

PT Batteria di test ecotossicologici
Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test
sessione 1S-E25
Anno 2025

Natura della modifica: Prima emissione		
Redazione	Fabrizio Bandini Elena Morandi Michela Del Pasqua	fbandini@arpae.it emorandi@arpae.it mdelpasqua@arpae.it
Approvazione del report finale	Michele De Gioia	mdegioia@arpae.it
Coordinatore	Fabrizio Bandini	fbandini@arpae.it
Organizzazione e autorizzazione all'emissione del report finale	Stefano Forti	sforti@arpae.it

INDICE

Premessa	3
1. Riservatezza	4
2. Campioni oggetto di prova valutativa	4
3. Preparazione dei campioni oggetto di prova valutativa	4
4. Consegna dei campioni al corriere	4
5. Ricevimento dei risultati	5
6. Verifica dell'omogeneità e della stabilità	5
7. Elaborazione statistica dei risultati	7
8. Discussione	10

Premessa

Cari colleghi,

vi ringraziamo per la partecipazione e l'interesse dimostrato per il Proficiency Test – Batteria di test ecotossicologici - Anno 2025 sessione 1S-E25: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test - Linea Guida OECD 236:2013.

Complessivamente 15 laboratori tra pubblici e privati si sono iscritti all'interconfronto e, di questi, 13 laboratori hanno inviato i risultati.

Si tratta del secondo interconfronto che ha come oggetto il test FET: il precedente è stato svolto nel 2023 su un campione preparato dai partecipanti.

La presente sessione ha previsto, invece, l'invio ai partecipanti di un campione già pronto: ciascun oggetto del PT era composto da una soluzione in acqua ISO di NaCl alla concentrazione di 20 gr/l. Il numero di risultati ricevuti nell'anno 2023 è stato di 14, nel presente PT i risultati ricevuti sono stati 13. I laboratori che hanno partecipato ad entrambi gli interconfronti sono 8.

1. Riservatezza

Per l'intera durata dello schema i laboratori partecipanti vengono identificati solo ed esclusivamente tramite un codice numerico (Lab. ID), comunicato ad ogni partecipante tramite e-mail. Il codice identificativo viene attribuito al momento dell'iscrizione alle prove ed è mantenuto per i successivi PT.

Nel caso in cui i risultati di un partecipante debbano essere comunicati a terzi, ciò avviene solo previa conoscenza e autorizzazione scritta del partecipante stesso.

Detta autorizzazione non è prevista nei casi in cui la richiesta provenga da organismi preposti dalla legge; in questo caso l'organizzatore è comunque tenuto a darne comunicazione scritta al partecipante.

2. Campioni oggetto di prova valutativa

La sostanza tossica di riferimento utilizzata nel PT Batteria di test ecotossicologici sessione 1S-E25 è il Sodio Cloruro (NaCl).

Il campione inviato conteneva una soluzione di Sodio Cloruro (NaCl) alla concentrazione di 20 gr/l in acqua di diluizione (vedi par. 6.3 della ISO 6341:2013) identificata come "acqua ISO".

3. Preparazione dei campioni oggetto di prova valutativa

Il PT prevede per ciascun partecipante l'invio di un campione contenente la sostanza tossica di riferimento disciolta in acqua di diluizione (vedi par. 6.3 della ISO 6341:2013) identificata come "acqua ISO".

In base al numero degli oggetti preventivati da preparare ed alla concentrazione scelta, è stata determinata la massa della sostanza tossica da pesare. Quest'ultima è stata aggiunta alla matrice ed adeguatamente omogeneizzata fino alla preparazione delle aliquote che sono state confezionate in appositi contenitori di Polietilene (PE).

4. Consegna dei campioni al corriere

La consegna dei campioni al corriere per la spedizione è avvenuta in data 06/05/2025.

Durante il trasporto i campioni oggetto di prova valutativa sono stati trasportati a temperatura ambiente con consegna prevista entro 24-48 ore. Per 4 laboratori i tempi di consegna hanno superato le 48 ore e, per questi, si è proceduto ad un nuovo invio del campione, la cui consegna è avvenuta nei tempi previsti.

Tutti i partecipanti hanno riportato nel Foglio di restituzione dati che i campioni sono stati consegnati entro 48 ore e in uno stato integro.

5. Ricevimento dei risultati

Per il PT Batteria di test ecotossicologici sessione 1S-E25 il termine ultimo per la consegna dei risultati è stato il 30/06/2025.

Ciascun laboratorio partecipante ha compilato con i risultati analitici il “Foglio di restituzione dati” e lo ha restituito in formato pdf firmato. Nello stesso file sono raccolte anche le altre informazioni sulle modalità di esecuzione del test da parte dei partecipanti.

La riservatezza è garantita dall’esclusività del Foglio excel per ogni partecipante. La tracciabilità del dato è garantita dalla restituzione del file excel in formato pdf firmato dai partecipanti.

6. Verifica dell’omogeneità e della stabilità

Lo studio di controllo dell’omogeneità e della stabilità dei campioni, è stato effettuato in accordo alle indicazioni delle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2023 e ISO 13528:2022

Le analisi di omogeneità e stabilità riguardanti i campioni oggetto del PT sono state eseguite presso il Laboratorio Multisito di Arpae della sede di Ravenna accreditato UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 ed eseguite secondo procedure di prova accreditate (per acque superficiali e di scarico) in condizioni di ripetibilità stretta.

La valutazione dell’omogeneità è stata eseguita sugli oggetti configurati nella forma finale, prima della distribuzione ai partecipanti. Dalla totalità degli oggetti preparati sono stati scelti casualmente n° 10 campioni che sono stati analizzati in doppio prelevando due aliquote da ciascun campione. Il coordinatore del PT ha assegnato a ciascuna aliquota un codice casuale in modo da garantire l’analisi in doppio cieco.

La verifica dell’omogeneità è stata effettuata applicando il test Anova ad una via ($\alpha=0.05$) dopo aver identificato con il test di Cochran ed eliminato dall’analisi eventuali doppi analitici anomali.

I risultati delle analisi, riportati in figura 1, mostrano che tra i campioni analizzati in doppio non c’è una differenza significativa e che quindi gli oggetti del PT sono sufficientemente omogenei.

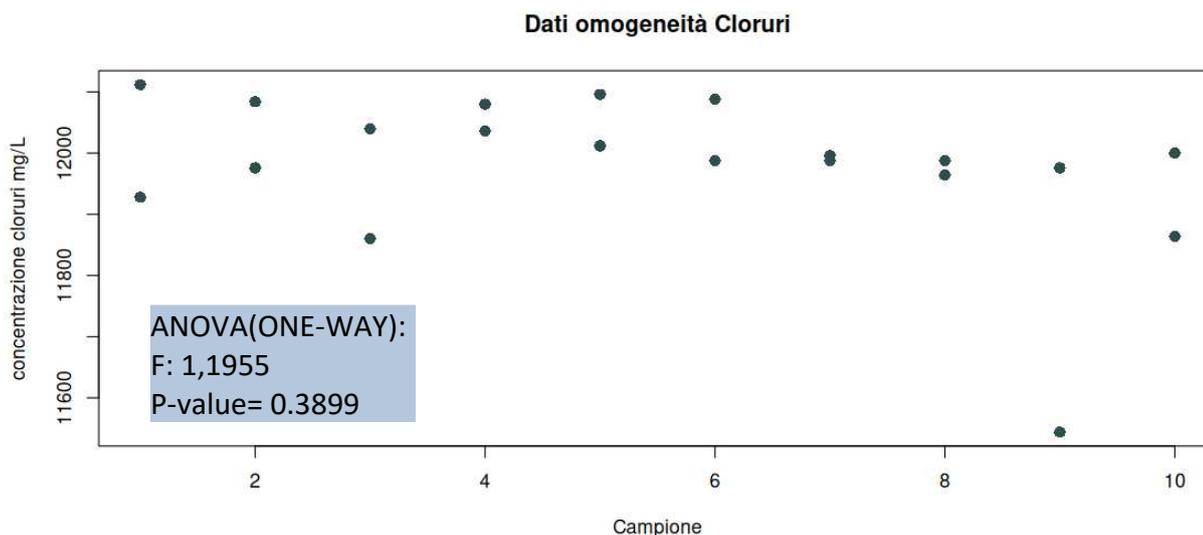


Fig. 1: concentrazioni espresse in mg/l degli ioni Cloruro per le dieci repliche analizzate in doppio. Nel riquadro è riportato il risultato del test ANOVA ad una via (alpha=0.05)

Per la valutazione della stabilità, contestualmente alla spedizione, sono stati selezionati dalla totalità degli oggetti 3 campioni che sono stati analizzati in tre momenti differenti:

- Giorno 1: al momento della spedizione
- Giorno 2: 48 ore dopo la spedizione con conservazione a temperatura ambiente (temperatura di trasporto)
- Giorno 3: nella data coincidente al termine ultimo per la consegna dei risultati, con l'aliquota mantenuta in frigorifero

I campioni sono stati analizzati in doppio prelevando due aliquote da ciascun campione e garantendo l'analisi in doppio cieco in condizioni di ripetibilità stretta.

La stabilità è stata verificata applicando un t-test accoppiato ad una coda con un livello di confidenza pari al 95%.

I risultati di questa analisi, riportati in tabella 1, confermano l'ipotesi che il trasporto a temperatura ambiente, per un tempo massimo di 48 ore, non abbia un effetto significativo sulla stabilità del NaCl in soluzione.

L'analisi della stabilità durante tutto l'arco temporale del PT, dal giorno della consegna al termine ultimo per la restituzione dei dati, durante il quale è prevista la conservazione degli oggetti del PT a temperatura refrigerata, ha evidenziato un aumento del 2,8% della concentrazione dei cloruri. Si ritiene che nonostante l'aumento rilevato sia statisticamente significativo, questo sia all'interno della variabilità dei risultati analitici derivante dal metodo applicato (limite di ripetibilità= 3%).

Tab. 1: Risultati del t-test accoppiato e ad una coda per la verifica della stabilità

Verifica stabilità Cloruri	T-test
Giorno 1- Giorno 2 (stabilità durante il trasporto a T ambiente)	t value: -1.10938 p-value: 0.1914
Giorno 2- Giorno 3 (stabilità durante le prove del PT e conservazione in frigorifero)	t value:-3,07294 p-value: 0,0458

7. Elaborazione statistica dei risultati: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test _Determinazione della 96h%LC₅₀

Per il presente schema 1S-E25 è stato fissato a 13 il numero minimo di partecipanti per poter applicare la statistica robusta tramite l'Algoritmo A (Appendice C.3.1 della ISO 13528:2022) per la stima del valore assegnato come media robusta.

Come stabilito al punto 6.5.2 della norma ISO 13528:2022, l'Algoritmo A è in grado di compensare la presenza di dati anomali fino ad una percentuale non superiore al 20% dell'intera popolazione dei dati.

L'analisi dei dati restituiti dai partecipanti del PT 1S-E25 FET ha identificato come dati anomali (*outliers*) 4 risultati sui 13 totali, corrispondente alla percentuale del 30,8%: non è stato quindi possibile applicare l'Algoritmo A e stimare la media robusta e la deviazione standard robusta.

In presenza di un numero così esiguo di dati, 9 in tutto, le norme di riferimento sconsigliano di calcolare le statistiche prestazionali. La stima del valore assegnato come valore di consenso tra i partecipanti sarebbe di fatto affetta da un'incertezza troppo alta.

In considerazione del fatto, però, che nel presente schema la deviazione standard dell'interconfronto σ_{pt} non dipende dai risultati dei partecipanti ma è pari ad un valore target del 30%, il coordinatore del PT ha valutato di calcolare comunque la performance come z-score :

$$z = (x - x_{pt}) / \sigma_{pt}$$

dove:

x è il risultato di ciascun partecipante

x_{pt} è il valore assegnato calcolato come media dei 9 risultati

σ_{pt} è la deviazione standard dell'interconfronto calcolato come 30% della media

Il valore dello z-score calcolato come sopra descritto ha valore solo indicativo e non si pone l'obiettivo di valutare la prestazione dei partecipanti.

In figura 2 è riportata una descrizione grafica dei risultati ricevuti.

risultati FET 96h%LC50

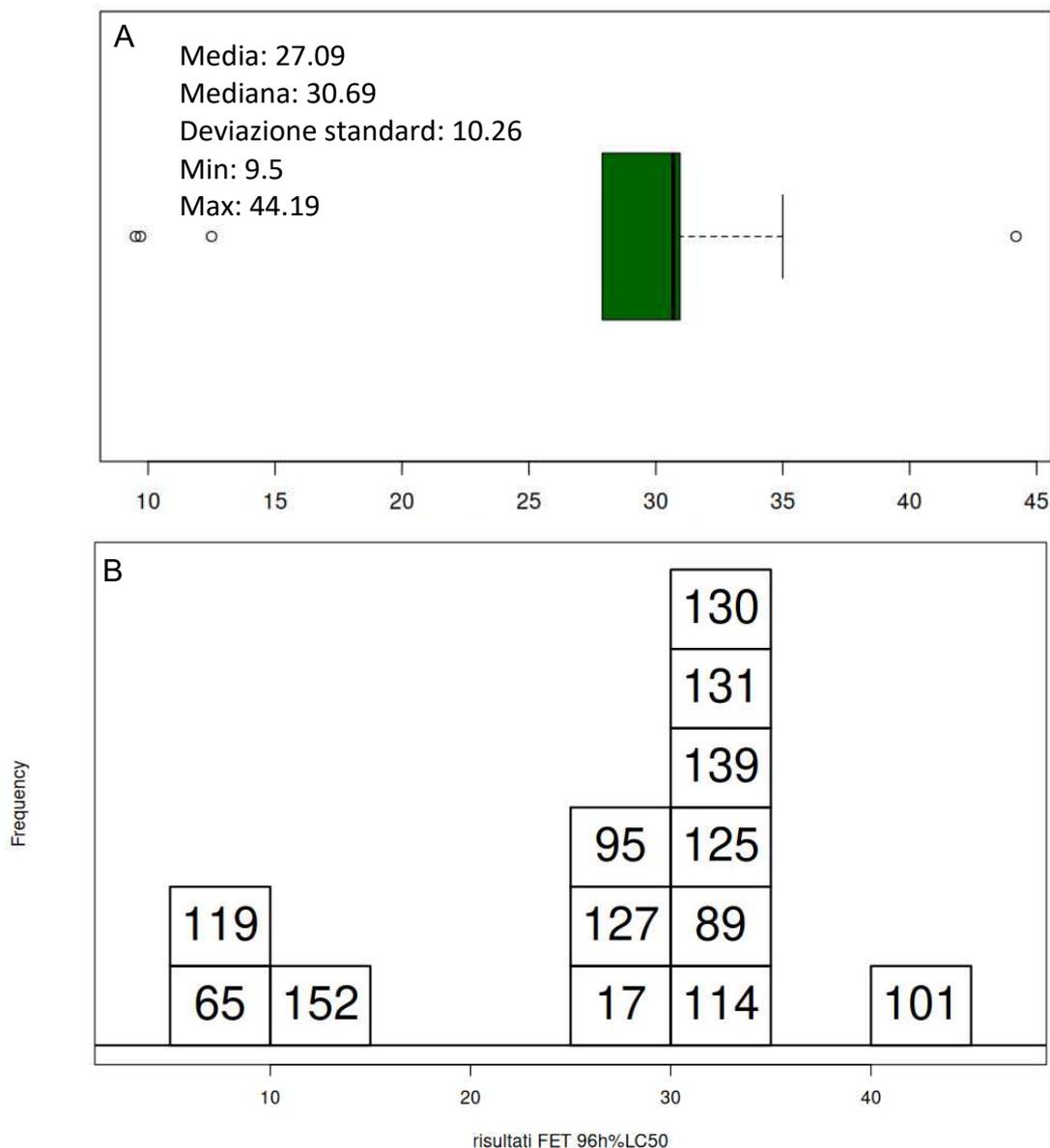


Fig. 2: A: boxplot dei risultati del PT; i pallini rappresentano i dati anomali (*outliers*) - B: Blockplot dei risultati del PT con relativo LabID

Le statistiche descrittive e prestazionali del PT 1S-E25 sono riportate in tabella 2.

Tab 2: statistiche descrittive e prestazionali relative al test Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 96h%LC50. La media, mediana e deviazione standard sono state calcolate sui dati dopo aver rimosso i dati anomali.

Statistiche descrittive	Valore
Numero di risultati	13
Numero di risultati esclusi (errori grossolani)	0
Numero dati anomali (outliers)	4
Percentuale dati anomali (outliers)	30,8 %
Media (senza outliers)	30,69 %
Mediana (senza outliers)	30,78 %
Deviazione standard (senza outliers)	1,912 %
Intervallo dei risultati	27,89-35 %

Statistiche prestazionali	Valore
Valore assegnato	30,69 %
Incertezza del valore assegnato	0,6373 %
Deviazione standard dell'interconfronto	9,207%

In tabella 3 sono riportati i risultati dei partecipanti e il relativo z-score.

Tab. 3: Determinazione della 96h%LC₅₀ Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test: risultati e z-score (* il valore è da intendersi come indicativo)

FET: Determinazione della 96h%LC₅₀		
LAB ID	96hLC₅₀ (%)	z-score*
17	27,89	-0,30
65	9,50	-2,30
89	30,78	0,01
95	29,6	-0,12
101	44,1891	1,47
114	30,69	0,00
119	9,7	-2,28
125	30,78	0,01
127	29,5	-0,13
130	35	0,47
131	31,06	0,04
139	30,95	0,03
152	12,50	-1,98

8. Discussione

I risultati ottenuti nel PT Batteria di test ecotossicologici - Anno 2025 sessione 1S-E25 sono simili a quelli ottenuti nella precedente edizione del 2023, come si può notare da quanto riportato in Fig. 3.

La differenza sostanziale tra le due sessioni è la distribuzione dei risultati: nel 2023 i dati ottenuti si sono distribuiti in maniera più simmetrica rispetto al 2025, dove 9 dei 13 risultati restituiti si trovano invece all'interno di un intervallo molto ristretto, tra 27,89 e 35%.

Questa convergenza dei risultati nella sessione 1S-E25 ha determinato la presenza di un numero di *outliers* tale da rendere l'analisi robusta non applicabile e quindi di poter eseguire una valutazione solo indicativa della performance dei partecipanti.

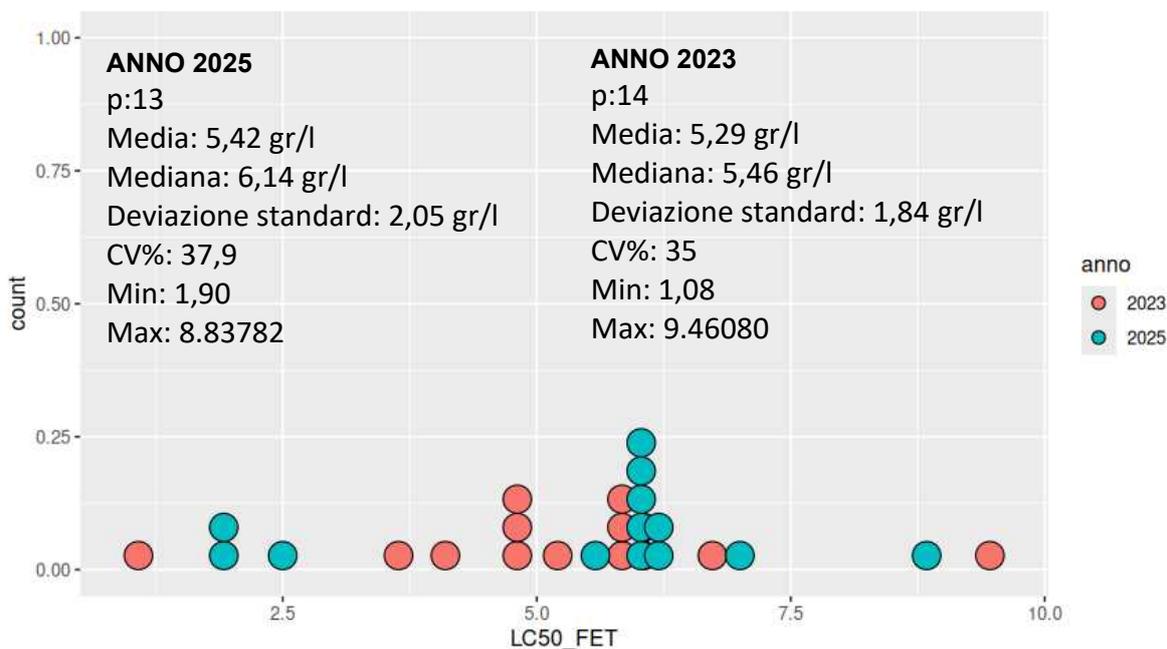
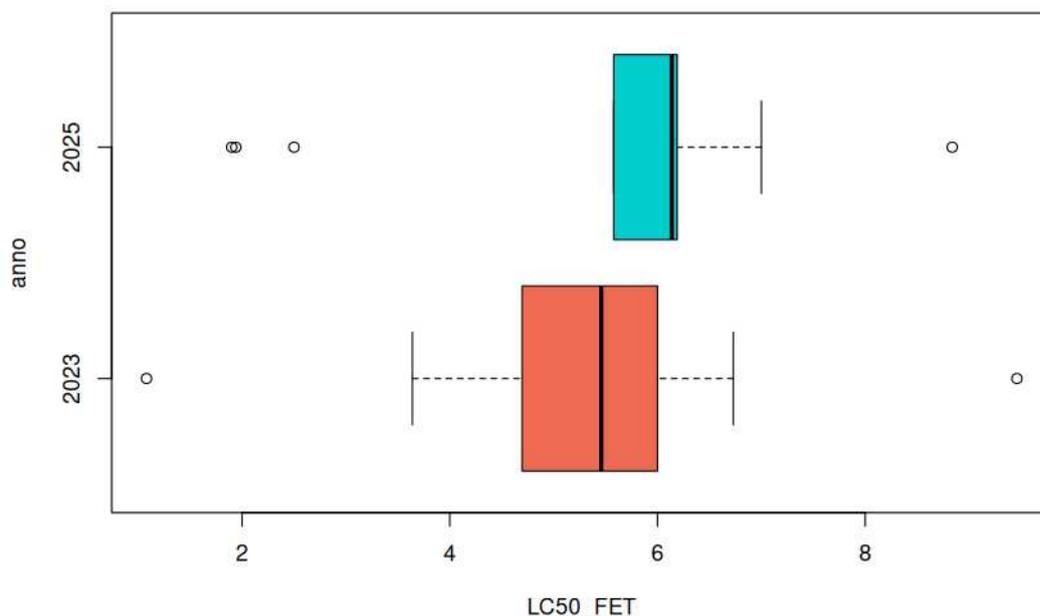


Fig.3: confronto (boxplot e dotplot) fra i risultati del PT "Determinazione della 96h%LC50 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) per l'anno 2023 (NaCl 16 gr/l) e l'anno 2025 (NaCl 20g r/l). I risultati sono stati trasformati da dato percentuale a gr/l.

Fine rapporto: PT ARPAE 2025 -Batteria di test ecotossicologici - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test sessione 1S-E25 (Rev. 0 - 28/07/2025)