

# “FISH EMBRYO TOXICITY TEST (FET)”: POTENZIALE ALTERNATIVA AL TEST ACUTO SU PESCI

di I. Lacchetti <sup>a</sup>, C. Di Paolo <sup>b</sup>, P.M.B. Gucci <sup>c</sup>, M. Carere <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [ines.lacchetti@iss.it](mailto:ines.lacchetti@iss.it)

<sup>b</sup> RWTH Aachen University (Germany) - [Carolina.DiPaolo@bio5.rwth-aachen.de](mailto:Carolina.DiPaolo@bio5.rwth-aachen.de)

<sup>c</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [paola.gucci@iss.it](mailto:paola.gucci@iss.it)

<sup>d</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [mario.carere@iss.it](mailto:mario.carere@iss.it)

---

**Abstract** - L'impiego del test acuto su pesci adulti, previsto attualmente sia dal Regolamento Europeo REACH che dalla normativa sulla classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14, presenta indubbe difficoltà applicative ed etiche.

L'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Università di *Aachen* (Germania) ha avviato studi di ricerca e applicazione sperimentale con lo scopo di verificare una alternativa a tale test tra quelli attualmente normati OECD. Pertanto è stato individuato il “Fish Embryo Toxicity (FET) Test”, che utilizza embrioni della specie *Danio rerio* e riconosciuto nella norma OECD n. 236, quale valida e fattibile alternativa al saggio su pesci adulti.

Keywords: metodi alternativi, rifiuti, Fish Embryo Toxicity Test, *zebrafish*, embrione.

## **Premessa**

L'impiego del test acuto sui pesci è previsto attualmente sia dal Regolamento Europeo REACH, dove viene inserito tra i biosaggi per la valutazione dell' ecotossicità acquatica di sostanze chimiche, sia dalla recente normativa sulla classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14 (ecotossico per l'ambiente). Il test prevede l'utilizzo dell'organismo adulto, ciò in contrasto, tuttavia, con quanto indicato dalla Direttiva Europea 2010/63/EU sulla protezione degli animali usati a fini sperimentali, recepita in Italia con il D. Lgs n. 26 del 4 marzo 2014.

Nell'ambito di tali normative l'inserimento del test acuto sui pesci adulti non trova, inoltre, ampio consenso dalla maggior parte dei laboratori addetti ai controlli su territorio nazionale in considerazione delle indubbe difficoltà applicative. Tale test necessita infatti di ampi spazi, di apparecchiature adeguate e/o strutture idonee, nonché lo smaltimento di ingenti volumi di scarti prodotti, potenzialmente tossici, ad esempio per quanto concerne le analisi sulla caratterizzazione dei rifiuti.

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con l'Università di Aachen (Germania) ha avviato studi di ricerca e applicazione sperimentale con lo scopo di individuare una alternativa al test acuto sui pesci adulti, senza rinunciare, tuttavia, all'informazione essenziale e indispensabile che questi vertebrati forniscono nelle valutazioni sia di tipo ecotossicologico che sanitario, in relazione al ruolo chiave che essi occupano nella rete trofica. Contemporaneamente si è cercato un test che potesse fornire un supporto concreto alla ricerca di soluzioni pratiche per lo svolgimento di un saggio applicabile dalla maggior parte dei laboratori senza la necessità di particolari e costosi equipaggiamenti.

### ***Fish Embryo Toxicity (FET) Test***

La ricerca è stata, pertanto, indirizzata verso i test attualmente normati OECD condotti sui pesci (tabella 1), in particolare è stato selezionato il "Fish Embryo Toxicity (FET) Test" OECD n. 236, che risulta infatti essere l'unica norma ad utilizzare l'embrione nelle sue primissime fasi e che, per l'incapacità di alimentarsi indipendentemente, non è pertanto considerato tra le forme vitali protette. Il FET utilizza la specie ittica *Danio rerio*, nota come "zebrafish", vertebrato considerato "organismo modello" sia in campo biochimico che ecotossicologico; il suo genoma, inoltre, è stato completamente descritto e risulta effettivamente simile a quello umano.

*Tabella 1. Linee-guida OECD relative ai test ecotossicologici su pesci (ultime revisioni)*

<b>OECD N.</b>	<b>Linee guida</b>	<b>Procedure operative</b>
<b>203</b> 17/07/1992	Fish Acute Toxicity test	7 pesci/concentrazione 1g/L - in vasche 96 ore
<b>204</b> 04/04/1984	Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study	10 pesci /concentrazione 1g/L - in vasche 14 gg
<b>210</b> 26/07/2013	Fish early-life stage toxicity test	80 uova/ concentrazione 0.5 - 5g/L - in vasche 30 gg
<b>212</b> 02/09/1998	Fish short term toxicity test on embryo and sac-fry stages	30 uova/ concentrazione 0.5 - 5g/L - in vasche 8-50 gg
<b>215</b> 21/01/2000	Fish, juvenile growth test	10 pesci/ concentrazione 5 - 10 pesci/L - in vasche 28 gg
<b>229</b> 02/10/2012	Fish short term reproduction assay	24 pesci/ concentrazione 5g/L - in vasche 21 gg
<b>230</b> 07/09/2009	21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	20 pesci/ concentrazione 5g/L - in vasche 21 gg
<b>234</b> 28/07/2011	Fish Sexual Development Test	120 uova/ concentrazione in vasche 60 gg
<b>236</b> 26/07/2013	<b>Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test</b>	<b>20 uova/ concentrazione in piastre multipozzetto 96 ore</b>

In Europa il FET, viene utilizzato per testare farmaci, pesticidi e prodotti chimici; in Germania, già dal 2005, è stato reso obbligatorio per la sorveglianza delle acque reflue urbane ed industriali (DIN 38415-6).

Tale saggio è stato scelto e utilizzato anche nell'ambito del progetto Marie Curie "Eda Emerge", coordinato e condotto dai più importanti istituti europei tra cui la Commissione Europea (Joint Research Center) con lo scopo di approfondire la complessità della contaminazione ambientale da parte di inquinanti emergenti.

Il FET viene altresì richiamato nell'allegato del "*Technical report on aquatic effect-based monitoring tools*", documento elaborato su mandato della Commissione Europea dal gruppo di esperti europeo CMEP (Chemical Monitoring and Emerging Pollutants), coordinato anche dal Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'ISS con lo scopo di presentare lo stato dell'arte sugli strumenti "*effect-based*" di monitoraggio nell'ambito della strategia di implementazione comune della Direttiva Quadro Acque.

### ***Materiali e metodi***

Il FET è stato allestito in laboratorio con lo scopo di verificarne la sua fattibilità ed è stato pertanto condotto su campioni di rifiuti con caratteristiche chimiche differenti.

Il principio del FET si basa sull'esposizione di singole uova di *Danio rerio* poste in piastre da 24 pozzetti per valutare l'eventuale embriotossicità del campione.

Il test, che deve iniziare entro 90 minuti dalla fecondazione delle uova, viene condotto su cinque concentrazioni del campione. È previsto l'allestimento anche di un controllo positivo per ogni gruppo di uova utilizzate impiegando, come tossico di riferimento, la 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) alla concentrazione di 4 mg/L. Le piastre multipozzetto, contenenti 20 uova per ciascuna concentrazione, vengono incubate a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con ciclo luce-buio per 96 ore.

Eventuali malformazioni dell'embrione vengono registrate attraverso l'osservazione ogni 24 ore di quattro distinti endpoint:

- a) **coagulazione dell'embrione** - può verificarsi anche entro poche ore dall'inizio dell'esposizione e indica un effetto tossico acuto generico;
- b) **la mancanza di formazione del somite** - il somite dovrebbe essere visibile dopo 12 ore dalla fecondazione; se assente, l'embrione non si svilupperà ulteriormente determinandone quindi la morte;
- c) **il mancato distacco della coda** - il distacco della coda dal tuorlo si osserva dopo 24 ore dalla fecondazione, indicando la normale crescita dell'embrione;
- d) **assenza di battito cardiaco** - il battito è facilmente rilevabile dopo 30 ore dalla fecondazione, la sua assenza indica la morte dell'embrione;

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta è determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate, ed espressa come LC50.

Per l'allevamento degli organismi riproduttori, sono stati scelti acquari da 60 litri facilmente reperibili in commercio, equipaggiati di 30 individui ciascuno in rapporto 3:1 maschi:femmine.

Poiché la deposizione delle uova avviene alle prime ore del giorno, gli acquari sono stati posti in una camera climatizzata al buio e collegati ad un temporizzatore per l'accensione delle lampade in modo da stimolare la deposizione delle uova all'orario più idoneo per l'operatore. Sono state provate diverse tipologie di "trappole" per la cattura delle uova con lo scopo di ottenerne un maggior numero, contestualmente a una minore difficoltà operativa. L'alimentazione seguita e le caratteristiche dell'acqua di mantenimento sono descritte in dettaglio nella norma OECD 236 e non presentano particolari complessità operative.

L'intero allestimento del test è avvenuto in un armadio termostato di piccole dimensioni a condizioni di temperatura e luce controllate. La lettura dei 4 endpoint è stata eseguita utilizzando un microscopio a inversione a ingrandimento 80x.

### ***Risultati***

Nella mattina stessa del test, mediante alloggiamento delle trappole sul fondo dell'acquario, è stata possibile la raccolta di circa 150 uova fecondate per ciascuna trappola, permettendo, in tal modo, l'allestimento di più test simultaneamente.

Dai dati ottenuti con il FET non è stato possibile il calcolo della LC50; i risultati conseguiti, riportati in tabella 2, sono stati espressi pertanto come percentuali cumulative di effetto, come previsto dalla norma.

Le percentuali ottenute sia per il controllo negativo che per il controllo positivo (3,4 DCA) rispettano le condizioni richieste per la validità del test.

*Tabella 2. Percentuali cumulative di effetto ottenute per i campioni di rifiuto analizzati*

Campioni	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
Controllo negativo	0%	0%	0%	0%
W-1	5%	10%	20%	55%
W-2	0%	0%	0%	0%
W-3	0%	0%	20%	20%
W-4	0%	5%	5%	5%
W-5	0%	5%	5%	30%
3,4 DCA (4 mg/L)	0%	30%	70%	70%

### ***Discussione e conclusioni***

L'applicazione del FET non ha in definitiva mostrato particolari difficoltà operative, i risultati conseguiti sono stati inoltre incoraggianti poiché le percentuali di effetto ottenute confermano la tossicità attesa dovuta alle caratteristiche chimiche intrinseche dei campioni di rifiuto analizzati.

La scelta del FET da un punto di vista pratico-operativo presenta, rispetto a quello acuto su pesci, numerosi vantaggi che possono essere riassunti come di seguito:

- il tasso di sviluppo embrionale è più rapido se confrontato con l'adulto;
- gli embrioni presentano minori esigenze di crescita e non necessitano di alimentazione per l'intera durata del test;
- lo spazio richiesto per l'allestimento è minore;
- gli scarti prodotti contenuti (circa 200 mL *vs* 200 L);
- i costi e le risorse impegnate sono ridotte;
- il test è in accordo con la Direttiva 2010-63-EU.

È d'uopo considerare, tuttavia, alcune limitazioni ascrivibili al FET come nel caso di ridotta biodisponibilità per sostanze chimiche con  $PM \geq 3kDa$  che, ostacolate dal corion, ne potrebbe precludere o ridurre l'esposizione dopo la schiusa, e la capacità metabolica embrionale dei pesci che non sempre è simile a quella dell'adulto o degli stadi giovanili (es. l'alcool allilico).

Dal Report della Commissione Europea "EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity

Testing” si evince una forte correlazione ( $r=0,9$ ) tra il test su pesci adulti e il FET, dato che gli effetti ottenuti attraverso studi condotti in parallelo su circa 150 sostanze chimiche sono risultati ampiamente sovrapponibili.

Tale saggio, pertanto, può rappresentare una valida alternativa al test acuto su pesci adulti sia per la praticità del metodo sia poiché fornisce analoghe e sovrapponibili informazioni sulla valutazione della tossicità acquatica trasposta a quei livelli trofici più elevati rappresentati dai vertebrati.

### ***Bibliografia***

Belanger S.E., Rawlings J.M., Carr G.J. 2012. An update to the fish embryo toxicity-acute fish toxicity relationship and prospects for support of the use of the FET as an animal alternative. Document prepared for the 2012 OECD *ad hoc* Expert Meeting Group on the Fish Embryo Test. pp. 1- 156

Braunbeck T., Kais B., Lammer E., Otte J., Schneider K., Stengel D., Strecker R. 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications and future. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-014-3814-7

Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.61 del 14-03-2014*

DIN 2001. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Subanimal testing (group T) – Part 6: Toxicity to fish. Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6). DIN 38415-6; German Standardization Organization.

Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20-10-2010*. L. 276/33

EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing. JRC, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014

Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck T.H. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol Part C* 149(2): 196-209.

DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006

RibèV, Nehrenheim E, Odlare M. 2014. Assessment of mobility and bioavailability of contaminants in MSW incineration ash with aquatic and terrestrial bioassays. *Waste Management*. 34: 1871-1876

Validation Report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test, Part I Series on Testing and Assessment N. 157 JTO3306145. ENV/JM/MONO [2011] 37