



Regolamento REACH: implementazione  
dei metodi C1, C13, C14 e C15  
(CE 440/2008) sui pesci, utilizzando la  
specie autoctona *Dicentrarchus labrax*  
(L.1758)

S. Balzamo, D. Conti

ISPRA

Servizio di Metrologia Ambientale



# REACH

## Art. 1

Il presente regolamento ha lo scopo di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e **dell'ambiente** inclusa la promozione di metodi alternativi per la valutazione dei pericoli che le sostanze comportano, nonché la libera circolazione di sostanze nel mercato interno rafforzando nel contempo la competitività e **l'innovazione**.



# REACH

## *Articolo 13*

In particolare per quanto riguarda la tossicità umana, le informazioni sono acquisite, ove possibile, ricorrendo a mezzi diversi dai test su animali vertebrati, attraverso l'uso di metodi alternativi, ad esempio metodi in vitro o modelli di relazioni qualitative o quantitative struttura-attività o dati relativi a sostanze strutturalmente

# REACH – Test con i pesci

1. Per la registrazione delle sostanze fabbricate o importate in quantitativi uguali o superiori a 10 tonnellate
  - **prove di tossicità acuta (o eventualmente prolungata se lo ritiene il dichiarante) con pesci**
2. Per la registrazione delle sostanze fabbricate o importate in quantitativi uguali o superiori a 100 tonnellate
  - **prove di tossicità prolungata con pesci**
  - **prove di tossicità su pesci nelle prime fasi di vita (fels)**
  - **prove di tossicità a breve termine su pesci nelle fasi embrionali e di avannotto**
  - **prove di accrescimento su pesci in fase giovanile**
3. Per l'identificazione delle sostanze PBT e vPvT
  - **prove di bioaccumulo nei pesci (anche se non specificato, si parla infatti di specie acquatiche)**



# REACH – Test con i pesci

Con l'**entrata** in vigore del regolamento REACH ci si aspetta che la necessità di produrre dati di tossicità per moltissime sostanze chimiche porterà ad un aumento considerevole **dell'uso** di animali.

Il Medical Research Council Institute for Environment and Health (IEH) affermava nel 2006 che solo per valutare 30,000 sostanze chimiche saranno necessari 12.8 milioni di vertebrati tra cui 8.4 milioni di mammiferi e **4.4 milioni di pesci**. Nel 2009, considerato il numero di preregistrazioni, è stato calcolato che dovrebbero essere sacrificati **10,3 milioni di pesci** e 30 milioni di vertebrati. (Leist et al.2009)



# I pesci

- ✓ Lunga storia evolutiva
- ✓ Ampio spettro adattativo
- ✓ Dinamiche biochimiche e cellulari da vertebrato
- ✓ Ubiquità acquatica
- ✓ Ampie conoscenze biologiche
- ✓ Appartengono alle alte catene trofiche
- ✓ Acquacultura → saggi ecotossicologici
- ✓ Sistema di allerta per i pericoli sulla salute umana
- ✓ Esposizione diretta (branchie, epitelio) ai tossici



# I metodi di prova previsti per le specie ittiche – Tossicità a breve termine

- C1 - *Tossicità acuta con pesci (linea guida OCSE n. 203 “ Fish, Acute Toxicity Test);*
- C15 - *Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino (Regolamento CE n. 440/2008) (linea guida OCSE n. 212 “ Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages”).*



# I metodi di prova previsti per le specie ittiche – Tossicità a lungo termine

- C14 - *Test sulla crescita dei pesci giovani (linea guida OCSE n. 215 “ Fish, Juvenile Growth Test);*



# I metodi di prova previsti per le specie ittiche – Bioconcentrazione

Bioconcentrazione: processo di accumulo di sostanze chimiche direttamente **dall'acqua** negli organismi acquatici (attraverso branchie, tessuti epiteliali, ingestione di cibo)

*C13 - Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo (linea guida OCSE n. 305 “ Bioconcentration: Flow-through Fish Test);*



# Requisiti delle specie utilizzate nei saggi di tossicità

- ✓ essere preferibilmente autoctone
- ✓ avere rilevanza ecologica
- ✓ disponibili durante la maggior parte dell'anno
- ✓ facilmente allevabili e/o reperibili
- ✓ facili da manipolare e mantenere in laboratorio
- ✓ Sensibili ai composti tossici
- ✓ sperimentate in ambito ecotossicologico e/o specificamente indicate in protocolli normati a livello nazionale o internazionale (metodi convalidati)



# Caratteristiche degli organismi dei saggi

- ✔ Essere sani
- ✔ Avere comportamento normale
- ✔ Essere appropriatamente alimentati
- ✔ Essere della stessa specie, classe ed età
- ✔ Presentare bassa o nulla mortalità nei controlli



# Scopo del progetto ISPRA (1)

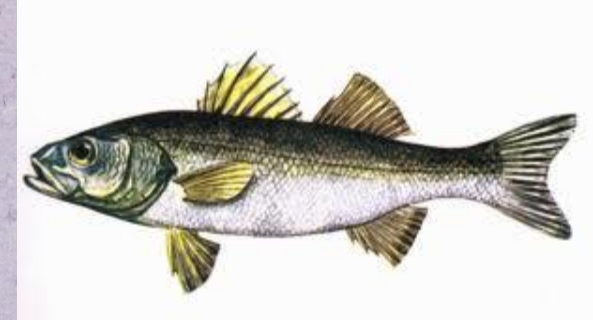
Al fine di disporre di una specie autoctona per l'applicazione dei metodi di prova richiesti dal Regolamento REACH, il progetto si propone di inserire nei metodi OCSE C1, C13, C14 e C15 (CE 440/2008), la specie mediterranea *Dicentrarchus labrax* (*D. Labrax*) tra quelle idonee per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici con pesci.



## Scopo del progetto ISPRA (2)

**In particolare, ci si propone di richiedere all'OCSE la revisione delle linee guida n 203 (test acuto) e n.215 (crescita nei pesci giovani) relativamente all'inserimento della specie "D. Labrax" per l'esecuzione dei saggi di tossicità relativi.**





## Dicentrarchus *Labrax*

- Specie menzionata nell'Allegato 2 al metodo C13, in nota alla tabella delle specie raccomandate.
- Per ottenere tale inserimento i diversi metodi citati devono essere convalidati utilizzando sia un organismo di riferimento che il *D. Labrax*.

# Dicentrarchus *Labrax*: caratteristiche

- ✓ Diffusione mediterranea
- ✓ Facile reperibilità in impianti di piscicoltura italiani (con certificazione ISO 9001)
- ✓ Specie eurialina
- ✓ **Fisiologia e biologia riproduttiva** nota
- ✓ Facile da allevare
- ✓ **Buona sensibilità della specie**
- ✓ Ampiamente utilizzata in saggi ecotossicologici a livello nazionale ed europeo



# Partner

- ISPRA
- Laboratorio ittiotossicologico ARPA ER  
Sezione provinciale di Ferrara:
  - P.Trentini
  - F.Gelli
  - F.Savorelli
- Università Tor Vergata - Roma





# Fasi fondamentali del progetto (1) preliminare

- Individuazione dei laboratori (ARPA, Università, CNR, ENEA, ISS) presenti sul territorio nazionale, con competenze nell'ambito della ittiotossicità, per l'esecuzione degli interconfronti per la convalida dei metodi.

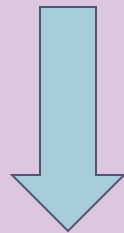


# Fasi fondamentali del progetto (2)

## Autorizzazione laboratorio pesci (ISPRA Castel Romano)

Autorizzazione alla ASL:

parere igienico – sanitario per la stabulazione a fini  
sperimentali o scientifici



- Relazione tecnico-strutturale dell'impianto (riferimento al D.Lgs.116/92)
- Procedura dei saggi
- Planimetria dei laboratori e destinazione d'uso dei locali
- Procedura di smaltimento degli organismi di saggio

## Autorizzazione al Ministero della Salute

- ✓ registro su cui vengono annotati i movimenti degli animali utilizzati negli esperimenti
- ✓ veterinario responsabile
- ✓ planimetria dei laboratori e destinazione d'uso dei locali
- ✓ linee guida della Raccomandazione 2007/526/CE (G.U: dell'Unione Europea n. 197 del 30/07/2007) per il benessere degli animali.



# Fasi fondamentali del progetto (3)

## Percorso di revisione delle Linee guida presso OCSE

- Ampliamento Ricerca di partner europei dell'area mediterranea interessati al progetto
- Ricerca bibliografica per la definizione dello stato dell'arte sulla specie proposta
- Compilazione del SPSF (Standard Project Submission Form)
- Definizione del piano di lavoro e delle risorse necessarie per ognuna delle 2 linee guida



# Fasi fondamentali del progetto (3)

## Percorso di revisione delle Linee guida presso OCSE OCSE

- **Normative che richiedono l'effettuazione dei saggi da rivedere**
- **Definizione del protocollo da proporre all'OCSE**
- **Dati di convalida dei metodi proposti**
- **Considerazioni sul benessere degli animali utilizzati**



# Fasi fondamentali del progetto (4)

## Convalida dei metodi

- Studio collaborativo nazionale per la convalida del metodo C1 con specie *D. Labrax*
- Studio collaborativo nazionale per la convalida del metodo C14 con *D. Labrax*





Grazie per l'attenzione e

Buone Feste!