style-type: none"> Neonati di età inferiore alle 24 h Le femmine adulte gravide sono individuate nelle colture e isolate. Sono da scartare colture in riproduzione sessuata con elevata mortalità, bassa natalità e altri sintomi evidenti di condizioni culturali non adeguate. <p>In Appendice 1 sono riportate le condizioni per sviluppare e mantenere un allevamento di <i>Daphnia magna</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Neonati ottenuti per partenogenesi aciclica con meno di 24 h di vita provenienti da una coltura di daphnie sane, senza segni di stress (come una mortalità maggiore del 20% in 2 giorni, presenza di maschi o di ephippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, decolorazione degli animali. I neonati non devono provenire dalla prima nidiata. Le femmine gravide sono isolate e i nuovi neonati sono prelevati entro 24 h I neonati provenienti dalla schiusa degli ephippi possono essere usati direttamente come organismi test se rispettano i criteri di validità UNI EN ISO 6341 (laboratorio (Annex D – Culturing of <i>Daphnia magna</i> for production of dormanteggs, par. D4 Quality control testing)¹ 	<ul style="list-style-type: none"> Neonati con meno di 24 h di vita provenienti da una stessa popolazione di daphnie, sane e senza segni di stress (quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di ephippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, decolorazione, ecc. Non utilizzare progenie provenienti dalla prima nidiata. 	Solo il metodo ISO specifica cosa si intende per elevata mortalità. ¹ Gli ephippi acquistati devono essere accompagnati da un certificato attestante tutti i criteri e le condizioni specificate dalla norma UNI EN ISO 6341 circa gli organismi test. (ad es. il valore di EC ₅₀ -24 e 48 h per il tossico di riferimento K ₂ Cr ₂ O ₇ , il tempo di schiusa, il numero minimo di neonati per schiusa, le condizioni di conservazione, ecc.)

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
<u>1.4 Condizioni di esposizione</u> <u>Temperatura</u>	20±1 °C	20±2 °C	Compresa tra 18 e 22°C. Durante il test deve essere mantenuta costante entro ±1°C	
<u>Fotoperiodo</u>	16hL: 8hB. In ogni caso, il fotoperiodo utilizzato nel saggio deve essere lo stesso a cui gli animali sono stati allevati.	<ul style="list-style-type: none"> • 16 h L: 8hB o al buio • I tossici fotodegradabili sono testati solo al buio o con luce minima secondo il fotoperiodo. 	16hL: 8hB o al buio (quest'ultimo in particolare se le sostanze sono fotodegradabili)	
<u>Illuminazione</u>	Attenuata (circa 300 lux al piano di lavoro)	-	-	
<u>Atmosfera</u>	Libera da vapori e polveri	Libera da vapori e polveri		
<u>Areazione</u>	-	-	No areazione durante il test	
<u>pH</u>	-	Il test deve essere effettuato senza aggiustamenti di pH Se si osservano effetti tossici a concentrazioni per cui il pH non è compatibile con la sopravvivenza degli organismi (fuori del range 6-9) il test può essere ripetuto con aggiustamenti del pH del campione. In tal caso aggiustare il pH del campione al pH dell'acqua di diluizione utilizzata.... continua paragrafo 8.1	Il test deve essere effettuato senza aggiustamenti di pH	
<u>Nutrizione</u>	Gli organismi non devono essere alimentati durante il test	Gli organismi non devono essere alimentati durante il test. <u>Nota</u> Nella prova a 48 h con ephippi, è prevista l'alimentazione dei neonati prima di iniziare il test.	Gli organismi non devono essere alimentati durante il test	
<u>Repliche (r.)</u> <u>Test preliminare</u>	<u>Metodo A:</u> 1 r./concentrazione+ 1r. per il controllo	Non sono necessarie repliche (Viene fornito un esempio nell'Allegato B alla norma)	1 r./concentrazione+ 1 r. per il controllo	

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
Test definitivo	<u>Metodo A</u> : 4 r./concentrazione + 4 r. per il controllo <u>Metodo B</u> : 3 r. per il controllo + 3 r. per l'effluente	4 r./concentrazione. + 4 r. per il controllo	4 r./concentrazione + 4 r. per il controllo	
N° organismi/ replica	<u>Metodo A</u> : 5 <u>Metodo B</u> : 10	5	5	
N° tot. <u>Organismi / concentrazione</u> Test preliminare	<u>Metodo A</u> : 5 (5 x 1 r.) <u>Metodo A</u> : 5 (5 x 1 r.)	5 (5 x 1 r.)	5 (5 x 1 r.)	
Test definitivo	<u>Metodo A</u> : 20 (5 x 4 r.) <u>Metodo B</u> : 30 (10 x 3 r.)	20 (5 x 4 r.)	20 (5 x 4 r.)	
Contenitori di prova	Recipienti del volume di 50 mL in vetro borosilicato o in plastiche fluorurate	Contenitori di materiale chimicamente inerte e di sufficiente capacità	Contenitori di materiale chimicamente inerte e di sufficiente capacità	
Volume di soluzione di prova/daphnia	<u>Metodo A</u> : 10 mL/daphnia; 50 mL/contenitore <u>Metodo B</u> : 5 mL/daphnia; 50 mL/contenitore	2 mL/daphnia 10 mL/contenitore	2 mL/ daphnia 10 mL/contenitore	
<u>1.5 Idoneità degli organismi</u>	È opportuno verificare periodicamente gli organismi con un tossico di riferimento, È proposto il bicromato di potassio, di cui si determina l'EC50 24 h.	<u>Per organismi di allevamento:</u> Determinare periodicamente l'EC50-24 h del bicromato di potassio Il risultato deve essere compreso nell'intervallo 0,6 -2,1 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ ·L ⁻¹ . <u>Per ephippi:</u> Determinare l'EC50-24 h del bicromato di potassio per ogni lotto di ephippi utilizzato. Il risultato deve essere compreso nell'intervallo 0,6 -2,1 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ ·L ⁻¹	Al fine di garantire che le condizioni di prova sono affidabili, si può utilizzare una sostanza di riferimento per determinarne l'EC50. È raccomandato l'utilizzo di tossici impiegati in prove interlaboratorio (ring test). La/e prova/e con la sostanza di riferimento devono essere condotte preferibilmente una volta al mese e almeno due volte l'anno. Il valore di l'EC50-24 h del bicromato di potassio deve essere compreso nell'intervallo 0,6-2,1 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ ·L ⁻¹	- Il metodo APAT-IRSA non riporta un intervallo di riferimento per l'EC50 24 h con K ₂ Cr ₂ O ₇ ·L ⁻¹ . - Il metodo OCSE contempla per l'EC50-24 h del bicromato di potassio, un intervallo più ristretto.

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI														
<u>2.1 Acqua allevamento</u>	<p>Acque di rete non clorate, di falda o di corpo idrico superficiale purché non contaminate. Sono preferibili quelle stabili dal punto di vista fisico-chimico. L'aerazione per 24 h e un trattamento con carbone attivo, preceduto (per le acque superficiali) da una filtrazione 0,22 µm ne migliorano la qualità. L'acqua va saggiata per verificarne l'idoneità all'allevamento delle daphnie. (paragrafo 2 Appendice 1 del metodo)</p> <p>Nelle vasche di allevamento mantenere una concentrazione di ossigeno disciolto ≥ 6 mg/L</p> <p>Durezza 150 mg CaCO₃/L Rapporto Ca/Mg=4 Rapporto Na/K=10</p>	<p>Acqua naturale di superficie o di falda, ricostituita o di rubinetto dechlorurata se le daphnie sopravvivono per la durata della coltura, dell'acclimatazione e della prova senza segni di stress.</p> <p>pH = 6-9 Durezza 140-275 mg CaCO₃/L</p>	<p>Acqua naturale di superficie o di falda, ricostituita o di rubinetto dechlorurata se le daphnie sopravvivono per la durata della coltura, dell'acclimatazione e della prova senza segni di stress.</p>															
<u>Acqua di diluizione</u>	<p>pH= 7,5-8,5 Durezza= 140-160 mg CaCO₃/L Alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L</p>	<p>pH = 7,3-8,3 Ca/Mg= 4± 1 Durezza 175-225 mg CaCO₃/L Ossigeno disciolto ≥ 7 mg/L.</p>	<p>Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione di qualità accettabile:</p> <table border="1"> <tr> <td>particolato</td> <td>< 20 mg/L</td> </tr> <tr> <td>carbonio organico totale</td> <td>< 2 mg/L</td> </tr> <tr> <td>ammoniaca non ionizzata</td> <td>< 1 µg/L</td> </tr> <tr> <td>cloro residuo</td> <td>< 10 µg/L</td> </tr> <tr> <td>pesticidi organosforici totali</td> <td>< 50ng/L</td> </tr> <tr> <td>pesticidi organo clorurati totali più difenilpoliclorurati</td> <td>< 50 ng/L</td> </tr> <tr> <td>cloro organico totale</td> <td>< 25 ng/L</td> </tr> </table> <p>pH = 6 - 9. Durezza= 140-250 mg/L per <i>D. magna</i> (per le altre specie di Daphnia può essere opportuna una durezza inferiore).</p>	particolato	< 20 mg/L	carbonio organico totale	< 2 mg/L	ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/L	cloro residuo	< 10 µg/L	pesticidi organosforici totali	< 50ng/L	pesticidi organo clorurati totali più difenilpoliclorurati	< 50 ng/L	cloro organico totale	< 25 ng/L	<p>6. I valori di pH e di durezza dell'acqua indicati dal metodo APAT-IRSA risultano più ristretti rispetto agli altri metodi</p>
particolato	< 20 mg/L																	
carbonio organico totale	< 2 mg/L																	
ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/L																	
cloro residuo	< 10 µg/L																	
pesticidi organosforici totali	< 50ng/L																	
pesticidi organo clorurati totali più difenilpoliclorurati	< 50 ng/L																	
cloro organico totale	< 25 ng/L																	

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI																																												
<u>Esempio di Acqua di diluizione/</u>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Sostanza</th> <th>In 1 L di acqua*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cloruro di potassio KCl</td> <td>10 mg</td> </tr> <tr> <td>Bicarbonato di sodio NaHCO₃</td> <td>192 mg</td> </tr> <tr> <td>Solfato di magnesio MgSO₄</td> <td>53 mg</td> </tr> <tr> <td>Solfato di calcio diidrato CaCl₂·2H₂O</td> <td>183 mg</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone</p>	Sostanza	In 1 L di acqua*	Cloruro di potassio KCl	10 mg	Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	192 mg	Solfato di magnesio MgSO ₄	53 mg	Solfato di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	183 mg	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Soluzioni madre</th> <th rowspan="2">Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*</th> </tr> <tr> <th>Sostanza</th> <th>In 1 L di acqua*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cloruro di calcio diidrato CaCl₂·2H₂O</td> <td>11,76 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Solfato di magnesio eptaidrato MgSO₄·7H₂O</td> <td>4,93 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Bicarbonato di sodio NaHCO₃</td> <td>2,59 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Cloruro di potassio KCl</td> <td>0,23 g</td> <td>25 mL</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Acqua pura con conduttività <10 µS/cm</p>	Soluzioni madre		Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*	Sostanza	In 1 L di acqua*	Cloruro di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76 g	25 mL	Solfato di magnesio eptaidrato MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93 g	25 mL	Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	2,59 g	25 mL	Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 mL	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Soluzioni madre</th> <th rowspan="2">Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*</th> </tr> <tr> <th>Sostanza</th> <th>In 1 L di acqua*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cloruro di calcio diidrato CaCl₂·2H₂O</td> <td>11,76 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Solfato di magnesio eptaidrato MgSO₄·7H₂O</td> <td>4,93 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Bicarbonato di sodio NaHCO₃</td> <td>2,59 g</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>Cloruro di potassio KCl</td> <td>0,23 g</td> <td>25 mL</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Acqua di purezza adeguata, non ionizzata o distillata, o sottoposta a trattamento di osmosi inversa, con una conducibilità preferibilmente ≤10 µS/cm.</p>	Soluzioni madre		Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*	Sostanza	In 1 L di acqua*	Cloruro di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76 g	25 mL	Solfato di magnesio eptaidrato MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93 g	25 mL	Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	2,59 g	25 mL	Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 mL	
Sostanza	In 1 L di acqua*																																															
Cloruro di potassio KCl	10 mg																																															
Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	192 mg																																															
Solfato di magnesio MgSO ₄	53 mg																																															
Solfato di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	183 mg																																															
Soluzioni madre		Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*																																														
Sostanza	In 1 L di acqua*																																															
Cloruro di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76 g	25 mL																																														
Solfato di magnesio eptaidrato MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93 g	25 mL																																														
Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	2,59 g	25 mL																																														
Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 mL																																														
Soluzioni madre		Aggiungere i seguenti volumi ad 1 L di acqua*																																														
Sostanza	In 1 L di acqua*																																															
Cloruro di calcio diidrato CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76 g	25 mL																																														
Solfato di magnesio eptaidrato MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93 g	25 mL																																														
Bicarbonato di sodio NaHCO ₃	2,59 g	25 mL																																														
Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 mL																																														
	Aerare per 24 h alla temperatura di 20°C con aria compressa priva di contaminanti.	Aerare fino a che la concentrazione di ossigeno disciolto raggiunge la saturazione e il pH non si è stabilizzato a 7,8 ± 0,5. Questo tipo di acqua ha una durezza compresa tra 175 - 275 mg CaCO ₃ /L.	Aerare fino a che la concentrazione di ossigeno disciolto raggiunge la saturazione.																																													
<u>2.2 Altre indicazioni</u>		Per l'allevamento della coltura stock di Daphnie è possibile utilizzare il mezzo Elendt M4. Il mezzo M4, a causa della presenza di agenti chelanti come l'EDTA, non deve essere utilizzato come acqua di diluizione per campioni contenenti ioni metallici bivalenti e più in generale, quando i campioni hanno una composizione sconosciuta.	Sono indicati come esempi di acqua ricostituita anche quelli del metodo UNI EN ISO 6341 e i mezzi Elendt M4 e M7. Questi ultimi, a causa della presenza di agenti chelanti, non devono essere utilizzati per saggiare sostanze contenenti metalli.																																													

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
<u>3.1</u> <u>Reagenti</u>	- KCl, MgSO ₄ NaHCO ₃ CaSO ₄ ·2H ₂ O K ₂ Cr ₂ O ₇	Reagenti di grado analitico riconosciuto. CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O NaHCO ₃ CaSO ₄ ·2H ₂ O HCl 1M NaOH 1M K ₂ Cr ₂ O ₇	Reagenti di grado analitico riconosciuto. CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O NaHCO ₃ CaSO ₄ ·2H ₂ O HCl 1M NaOH 1M K ₂ Cr ₂ O ₇	
<u>3.2</u> <u>Apparecchiatur</u> <u>e e Materiali</u>	Per l'esecuzione del saggio: <ul style="list-style-type: none"> • Normale apparecchiatura di laboratorio • Misuratore di ossigeno disciolto • Camera oscurabile • Sistema di lampade fluorescenti (circa 300 lux sul piano di lavoro) • Bagno o camera termostatica (20 ± 1 °C) • Recipienti vetro borosilicato o plastiche fluorurate (50 ml) • Recipienti per sostanze volatili <u>Per l'allevamento (appendice 1):</u> <ul style="list-style-type: none"> • Camera di conta e microscopio o contatore automatico di particelle • Sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa • Sistema di illuminazione (1000 lux a livello delle vasche; lampade con indice di resa cromatica ≥90) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo. 	Per l'esecuzione del saggio: <ul style="list-style-type: none"> • Normale apparecchiatura da laboratorio • Camera termostata • Misuratore di ossigeno disciolto • Recipienti di coltura e di prova di materiale chimicamente inerte e di capacità sufficiente • Pipette per il campionamento degli organismi (ad es. micro pipette di materiale plastica inerte con bulbo) • Bottiglie per campionamento (ISO 5667-16) • Setacci per trasferimento organismi (1,0 mm e 0,3 mm) 	Per l'esecuzione del saggio: <ul style="list-style-type: none"> • Normale apparecchiatura da laboratorio • Misuratore di ossigeno disciolto • pH-metro • Apparecchiatura per controllo temperatura, TOC, COD, durezza dell'acqua ecc. • Recipienti di prova di materiale chimicamente inerte e di capacità sufficiente. (In caso di sostanze volatili si veda paragrafo 1.7.1) 	

	Metodo APAT IRSA-CNR 8020 Man 29 2003	Metodo UNI EN ISO 6341:2013	Metodo C2 Regolamento CE 440/2008 OECD Guideline n° 202 (2004)	OSSERVAZIONI
<u>3.3 Saggio preliminare e saggio definitivo</u>	<p>METODO A Il prodotto o l'effluente sono saggiati con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. Per la scelta delle concentrazioni si veda al 3.4.1 (composti chimici) e 3.4.2 (effluenti).</p>	<p>Il saggio acuto con <i>Daphnia</i> è effettuato in uno o due stadi: *una prova preliminare che determina l'intervallo delle concentrazioni entro il quale deve essere eseguita la prova definitiva e fornisce un valore approssimativo di EC50-24 o 48 h. *una prova definitiva che viene condotta quando il valore di EC50-24 o 48 h ottenuto nel test preliminare non è soddisfacente. Questa consente di calcolare il valore di EC50-24 o 48 h e le concentrazioni corrispondenti allo 0% (nessun effetto) e al 100% (effetto massimo) di immobilizzazione. Per la scelta delle concentrazioni si veda ai punti 3.4.1 (composti chimici) e 3.4.2 (effluenti ed estratti acquosi).</p>	<p>Se non si dispone di informazioni sulla tossicità della sostanza indagata, si può procedere a una prova per determinare il range di concentrazione. Le daphnie sono esposte per 48 h al massimo e non sono necessarie ripetizioni. Il periodo di esposizione può essere ridotto a 24 h. La concentrazione più elevata da testare nel saggio definitivo deve preferibilmente produrre l'immobilizzazione totale (100%), mentre la concentrazione più bassa non deve, di preferenza, causare alcun effetto osservabile. Per la scelta delle concentrazioni si veda al punto 3.4.1 (composti chimici).</p>	
<p><u>3.4 Campione e soluzioni di prova</u> 3.4.1 Composti chimici</p>	<p>METODO A La soluzione del prodotto da esaminare va preparata utilizzando come solvente l'acqua standard debitamente aerata. Acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la <i>Daphnia</i> Nella valutazione dei risultati va tenuto</p>	<p>Preparare una soluzione madre (SM) mediante dissoluzione della sostanza di prova nell'acqua di diluizione al momento dell'uso. Se la SM risulta stabile in condizioni prestabilite può essere preparata in anticipo e conservata a tali condizioni. Per sostanze di prova moderatamente solubili fare riferimento a quanto specificato nella UNI EN ISO 5667-16. Per quanto possibile evitare l'impiego di solventi, emulsionanti o agenti di dispersione. Tuttavia, le sostanze di prova che sono poco solubili in acqua possono essere solubilizzate o disperse mediante ultrasuoni o solventi a bassa</p>	<p>Preparare soluzioni madre (SM) mediante dissoluzione della sostanza di prova nell'acqua di diluizione. Le soluzioni di prova delle concentrazioni selezionate sono generalmente preparate diluendo una SM. Per quanto possibile evitare l'impiego di solventi, emulsionanti o agenti di dispersione. Se è necessario usare questi composti per ottenere una concentrazione corretta utilizzare solventi adeguati e consultare la Linea guida OECD n°</p>	

	<p>conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.</p>	<p>tossicità per Daphnia. I solventi devono essere usati solo quando la loro EC50 è maggiore della solubilità della sostanza di prova. La concentrazione del</p>	<p>23. 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</p>	
	<p>È consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata. <u>Scelta delle concentrazioni</u> La prova preliminare è effettuata operando con 5 diverse concentrazioni scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti il fattore di separazione può essere pari a 10 e la serie delle 5 concentrazioni può essere indicativamente la seguente: 0,01-0,1-1-10-100 mg/L di prodotto La prova definitiva è allestita operando con 5 concentrazioni scelte ad intervalli meno ampi (ad esempio 0,1-0,4-0,8-1,6)</p>	<p>solvente nella soluzione finale non deve superare 0,1 mL/L e devono essere incluse nella prova due soluzioni di controllo: una senza solvente e un'altra con la concentrazione massima di solvente utilizzata. Consultare anche le linee guida OECD n° 23. Nel caso dell'uso di solventi, sono necessarie considerazioni speciali in merito al disegno sperimentale e alla valutazione dei risultati (ISO/TS 20281:2006). Misurare il pH (UNI EN ISO 10523) e l'ossigeno disciolto (UNI EN ISO 5814) della SM e delle soluzioni di prova. Il test deve essere effettuato senza aggiustamenti di pH. Tuttavia in caso di effetti tossici registrati per pH diversi dall'intervallo 6-9, il test può essere ripetuto correggendo il pH stesso del campione. NB: la correzione del pH può alterare la natura del campione Se è necessario correggere il pH si raccomanda di correggere quello dell'acqua di diluizione. Per la correzione, scegliere la concentrazione di HCl o NaOH che non apportano una frazione di volume > 5%. <u>Scelta delle concentrazioni</u> La prova contempla almeno 5 concentrazioni del campione di prova, selezionate in serie</p>	<p>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. <u>Scelta delle concentrazioni</u> Nella prova preliminare (per determinare il range di concentrazione per il saggio definitivo) gli organismi sono esposti ad una serie di concentrazioni della sostanza di prova molto ampia. Nella prova definitiva devono essere utilizzate almeno 5 concentrazioni di prova in una serie geometrica con un rapporto geometrico preferibilmente superiore a 2,2. Se vengono utilizzate meno di 5 concentrazioni, è necessario motivare la scelta.</p>	<p>Rispetto agli altri metodi, APAT-IRSA fornisce minori specifiche in merito ai fattori di separazione tra le diverse diluizioni. Il metodo OCSE non fornisce specifiche sui fattori di separazione tra le diverse diluizioni per la prova preliminare.</p>

		<p>geometrica con un fattore di separazione che dipende dalla natura del campione analizzato (sostanza chimica, effluente o estratto acquoso) e dal tipo di prova (preliminare o definitiva).</p> <p>Per la prova preliminare con sostanze chimiche il fattore di separazione per diluzioni seriali è di solito pari a 10.</p> <p>Per la prova definitiva con sostanze chimiche</p>		
		<p>sono preparate diluizioni con un fattore di separazione non superiore a 3,2.</p> <p>Se ci si aspetta una curva dose-risposta ripida, si raccomanda che il fattore di separazione non sia superiore a 2,2.</p> <p>È auspicabile che l'intervallo di concentrazione scelto per la prova definitiva fornisca almeno tre percentuali di immobilizzazione comprese tra il 10% e il 90%.</p> <p>In funzione dello scopo del test e dei requisiti statistici riguardanti i risultati, sono appropriati anche altri schemi di diluizioni con concentrazioni in serie geometriche o logaritmiche.</p> <p>Si vedano gli esempi in allegato B e F della norma.</p>		
3.4.2 Effluenti ed estratti acquosi	<p><u>METODO A .</u> Disporre di un campione del volume di almeno 1 L. È consigliato l'utilizzo immediato del campione. Prova allestita entro 6 ore dal prelievo: non refrigerare il campione a 4°C. Se la prova è effettuata entro 48 h dal prelievo: conservare il campione a 4°C. <u>Scelta delle concentrazioni</u> La prova preliminare è effettuata operando con 5 diverse concentrazioni di effluente scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti il fattore di separazione può essere pari a 10 e la serie</p>	<p>La prova di tossicità deve essere eseguita entro 12 h dalla raccolta del campione. In caso contrario, raffreddare il campione (0°C - 5°C) sul posto del prelievo, e analizzare il campione entro 24 h. Se la prova non può essere eseguita entro 72 h dal prelievo, congelare (-18°C) il campione prima possibile e quindi effettuare la prova entro 2 mesi dalla raccolta. Al momento della prova:</p> <ul style="list-style-type: none"> • scongelare completamente il campione utilizzando un bagno termostato (T max 30 °C); non usare il microonde. • Omogeneizzare con agitazione manuale. (Maggiori dettagli punto 8.1 della norma) 	Non presente	

	<p>delle 5 concentrazioni può essere indicativamente la seguente: 0,01-0,1-1-10-100 % (v/v) di effluente.</p> <p><u>METODO B</u> Disporre di un campione del volume di circa</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Normalmente non è necessario aerare il campione o le concentrazioni di prova preparate. Solo se l'ossigeno disciolto < del 40% del suo livello di saturazione, pre-aerare il campione o le soluzioni di prova per più di 20 min con un metodo appropriato. Qualsiasi sovrasaturazione deve 		
	<p>500 mL. È consigliato l'utilizzo immediato del campione. Se il campione è utilizzato entro 24 h dalla raccolta deve essere conservato 4°C. Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm. La temperatura del campione va portata a 20±1°C prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio.</p>	<p>essere corretta. Misurare il pH (UNI EN ISO 10523) e l'ossigeno disciolto (UNI EN ISO 5814) del campione o delle soluzioni di prova Il test deve essere effettuato senza aggiustamenti di pH. Tuttavia in caso di effetti tossici registrati per pH diversi dall'intervallo 6-9, il test può essere ripetuto correggendo il pH stesso del campione. NB: la correzione del pH può alterare la natura del campione Se è necessario correggere il pH si raccomanda di correggere quello dell'acqua di diluizione. Per la correzione, scegliere la concentrazione di HCl o NaOH che non apportano una frazione di volume > 5%. <u>Scelta delle concentrazioni</u> La prova contempla almeno 5 concentrazioni del campione di prova, selezionate in serie geometrica con un fattore di separazione che dipende dalla natura del campione analizzato (sostanza chimica, effluente o estratto acquoso) e dal tipo di prova (preliminare o definitiva). Per acque di scarico trattate e non trattate, acque superficiali, interstiziali o estratti acquosi, viene utilizzato tra le diluizioni un fattore di separazione pari a 2. In funzione dello scopo del test e dei requisiti statistici riguardanti i risultati, sono appropriati anche altri schemi di diluizioni con concentrazioni in serie geometriche o logaritmiche.</p>		

		Si vedano gli esempi in allegato B e F della norma.		
<u>3.5 Saggio limite</u>	Non presente	Se il metodo specificato nella ISO è utilizzato per saggiare le sostanze chimiche, si può eseguire un saggio limite a 100 mg/L o a concentrazione più bassa a cui la sostanza è solubile o è in dispersione stabile nelle condizioni del test. Se fornisce un'informazione utile, il saggio limite può essere eseguito anche a concentrazioni superiori a 100 mg/L purché la sostanza sia solubile o in dispersione stabile. Il saggio limite viene eseguito utilizzando 20 daphnie suddivise in 4 repliche di 5 (e uguale numero nel gruppo di controllo) Se, alla fine del test, la percentuale di immobilizzazione supera il 10 % si deve eseguire uno studio completo. Qualunque comportamento anomalo deve essere registrato.	Allo scopo di dimostrare che il valore di EC ₅₀ si colloca al di sopra si può eseguire con la sostanza di prova un saggio limite a 100 mg/L o fino al suo limite di solubilità, utilizzando 20 daphnie suddivise in 4 gruppi di 5 (uguale numero nel gruppo/i di controllo). Se si verifica immobilizzazione si deve eseguire uno studio completo. Ogni comportamento anomalo deve essere registrato.	
<u>3.6 Breve descrizione della procedura del saggio definitivo</u>	3.6.1 Metodo A - Valutazione dell'EC50 Individuato, mediante prova preliminare, l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva e sono preparate soluzioni del prodotto da esaminare (punto 3.4.1 e 3.4.2). In ogni contenitore (50 ml di soluzione di prova) sono trasferiti i neonati di <i>Daphnia</i> (5/replica; 20/concentrazione) utilizzando una pipetta in vetro (diam. interno 3-5 mm) con bulbo elastico per l'aspirazione. Per non danneggiare gli animali i trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua	Preparare le soluzioni di prova (punto 3.4) unendo specifiche quantità di SM e di acqua di diluizione per ottenere le concentrazioni stabilite per il saggio definitivo. Inserire i contenitori di prova in una camera a temperatura controllata per portare le soluzioni di prova alla temperatura di 20 ±2 °C. Trasferire gli organismi di prova (punto 1.3) nei contenitori di prova utilizzando una micropipetta, minimizzando quanto più possibile il volume di acqua di diluizione che accompagna il trasferimento, e rilasciandoli sotto la superficie del liquido. Il controllo deve avere un volume di acqua di diluizione uguale al volume delle soluzioni di prova. Se viene utilizzato un solvente per solubilizzare o disperdere le sostanze, preparare un secondo controllo con l'acqua di	Riempire i contenitori di prova con la quantità corretta di acqua di diluizione e SM 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. Successivamente collocare nei contenitori i neonati di <i>Daphnia</i> (punto 1.3). 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. Durante il saggio i contenitori non devono essere aerati. Gli organismi sono esposti per 48 ore. Per le condizioni di incubazione si veda punto 1.4. Ogni contenitore di prova deve essere	

			controllato per verificare l'immobilizzazione delle daphnie dopo 24 e dopo 48 h dall'inizio	
	<p>aspirato con le <i>daphniae</i> al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Per una distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le <i>daphnie</i> pipettate nei diversi recipienti, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.</p> <p>A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.</p> <p>Per le condizioni di esposizione si veda punto 1.4.</p> <p>Al termine di 24 h e, se necessario, con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili, cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.</p> <p>Il saggio va ripetuto, se, al termine delle 24 h, nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano il 10% o, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'O₂ risulta < 2 mg/L.</p> <p>Con i dati raccolti può essere calcolata la EC_{50-24h} (in mg/L o in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. (si veda punto 4.1)</p> <p>Il saggio può essere prolungato per la valutazione dell'EC₅₀ a 48 h. A tal fine le soluzioni di prova deve essere rinnovate (ricorrendo nel caso di un effluente al campione refrigerato). In esse sono trasferiti con le stesse cautele</p>	<p>diluizione contenente il solvente alla massima concentrazione utilizzata.</p> <p>Per le condizioni di esposizione si veda punto 1.4</p> <p>Alla fine del periodo di prova di 24 h o 48 h, contare il numero di <i>Daphnia magna</i>. immobili in ogni recipiente. Sono considerati immobili gli organismi che non riescono a nuotare dopo un lieve scuotimento del liquido per 5 s, anche se riescono ancora a muovere le antenne.</p> <p>Al termine della prova, misurare la concentrazione di ossigeno disciolto (OD) nei contenitori del controllo e in quelli con la concentrazione più alta testata (se necessario raccogliere il contenuto delle 4 repliche in un solo contenitore facendo attenzione a non modificare la concentrazione di OD). Se l'O_{2d} alla massima concentrazione testata risulta inferiore a 2 mg/L, misurare l'O_{2d} in altri contenitori di prova per controllare che abbiano una concentrazione di almeno 2 mg/L. Ogni replica con una concentrazione di OD < 2 mg/L non sarà considerata nei calcoli finali.</p> <p>Misurare almeno le concentrazioni massima e minima della sostanza di prova all'inizio e alla fine del saggio. I risultati dovranno basarsi sulle concentrazioni misurate. Tuttavia se vi sono dati in grado di dimostrare che per tutta la durata del saggio la concentrazione di sostanza di prova si è mantenuta entro ±20% della concentrazione nominale o iniziale rilevata, i risultati potranno basarsi anche sui valori nominali o iniziali misurati.</p>	<p>del saggio. Oltre all'immobilità è necessario riferire su qualsiasi comportamento o aspetto anomali.</p> <p>Devono essere eseguiti i seguenti controlli:</p> <p>A. misura dell'OD e del pH all'inizio e alla fine della prova nel/nei controllo/i e alla concentrazione più elevata di sostanza di prova. La concentrazione di OD deve risultare ≥ 3 mg/L alla fine del saggio (criterio di validità della prova). Il pH non deve in genere variare di oltre 1,5 unità in ciascun saggio effettuato.</p> <p>B. registrazione della temperatura dei contenitori di controllo o nell'aria ambiente in maniera continua durante il saggio o almeno all'inizio e alla fine di esso.</p> <p>C. misura delle concentrazioni massima e minima della sostanza di prova all'inizio e alla fine del saggio. I risultati dovranno basarsi sulle concentrazioni misurate. Tuttavia se vi sono dati in grado di dimostrare che per tutta la durata del saggio la concentrazione di sostanza di prova si è mantenuta entro ±20% della concentrazione nominale o iniziale rilevata, i risultati potranno basarsi anche sui valori nominali o iniziali misurati.</p>	

	<p>indicate prima, gli organismi già esposti per le prime 24 h.</p> <p><u>3.6.2 Metodo B – Accettabilità di un effluente</u></p> <p>Regolare la temperatura del campione di effluente (punto 3.4.2) alla temperatura di 20±1°C prima del suo trasferimento nei contenitori di prova.</p> <p>Trasferire i neonati (10/replica per l'effluente e per il controllo) in modo da non danneggiare gli animali come descritto al punto 3.6.1. A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.</p> <p>Per le condizioni di esposizione si veda punto 1.4.</p> <p>Al termine di 24 h si contano gli organismi immobili come al punto 3.6.1. Il saggio va ripetuto, se → punto 3.6.1</p> <p>Il nuovo saggio dovrà essere allestito cambiando il liquido in esame oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazioni che non diano luogo a turbolenze o altri inconvenienti dannosi per gli animali.</p> <p>Valutazione dei risultati</p> <p>Se, dopo 24 h, la somma degli organismi immobili nelle 3 repliche del campione in esame è:</p> <p><50% → il campione è accettabile</p> <p>≥ 50% → il campione è inaccettabile</p> <p>Per <u>effluenti che recapitano in fognatura</u>, se la percentuale di organismi immobili è ≥80% il campione è inaccettabile.</p>			
<p><u>3.7 Criteri di validità del</u></p>	<p>Valido per metodo A e B</p>	<p>I risultati sono da considerarsi validi se alla fine della prova risultano soddisfatte le seguenti</p>	<p>Ai fini della validità del saggio si applicano i seguenti criteri:</p>	<p>I metodi APAT-IRSA e OCSE si</p>

<p><u>saggio</u></p>	<p>Il saggio va ripetuto se, al termine delle 24 h:</p> <p>a) nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%</p> <p>b) in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione OD risulta ≤ 2 mg/L.</p>	<p>condizioni:</p> <p>a) la percentuale di immobilizzazione nei controlli $\leq 10\%$</p> <p>b) l'EC50 24 h del bicromato di potassio è compresa nell'intervallo 0.6 mg/L - 2,1 mg/L.</p>	<p>Alla fine della prova:</p> <p>a) la percentuale di immobilizzazione nei controlli $\leq 10\%$ (compreso il controllo contenente l'agente di solubilizzazione)</p> <p>b) concentrazione dell'OD ≥ 3 mg/L nei controlli e alla massima concentrazione utilizzata.</p>	<p>assomigliano come criteri di validità, anche se la concentrazione limite di O_{2d} è differente. Solo il metodo ISO inserisce la prova con bicromato come criterio di validità.</p>
----------------------	---	--	---	--

<p><u>4.1 Calcolo dell'EC50</u></p>	<p>Con i dati raccolti nella prova a 24 h può essere calcolata l'EC50 24 h (in mg/L oppure in % di diluizione) e con i rispettivi limiti fiduciali.</p> <p>Sono proposti 3 metodi di calcolo:</p> <p>1. Metodo semplificato di Litchfield e Wilcoxon è una procedura semi-grafica che consente di calcolare anche i limiti di confidenza al 95%.</p> <p>E' richiesto che i risultati comprendano almeno due effetti parziali diversi da immobilizzazione 0% e 100% (può fornire una stima della EC50 e dei limiti di confidenza anche con u solo risultato parziale).</p> <p>2. Metodo della media geometrica. Si utilizza in assenza di risultati parziali utilizzando la massima concentrazione che non ha causato alcuna immobilizzazione (0%) e la minima concentrazione che ha causato la completa immobilizzazione degli organismi (100%).</p> <p>3. Analisi dei probits.</p> <p>Richiede che vi siano risultati intermedi tra 0% e 100% di immobilizzazione. È proposto come programma per PC con sistema operativo DOS versione 3.0 e</p>	<p>Alla fine del periodo di esposizione, calcolare, per ogni concentrazione, la percentuale di immobili in relazione al numero totale di organismi utilizzati (20).</p> <p>I metodi statistici per la determinazione dell'EC50 proposti sono: analisi dei probit, della media mobile, metodi binomiale o di stima grafica su diagramma logaritmico di Gauss.</p> <p>In appendice B alla norma "Esempio di determinazione grafica..."</p> <p>Se i dati sono insufficienti o il calcolo dell'EC50 non è richiesto, calcolare almeno la concentrazione minima che provoca un'immobilizzazione del 100% e la concentrazione massima che non provoca alcun effetto (0% di immobilizzazione)</p>	<p>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 <i>probit</i> ecc.) per calcolare l'andamento delle curve e la EC50 con limiti di affidabilità del 95 % (p = 0,05) (7) (8).</p> <p>Se non è possibile applicare ai dati ottenuti i metodi standard di calcolo della EC50, come valore approssimativo per la EC50 devono essere utilizzate la concentrazione massima che non causa immobilizzazione (0%) e la concentrazione minima che causa l'immobilità totale (100 %) (il valore è dato dalla media geometrica di queste due concentrazioni).</p>	
-------------------------------------	---	--	--	--

	successiva.			
<u>4.2 Rapporto di prova</u>	Non presente	<p>Il rapporto di prova deve includere le seguenti informazioni:</p> <p>a) il metodo e il riferimento alla norma utilizzata;</p> <p>b) tutte le informazioni per la completa identificazione del campione originale (prima del trattamento) o della sostanza chimica sottoposta a prova;</p> <p>c) i metodi di preparazione del campione, in particolare:</p> <p>1) per effluenti, acque, eluati e estratti: il metodo e la durata di conservazione dei campioni, il pH, la concentrazione dell'ossigeno disciolto del campione originale, e se presenti, le condizioni di decantazione, filtrazione o centrifugazione del campione e gli eventuali aggiustamenti di pH effettuati</p> <p>2) per sostanze chimiche: il metodo di preparazione della soluzione madre e delle soluzioni di prova;</p> <p>d) tutte le informazioni di tipo chimico, fisico e biologico relative alla prova stabilite nella UNI EN ISO 6341 inclusa l'origine e l'età della coltura di <i>D. magna</i> utilizzata;</p> <p>e) i risultati della prova come EC50 24h o 48h, il metodo di calcolo, e, se possibile, i limiti di confidenza al 95%; nel caso di analisi chimica delle sostanze, il metodo utilizzato;</p> <p>f) i risultati del saggio limite, se condotto;</p> <p>g) la concentrazione minima testata corrispondente al 100% di immobilizzazione e la concentrazione massima testata corrispondente allo 0% di immobilizzazione in 24 o 48 h;</p> <p>h) ogni comportamento anomalo di <i>Daphnia magna</i> nelle condizioni di prova (per esempio letargia, galleggiamento sulla superficie, rotazione anomala o circuitazione);</p> <p>i) tutti i dettagli operativi non specificati in questa</p>	<p>Il rapporto di prova deve includere le seguenti informazioni:</p> <p><u>Sostanza di prova:</u></p> <p>A. natura fisica e caratteristiche fisico-chimiche,</p> <p>B. dati che ne consentano l'identificazione chimica, compresa la purezza.</p> <p><u>Specie sottoposte al saggio:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> origine e specie di <i>Daphnia</i>, fornitore (se noto) e condizioni di coltura utilizzate (inclusa la fonte, il tipo e la quantità di alimento e la frequenza di alimentazione). <p>Condizioni di prova</p> <ul style="list-style-type: none"> descrizione dei contenitori utilizzati per il saggio (tipo, volume soluzione, n° daphnie/contenitore, repliche/concentrazione) metodi di preparazione SM e soluzioni di prova (anche impiego di solventi, agenti di dispersione, concentrazioni utilizzate) informazioni sull'acqua di diluizione (provenienza, caratteristiche, composizione dell'AR) condizioni di incubazione: temperatura, intensità luminosa, periodicità esposizione luce, OD, pH. <p>Risultati</p> <ul style="list-style-type: none"> Numero e percentuale di daphnie immobilizzate o che 	

		norma e gli eventuali “incidenti” che possono avere influenzato i risultati;	<p>hanno mostrato effetti negativi (compreso comportamento anomalo) nel controllo e in ogni gruppo di trattamento, per ogni tempo di osservazione e descrizione degli effetti osservati.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Risultati e data del saggio eseguito con il tossico 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 di prova (indicare anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione). • Tutte le misurazioni fisico-chimiche di temperatura, 	
		<p>j) i risultati ottenuti con il tossico di riferimento e la data del test;</p> <p>k) i dati che dimostrino che i criteri di validità sono soddisfatti;</p> <p>l) nome e indirizzo del laboratorio di prova, i soggetti che hanno eseguito il test, e la persona che ha approvato il rapporto di prova.</p>	<p>pH e OD svolte durante il saggio</p> <ul style="list-style-type: none"> • EC50-48 h per l'immobilizzazione con intervalli di affidabilità e grafici del modello utilizzato per il calcolo, andamento delle curve dose-risposta ad es: procedimenti statistici utilizzati. • questi stessi dati devono essere riportati anche per l'immobilizzazione a 24 h, se misurati. <p>Spiegazione delle eventuali deviazioni rispetto al metodo di prova con indicazione dell'eventuale incidenza della deviazione sui risultati ottenuti nel saggio</p>	

