I METODI SOSTITUTIVI ALLA PROVA DEL REACH

Il legislatore gira la testa dall'altra parte, e così i test sostitutivi non vengono utilizzati neppure quando esistono: per pigrizia, ignoranza, disattenzione, cavilli burocratici, interessi di parte. Costanza Rovida, consulente chimico aziendale e membro di Caat Europe, denuncia il lato oscuro del REACH. Una legge che dice di promuovere i metodi alternativi, ma che per il momento ha solo aumentato in modo esponenziale l'inutile carico di morte della vivisezione.

Tema: REACH
Autore: Costanza Rovida

REACH è il nuovo Regolamento europeo per la valutazione dei rischi sia tossicologici sia ecotossicologici delle sostanze chimiche in commercio. E' la più importante sfida per misurare la sicurezza chimica che sia mai stata concepita al mondo. All'origine del Regolamento c'era la crescente consapevolezza che **nel mercato dell'Unione Europea circolano migliaia di sostanze chimiche delle cui proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche poco o nulla si sa** *(White Paper 2001).*
Il diffondersi delle reazione allergiche, l'aumento degli squilibri riproduttivi, alcuni tipi di tumori e una serie di altre malattie avevano contribuito a destare interrogativi e preoccupazioni circa il ruolo delle sostanze chimiche nella nostra vita quotidiana *(European Risk Observatory Report, 2009).*
Il REACH richiede che tutte le sostanze distribuite nell'Unione Europea in quantità superiori a una tonnellata all'anno vengano registrate presentando un ponderoso dossier all'ECHA (European Chemical Agency, Agenzia Europea per le sostanze chimiche) di Helsinki. La mole informativa di questo dossier varia a seconda del volume di produzione delle sostanze commercializzate: imponente nel caso di sostanze chimiche che superano le 1000 tonnellate all'anno; meno esigente quando si tratta di 100 ovvero 10 o 1 tonnellata all'anno. Nelle tabelle 1a, 1b e 1c sono elencati i dati richiesti a seconda dei diversi Allegati del REACH.
Il REACH non si limita a richiedere una descrizione generale delle proprietà chimico-fisiche ed eco-tossicologiche delle sostanze. Al dossier infatti devono essere accluse informazioni sull'intero ciclo di vita della sostanza insieme con una descrizione dettagliata di come la sostanza viene maneggiata, utilizzata ed eliminata e delle misure precauzionali raccomandate a chi entra in contatto con il prodotto.
Inoltre, per tutte le sostanze chimiche distribuite in quantità superiori alle 10 tonnellate/anno, il dossier chiede un'approfondita valutazione della sicurezza (Chemical Safety Assessment o CSA), e qualora la sostanza risulti classificata come pericolosa, il CSA deve riportare un dettagliato scenario d'esposizione per i lavoratori, i consumatori e l'ambiente. La consegna del CSA rientra nel Chemical Safety Report (CSR) allegato al file che viene presentato all'ECHA.
Come si vede, per compilare il dossier da sottoporre all'ECHA sono necessarie una serie di competenze che spaziano dalla chimica alla tossicologia alla caratterizzazione analitica fino alla valutazione della salute e della sicurezza in ambito lavorativo. Ma non è tutto. Il REACH introduce infatti il principio di "una sostanza, una registrazione", costringendo tutti i soggetti interessati alla registrazione di una determinata sostanza a unirsi in un SIEF, acronimo di Substance Information Exchange Forum ovvero Forum per lo scambio di informazioni sulle sostanze. Un SIEF può comprendere da un minimo di 2-4 società fino a un massimo di diverse centinaia di imprese situate in differenti paesi della UE. Di fatto, i partecipanti a un SIEF sono tra di loro concorrenti e i rapporti quotidiani all'interno di un SIEF sono molto difficili, dal momento che devono mettersi tutti d'accordo su un unico Che-

mical Safety Assessment e suddividersi i costi di registrazione. E' a questo punto che intervengono anche avvocati e commercialisti. Ogni SIEF ha un dichiarante capofila (lead registrant) che svolge la maggior parte del lavoro, generalmente con l'aiuto di una società di consulenza in grado di seguire tutti i differenti aspetti del processo di registrazione.

Per la preparazione di questi complicati dossier, ECHA ha elaborato e distribuito gratuitamente un software chiamato IUCLID 5.2, la cui finestra iniziale mostriamo alla figura 1. Anche servirsi di questo software è complicato e probabilmente poche persone in Europa hanno avuto la possibilità di imparare a utilizzarlo appieno. Insomma, districarsi su questo terreno è decisamente difficile come risulta anche dal numero di linee-guida pubblicate dall'ECHA (scaricabili da http://guidance.echa.europa.eu). Ogni mese vengono distribuite nuove guidelines, dimostrando così che la preparazione di un dossier è un processo ancora non interamente definito, dove esistono ancora diverse aree di incertezza e discussione.

Se paragonato al precedente corpus legislativo, REACH esige che vengano definiti in modo preciso un maggior numero di endpoints tossicologici ed ecotossicologici. Di conseguenza diversi nuovi test, la maggior parte dei quali , dovranno essere eseguiti.

L'alto costo in termini di animali utilizzati è stato materia di preoccupazione sin dall'inizio (Pedersen et. al., 2003; van der Jagt et al., 2004). Le nostre stime più recenti (Hartung and Rovida, 2009) dicono che il numero totale di animali potrebbe arrivare a 54,4 milioni se si prendono in considerazione sia l'allargamento dell'Europa sia la crescita della sua industria chimica, e se le attuali linee guida vengono osservate strettamente.

Per ridurre il numero di animali utilizzati si potrebbe far ricorso ai metodi *in vitro* anziché a quelli *in vivo*. Ma è una possibilità realistica?

7.	Proprietà fisico-chimiche	> 1 t/y	> 10 t/y	> 100 t/y	> 1000 t/y
7.1	Stato della sostanza	X			
7.2	Punto di fusione/Punto di congelamento	X			
7.3	Punto di ebollizione	X			
7.4	Densità relativa	X			
7.5	Pressione di vapore	X			
7.6	Tensione superficiale	X			
7.7	Idrosolubilità	X			
7.8	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua	X			
7.9	Punto d'infiammabilità	X			
7.10	Infiammabilità	X			
7.11	Proprietà esplosive	X			
7.12	Temperatura di autoinfiammabilità	X			
7.13	Proprietà comburenti	X			
7.14	Granulometria	X			
7.15	Stabilità nei solventi organici			X	
7.16	Costante di dissociazione			X	
7.17	Viscosità			X	

Tab. 1a: REACH richiede per la sperimentazione: proprietà fisico-chimiche

8.	Informazioni tossicologiche	> 1 t/y	> 10 t/y	> 100 t/y	> 1000 t/y
8.1	Irritazione/corrosione cutanea (*in vitro*)	X	X	X	X
8.1.1	Irritazione cutanea in vivo		X	X	X
8.2	Irritazione degli occhi (*in vitro*)	X	X	X	X
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo		X	X	X
8.3	Sensibilizzazione cutanea	X	X	X	X
8.4	Mutagenicità	X	X	X	X
8.4.1	Studio *in vitro* del gene mutageno nei batteri	X	X	X	X
8.4.2	Studio *in vitro* della citogenicità		X	X	X
8.4.3	Studio in vitro della mutazione del gene		X	X	X
	Ulteriore mutagenicità			X	X
8.5	Tossicità acuta	X	X	X	X
8.5.1	Tossicità acuta (via orale)	X	X	X	X
8.5.2	Tossicità acuta (per inalazione)		X	X	X
8.5.3	Tossicità acuta (per via dermica)		X	X	X
8.6	Tossicità a dose ripetuta				X
8.6.1	Tossicità a dose ripetuta a breve termine (28 giorni)		X	X	X
8.6.2	Studio della tossicità sub cronica (90 giorni)			X	X
8.6.3	Studio della tossicità ripetuta a lungo termine				X
8.7	Tossicità per la riproduzione				X
8.7.1	Screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo una sola specie		X	X	X
8.7.2	Studio della tossicità per lo sviluppo prenatale			X	X
8.7.3	Studio della tossicità per la riproduzione su due generazioni			X	X
8.8	Tossicocinetica				X
8.8.1	Tossicocinetica (informazioni disponibili)		X	X	X
8.9.1	Studio della cancerogenicità				X

Tab. 1b: REACH richiede per la sperimentazione: informazioni tossicologiche

9.	Informazioni eco tossicologiche	> 1 t/y	> 10 t/y	> 100 t/y	> 1000 t/y
9.1	***Tossicità acquatica***				
9.1.1	Tossicità a breve termine su invertebrati (Daphnia)	X	X	X	X
9.1.2	Inibizione della crescita su piante acquatiche	X	X	X	X
9.1.3	Test di tossicità a breve termine sui pesci		X	X	X
9.1.4	Test di inibizione respiratoria su fanghi attivi		X	X	X
9.1.5	Test su invertebrati per tossicità a lungo termine (Daphnia)			X	X
9.1.6	Test di tossicità a lungo termine sui pesci			X	X
9.1.6.1	Test di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita (FELS)			X	X
9.1.6.2	Test di tossicità a breve termine su pesci nelle fasi di embrione o avannotto			X	X
9.1.6.3	Prova di crescita di pesci in fase giovanile			X	X
9.2	**Degradazione**				
9.2.1	Degradazione Biotica	X	X	X	X
9.2.1	Ulteriore biotica				X
9.2.1.1	Pronta biodegradabilità		X	X	X
9.2.1.2	Sperimentazione di simulazione sulla degradazione finale nelle acque di superficie			X	X
9.2.1.3	Sperimentazione di simulazione al suolo			X	X
9.2.1.4	Sperimentazione di simulazione su sedimenti			X	X
9.2.2	Fattori ambientali		X	X	X
9.2.2.1	Idrolisi come funzione del pH		X	X	X
9.2.3	Identificazione dei prodotti di degradazione				
9.3	***Destino e comportamento nell'ambiente***				
9.3.1	Screening di adsorbimento/desorbimento		X	X	X
9.3.2	Bioaccumulo nelle specie acquatiche (pesci)			X	X
9.3.3	Informazioni supplementari sull'adsorbimento/ desorbimento			X	X
9.3.4	Informazioni supplementari sul destino e il comportamento nell'ambiente				X
9.4	***Effetti sugli organismi del suolo***				
9.4.1	Tossicità a breve termine per gli invertebrati			X	X
9.4.2	Effetti sui microorganismi del suolo			X	X
9.4.3	Tossicità a breve termine per le piante			X	X
9.4.4	Tossicità a lungo termine sugli invertebrati				X
9.4.6	Tossicità a lungo termine sulle piante				X
9.5.1	Tossicità a lungo termine per gli organismi che vivono nei sedimenti				X
9.6.1	Tossicità a lungo termine o tossicità per la riproduzione degli uccelli				X

Tab. 1c: REACH richiede per la sperimentazione: informazioni ecotossicologiche

Gli obiettivi del REACH

L'articolo 1 del REACH dichiara: *"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"* (enfasi di chi scrive).

La volontà di evitare i test animali è confermata più avanti nell'Allegato XI, ulteriormente emendato nel Regolamento 134/2009, in virtù dei seguenti punti:

- accettazione dei dati provenienti da metodi alternativi non convalidati, purché ne sia dimostrata la validità scientifica.
- promozione dello strumento del "peso dell'evidenza" (Weight of Evidence) al fine di utilizzare tutti i dati esistenti.
- promozione sia del grouping (la possibilità di creare raggruppamenti di sostanze chimiche simili) sia del read across (l'utilizzo dei dati provenienti da sostanze chimiche simili) per ridurre al minimo il numero di nuovi test.

Le intenzioni del legislatore erano chiare. In effetti il REACH è rivoluzionario, essendo il primo regolamento che accetta ufficialmente i dati provenienti da metodi non convalidati e promuove strumenti come il peso dell'evidenza e le cosiddette Integrated Testing Strategies (ITS) o strategie integrate per i test.

E' importante segnalare le differenze tra questi ultimi due strumenti: il primo si basa sulla valutazione dei dati esistenti reperibili in vecchi studi o risultati provenienti da studi non-GLP (non Good Laboratory Practises o BPL, Buone Pratiche di Laboratorio) o realizzati senza seguire protocolli di linee guida ufficiali. L'assunto è che tutte queste metodologie possono essere "soppesate" e combinate insieme per la valutazione di una specifica proprietà tossicologica.

Il secondo – ITS - è molto più interessante dal punto di vista scientifico in quanto permette di ottimizzare la strategia sperimentale quando si progettano nuovi studi allo scopo di massimizzare la conoscenza acquisita con il costo minimo in termini di animali utilizzati.

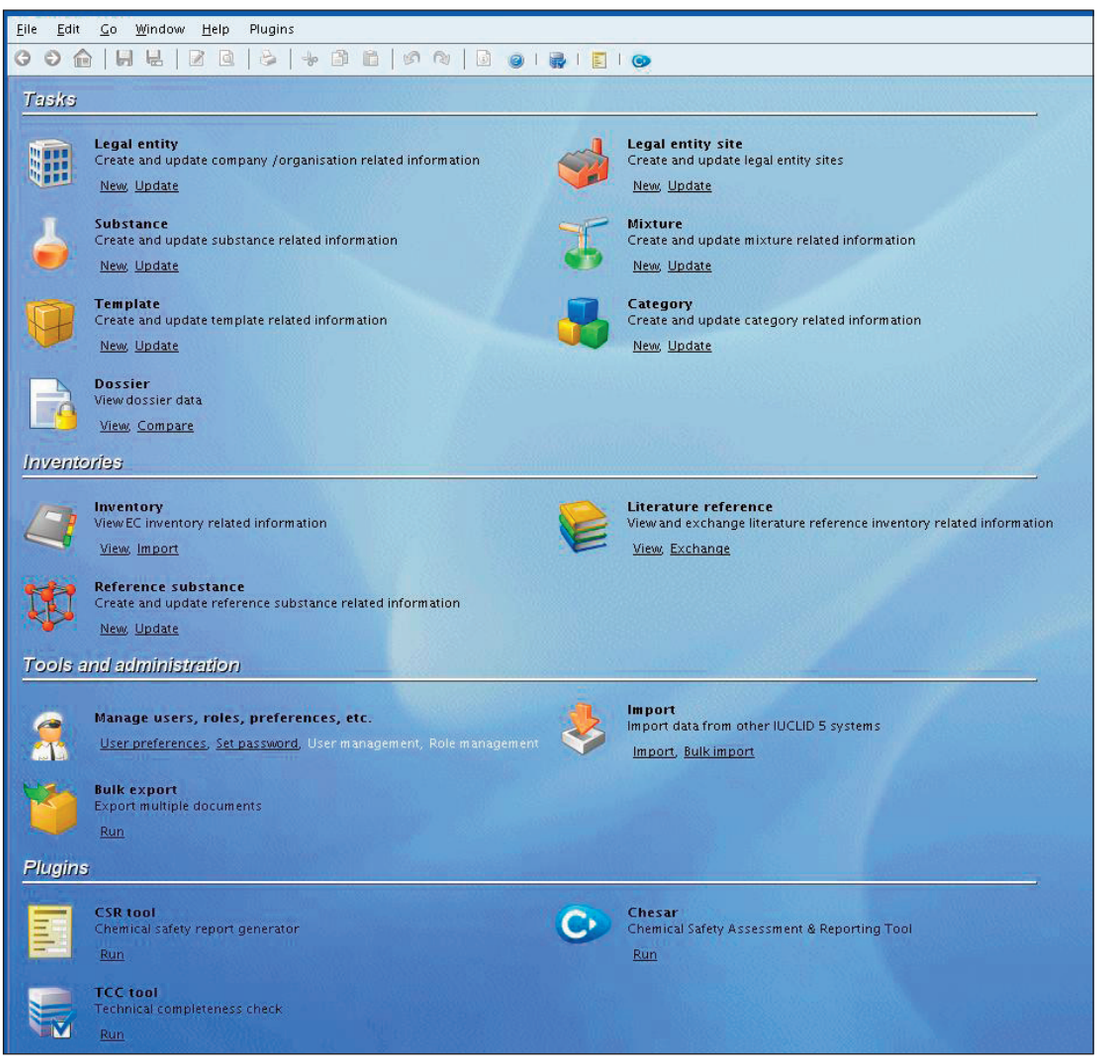

Fig. 1: Schermata iniziale del software IUCLID 5.2.

Il punto di vista dei dichiaranti

Fin qui l'ambizioso ventaglio dei principi del REACH. Ma è ora di rovesciare la prospettiva e mettersi dal punto di vista dei dichiaranti. La verità è che esistono decine di migliaia di importatori e fabbricanti che devono mettere a punto i loro dossier di registrazione per poter continuare a svolgere il loro lavoro. E' un problema pressante dal momento che la registrazione è obbligatoria per poter continuare a vendere e distribuire le sostanze chimiche. Anche gli utilizzatori a valle hanno l'obbligo di verificare che ciò che acquistano sia conforme ai requisiti REACH. E per lo sdoganamento alle frontiere bisogna presentare una documentazione conforme alle richieste del Regolamento. Le sanzioni previste per chi non è in regola sono particolarmente severe, per esempio prevedono il carcere nel caso in cui sostanze altamente preoccupanti (very high concern) vengano usate senza le appropriate autorizzazioni (le sanzioni vengono definite dai singoli Stati Membri e non sono omogenee).
Tutto ciò determina un'attività febbrile per preparare i dossier.

La situazione è ulteriormente esacerbata da due fattori:

1. L'alto numero di sostanze chimiche che devono essere registrate. Alla fine del 2008 circa 140.000 sostanze erano state pre-registrate e la nostra stima (Rovida e Hartung, 2009) è che più di 6.000 sostanze lo saranno entro la prima scadenza – quella del novembre 2010 – che è la più esigente in termini di numero di test da eseguire (all'8 novembre sono stati presentati 2.316 dossier completi).
2. La situazione economica che costringe le aziende di ogni comparto produttivo a concentrarsi in primo luogo su come far fronte alla crisi piuttosto che a compilare le pratiche prescritte dal REACH.

Essendo personalmente coinvolta nella compilazione di alcuni dossier, ho avuto modo di incontrare diversi protagonisti del REACH – importatori, fabbricanti e utilizzatori a valle. Ci sono altri protagonisti come i CRO (Contract Research Organisations o Laboratori conto terzi) diversi tipi di esperti del settore, avvocati e così via. Quest'esperienza personale mi ha portato a concludere che nessun nuovo (non ancora convalidato) test *in vitro* verrà mai eseguito nell'ambito del REACH, almeno non come approccio alternativo ai tradizionali test sugli animali. [Per "nuovo" intendo un test non ancora convalidato benché presente sul mercato e scientificamente affidabile. Attualmente ce ne sono diversi e rappresentano un'opportunità interessante].
Per fare questa constatazione mi baso sulla prospettiva del dichiarante, che agisce al di fuori dell'ambito accademico e il cui atteggiamento dipende da due fattori: d'un lato le inclinazioni soggettive delle persone coinvolte nel processo, dall'altro le oggettive difficoltà che si riscontrano nel presentare i risultati ottenuti con i test *in vitro*.
Questi due fattori sono egualmente importanti e vanno entrambi presi in considerazione se si desidera che venga fatto un maggior ricorso ai metodi *in vitro* e alle strategie integrate ITS.
Il REACH considera anche che il (Q)SAR (Quantitative Structure Activity Relationship, relazione quantitativa tra attività e struttura) sia un'utile alternativa ai test con gli animali. Benché questi metodi di previsione computazionale condividano con quelli *in vitro* alcune delle dificoltà cui ho testé accennato, si tratta di metodologie completamente diverse e la maggior parte delle considerazioni che presento in questo articolo non possono essere estrapolate ai (Q)SAR, che per questo motivo non saranno qui prese in considerazione.
Come materia di riflessione, presenterò in primo luogo alcune situazioni/opinioni che evidenziano quale sia l'atteggiamento generale dei non-specialisti circa i metodi alternativi. L'ordine dell'elenco è casuale, non tocca cioè l'importanza e la frequenza con la quale tale opinioni vengono espresse. Di seguito farò riferimento ad alcune delle difficoltà tecniche per mostrare quanto sia problematica l'applicazione dell'articolo 1 del regolamento e per quale motivo ritengo che molto difficilmente qualcuno farà ricorso ai nuovi test *in vitro* per ottemperare alle richieste del REACH.

A – Problema numero uno: i luoghi comuni

Benché la mia attività si svolga prevalentemente in Italia, ho avuto modo di incontrare diversi protagonisti di altri paesi europei (i SIEF sono raggruppamenti che agiscono su scala internazionale) e altri consulenti che svolgono il mio stesso lavoro in altri Stati membri dell'Unione Europea. Poiché ci muoviamo in un contesto globalizzato, non ho riscontrato particolari differenze tra le persone di nazionalità diverse. Tra Italia, Germania o Ungheria il modo di pensare è generalmente molto simile. Possono esserci delle differenze che dipendono dalle dimensioni delle aziende. Le società più grandi - per esempio BASF o Henkel – possono permettersi dipendenti altamente specializzati e laboratori di

ricerca che si tengono al corrente delle tecniche di sperimentazione più innovative. Invece le piccole e medie aziende, che rappresentano la maggioranza degli attori in campo, si scontrano con maggiori difficoltà, dal momento che un numero ridotto di dipendenti deve occuparsi di tutto un po' e, in linea di massima, le prescrizioni legislative come questa del REACH sono all'ultimo posto nella lista delle priorità lavorative.
Nel mio lavoro, cerco sempre di coinvolgere le persone sul significato dei metodi alternativi, sul modo e sulle ragioni per cui si può far ad essi ricorso per definire le proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche di una sostanza chimica. **Quasi mai, anzi per essere precisa dovrei dire mai, ho a che fare con persone che conoscono l'argomento.** Come risultato di questi colloqui, ho raccolto una lista di luoghi comuni che elenco qui sotto. E' solo una "instantanea" di come le persone nella vita reale considerano questa importante opportunità offerta dal REACH. Alcuni dei commenti sono reazioni spontanee delle persone, sorprese di vedermi interessata ai metodi sostitutivi malgrado il mio titolo di dottore in chimica, che ai loro occhi mi conferisce lo status di "serio" esperto del settore.

Metodi in vitro: che cosa sono?
La maggior parte della gente non sa neppure che esistono. E' possibile che abbiano sentito parlare di movimenti che vogliono eliminare gli animali da laboratorio, ma li considerano discorsi da animalisti fanatici. Non riescono a immaginare che i metodi *in vitro* abbiano una validità scientifica superiore a quelli *in vivo*.

Il sacrificio degli animali è giustificato se serve alla salute di mio figlio
L'opinione corrente è che i risultati dei test sugli animali siano sempre pienamente attendibili e forniscano informazioni precise sulla potenziale tossicità di una sostanza chimica. La maggior parte delle persone non pensa che i test sugli animali possono avere un'alta percentuale di risultati "falsi positivi" o "falsi negativi". La convinzione che il sacrificio degli animali salvi delle vite umane mette a posto la coscienza da qualsiasi considerazione etica circa l'uso degli animali nei laboratori.

I test in vivo sono obbligatori. Ecco tutto
Alcuni produttori e utilizzatori a valle sono convinti che le sostanze chimiche non siano affatto pericolose. La valutazione della loro tossicità è un peso burocratico che il legislatore impone loro per rendergli la vita difficile. Questa categoria di persone non può essere convinta in alcun modo che è possibile perseguire una strategia scientifica più affidabile ed efficace per una valutazione più precisa della sostanza chimica. A loro importa solo di avere tutti i documenti in ordine nel caso gli capitasse un controllo fiscale o d'altra natura.

Un end point = un test in vivo
L'atteggiamento di cui sopra viene rinforzato da due fattori egualmente importanti. Primo, la certezza che i test con gli animali verranno accettati senza battere ciglio dagli enti regolatori. Secondo, il convincimento derivante da una certa pigrizia mentale per cui i test *in vivo* sono molto più semplici da organizzare e da seguire, e che da loro sia anche più semplice estrapolare i risultati. La corrispondente casella del dossier REACH viene spuntata in un attimo quando arriva il rapporto dal laboratorio. Non c'è nient'altro da fare. Può darsi che questo approccio sia più caro, ma è anche molto più semplice. In confronto, le ITS devo essere studiate e valutate. Richiedono più tempo e più impegno specializzato. Comportano la valutazione di relazioni provenienti da laboratori diversi e magari presentate con modalità diverse. I risultati devono essere confrontati e analizzati con cura per arrivare a una conclusione. **E' importante sottolineare che proprio per questo motivo la conoscenza che si acquisisce su una determinata sostanza risulta col tempo sempre più precisa,** ma questo aspetto non interessa al dichiarante. Dal suo punto di vista, oltre a salvare molte vite animali, una ITS azzeccata ha l'unico vantaggio di essere meno cara. Ma è un vantaggio più che controbilanciato dall'iter più lungo e complicato e dalla possibilità che i risultati finali vengano rifiutati dagli enti regolatori.

Ho sempre utilizzato quel test
Sostituire una procedura che viene eseguita di routine da decenni è molto difficile. Le persone sono state addestrate in quel modo e si sentono molto più a loro agio a continuare nel solco tracciato. Di fatto, non hanno grandi motivi per cambiare, e ai loro occhi i vantaggi insiti nei metodi alternativi sono trascurabili o del tutto inesistenti.

Queste sono le mie procedure certificate GLP
Così mi ha risposto il rappresentante di un laboratorio conto terzi quando ho fatto dei commenti su un protocollo di lavoro che prevedeva una prima procedura di test *in vivo* per determinare la dose da utilizzare, seguita dall'usuale procedura di sperimentazione della sostanza in tre concentrazioni crescenti su tre gruppi di animali più un gruppo di controllo. Peccato che la corrispondente linea guida dell'OECD dica chiaramente che quando non ci sono evidenze di tossicità acuta per una sostanza si può procedere testando direttamente una dose limite pari a 1.000mg/kg saltando sia lo studio preliminare sia

il test fatto su tre gruppi di animali. Proprio su questa particolare sostanza era già stato eseguito un test di Tossicità Acuta alla dose di 5.000mg/kg, senza effetti avversi per gli animali! **Preferisco non contare il numero di animali utilizzati inutilmente e mi auguro che ciò sia avvenuto per ignoranza e non per gonfiare i costi della sperimentazione e i profitti del laboratorio.**

B - Problema numero due: gli ostacoli burocratici

Indipendentemente dall'atteggiamento soggettivo dei dichiaranti, nell'ambito del REACH i test *in vitro* vanno incontro ad altre e più oggettive difficoltà.

Il tempo è denaro

La crisi con cui devono fare i conti tutte le industrie del settore è una realtà importante. La produzione di alcune aziende è crollata dell'80% nel corso del 2009. Tuttavia, la registrazione deve essere presentata in base al volume di produzione dichiarato prima del 2008 e non è prevista alcuna riduzione nei numero di test prescritti anche se l'attuale livello di produzione è molto più basso. **E' facile capire che molti importatori e produttori si concentrino su questa penosa perdita di entrate piuttosto che sulle strategie migliori per salvare vite animali.** Un'altra aggravante è la disoccupazione, in costante aumento. Tuttavia le imprese devono ottemperare alle richieste del REACH come condizione necessaria alla sopravvivenza. Il REACH è complesso e richiede che se ne occupi una persona specializzata, ma non ci sono risorse per nuove assunzioni e alcuni dipendenti vengono semplicemente messi come responsabili del REACH spostandoli da altri uffici indipendentemente dalla loro competenza tecnica in materia. Di conseguenza essi possono soltanto affidarsi alle decisioni del SIEF senza poter obiettare alcunché circa le strategie. Molto spesso il lead registrant incaricato di preparare il dossier è notevolmente sotto pressione. **Aumentare l'uso dei metodi alternativi viene consigliato per legge ma non è obbligatorio e nessuno ha voglia di sprecare tempo in cose che non reputano essenziali.** I maggiori costi di un test sugli animali vengono comunque suddivisi tra tutti i partecipanti e alla fine non risultano eccessivi. Nel dubbio, è meglio impegnarsi a dimostrare che i test più cari non sono necessari.

Mancanza di competenze

Pochi addetti ai lavori sono consapevoli dei benefici che derivano da una adeguata strategia ITS. Molti di loro, inoltre, sono confinati dentro le università. Questo ci dice che gli approcci alternativi non sono ancora pronti per essere utilmente applicati nella vita reale. Ci sono alcuni laboratori specializzati nei test *in vitro*. Generalmente sono nati di recente, soprattutto in risposta al 7° emendamento della Direttiva cosmetici, che prescrive l'abbandono definitivo dei test sugli animali per quanto riguarda i cosmetici e i loro ingredienti (Direttiva 2003/15/EC). Le più grandi aziende chimiche stanno anch'esse cercando di ampliare l'uso di metodi alternativi per la valutazione delle sostanze chimiche, ma il loro lavoro è ancora allo stadio della ricerca.

Insomma, anche qui la mancanza di competenze è un problema maggiormente sentito a livello delle piccole e piccolissime imprese, dove pochi dipendenti devono occuparsi di tutto, mentre la complessità del REACH richiede un impegno a tempo pieno e notevoli competenze chimiche.

I risultati negativi dei test in vitro non vengono accettati per legge

L'Allegato XI del REACH accetta i risultati di un test *in vitro* non ancora convalidato solo quando essi risultano positivi (vale a dire quando la sostanza esaminata è tossicologicamte attiva e comporta dei rischi tossicologici).

Viceversa, se i risultati sono negativi (se cioè la sostanza non risulta attiva e non comporta rischi tossicologici) essi devono essere confermati da nuovi esperimenti sugli animali.

Di fatto, la maggior parte delle sostanze chimiche non sono pericolose e di conseguenza la probabilità di ottenere un risultato negativo è molto alta. E allora, a quale scopo eseguire un esperimento *in vitro*? Si impegnano tempo ed energie nell'elaborare una strategia che risparmi la vita degli animali, col fondato rischio che ciò non serva allo scopo. E' vero che i test *in vitro* sono molto meno cari dei corrispondenti test sugli animali, ma se alla fine bisognerà comunque testare la sostanza sugli animali, qualsiasi vantaggio è annullato in partenza.

I risultati positivi dei test in vitro non vengono accettati dalle imprese

La generale mancanza di conoscenza circa le proprietà delle sostanze chimiche comporta che la maggioranza di esse non siano classificate come pericolose e quindi non siano elencate nell'allegato VI del Regolamento CLP (acronimo per Classification, labeling and packaging – Classificazione, etichettatura e imballaggio, Regolamento EC 1272/2008).

Per alcune sostanze l'esecuzione dei nuovi test porterà con ogni probabilità a una nuova classificazione. Per i produttori e gli utilizzatori a valle questo comporterà la necessità di implementare nuove misure di sicurezza o, ancora peggio, una serie di restrizioni nell'utilizzo della sostanza.

E' chiaro quindi che **nessun risultato positivo verrà facilmente accettato e che ogni qualvolta la sostanza risulterà tossica nei test *in vitro* nuovi test sugli animali verranno effettuati nella speranza di un risultato negativo.**

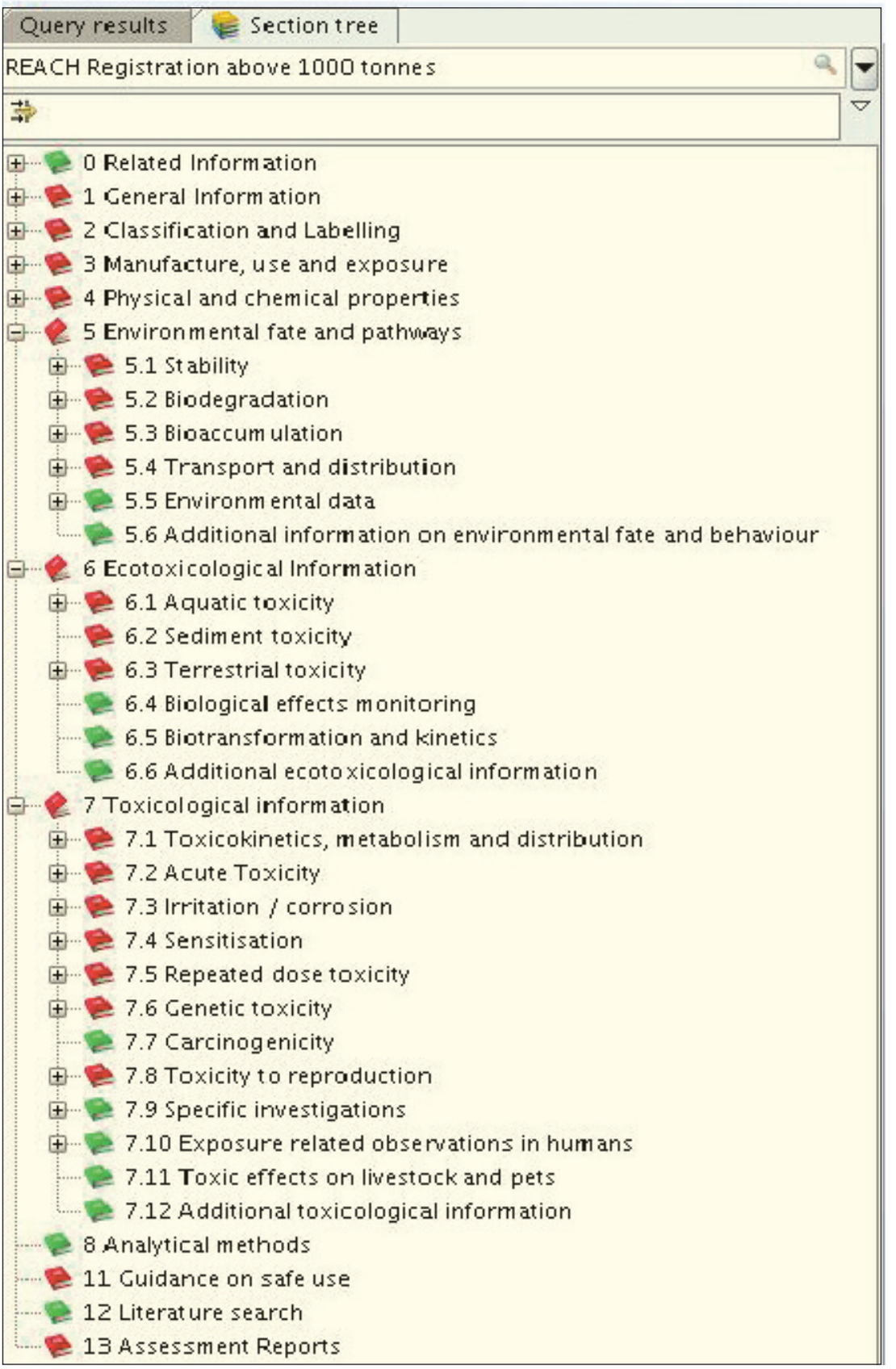

Fig. 2: Sezione ad albero relativa a una sostanza di IUCLID 5.2.

Metodi in vitro + IUCLID 5: missione impossibile
Alla fine, sia perché alcuni dati *in vitro* esistono già sia perché a dispetto di tutte le difficoltà sopra elencate alcuni dichiaranti "scrupolosi" avranno eseguito alcuni test *in vitro*, i risultati di questi ultimi dovranno essere trascritti nello IUCLID 5.2. E a questo punto il povero dichiarante scoprirà che lo IUCLID 5.2 non è stato concepito per accettare i metodi *in vitro.*
Lo IUCLID 5.2 ha una sezione specifica per ciascuna delle informazioni richieste dal REACH (figura 2). Ciascuna di queste sezioni contiene diversi campi che sono tipici per quel determinato tipo di studi. Ad esempio, la tabella 2 elenca quali sono le linee guida accettate per la valutazione della tossicità a breve termine nei pesci. E' vero che non esiste ancora un metodo alternativo convalidato per questo endpoint ma tale elenco non invita in alcun modo i dichiaranti a prendere in considerazione strategie differenti. Lo stesso vale per tutti gli altri endpoints come si vede nella figura 2.
Via via che si procede nella compilazione del dossier, bisogna inserire diversi altri dettagli, comprese le informazioni sulla sistemazione degli animali, l'età, il tipo di alimentazione e così via. Per esempio, la tabella 3 elenca il numero e il tipo di campi richiesti per quanto riguarda i test di Tossicità ripetuta per via orale. Ci sono parecchie sezioni dedicate ai test *in vivo* che rimangono vuote se vengono utilizzati i metodi *in vitro*. La maggior parte delle informazioni richieste è in forma di numeri o consiste in un menù di opzioni pre-definite. I dati relativi ai test *in vitro* possono essere inseriti solo dove esiste una casella destinata al testo libero, come, per esempio nella Tabella 3.

Compilare lo IUCLID 5.2 è un'operazione altamente soggetta a errore. Per questo l'ECHA ha distribuito due linee guida: *The Technical Completeness Check tool* (Strumento per controllare se la compilazione è completa) e *The Business rule verification* (Verifica della validità dei dati inseriti) da consultare nel corso della compilazione. Sono due strumenti incorporati nello IUCLID 5.2 destinati a controllare la completetezza del dossier e cioè se esso è pronto per essere presentato. Ogniqualvolta un "campo" del file IUCLID 5.2 risulta non compilato, il check fallisce (segnala "errore") con la conseguenza che il rifiuto del dossier diventa altamente probabile. Dal momento che lo IUCLID 5.2 è stato concepito per accettare esclusivamente i dati dei test *in vivo*, la maggior parte dei campi restano vuoti quando si inseriscono i dati dei test *in vitro* (ricordate? essi possono essere messi solo dei box dedicati al "testo libero") di modo che il dossier viene istantaneamente rifiutato dal sistema. C'è sempre la possibilità di inserire qualche nota esplicativa sul perché alcuni campi risultato vuoti e come mai lo studio non si attiene ciecamente ai test *in vivo* accettati dalla legislazione OECD, ma questa si configura come un'operazione molto più rischiosa per il dichiarante.
Per quanto riguarda i test *in vitro* ci sono alcune nuove linee guida pubblicate dall'OECD. Tuttavia, pochi di loro sono stati incorporati nello IUCLID 5.2, malgrado l'ultimo aggiornamento dalla versione 5.1 sia datata febbraio 2010 (ECHA News Alert, 2010) vale a dire **dopo che molte nuove linee guida OECD per i test *in vitro* erano già state adottate.**

Il materiale orientativo dello IUCLID 5
L'ECHA ha diffuso parecchi documenti orientativi per quanto riguarda la compilazione dello IUCLID 5.2. Due di loro riguardano i metodi *in vitro*.
Si tratta della *Practical Guide 1: How to report in vitro data* (2010) *e della Practical Guide 10: How to avoid unnecessary testing on animals* (2010).
Il primo documento rafforza l'ovvio concetto che soltanto i metodi convalidati vengono accettati come studi chiave mentre altri test possono essere utilizzati nella costruzione di uno studio fondato sul peso dell'evidenza. In questa guida c'è anche un riferimento al sito web dello TSAR *(Tracking System for Alternative test methods Review, Validation and Approval in the Context of EU Regulations on Chemicals, http://tsar.jrc.ec.europa.eu)*, dove sono elencati molti metodi *in vitro* convalidati.
In seguito, essa spiega in termini pratici come possono essere utilizzati i dati ricavati dai metodi *in vitro* e come inserirli nello IUCLID 5. Sfortunatamente, l'unica sezione dello IUCLID dedicata alla materia è quella della genotossicità *in vitro*. Tutte le altre, compresa l'irritazione della pelle e dell'occhio (per le quali esistono metodi ufficiali pienamente accettati) chiedono ancora in modo specifico informazioni relative ai testi sugli animali. La guida spiega come usare le poche caselle nelle quali può essere inserito un testo libero, ma è evidente che si tratta di una cosa rabberciata.
Il tema della seconda guida è la possibilità evitare i test sugli animali inutili ma si sofferma soprattutto su altre possibilità quali la condivisione dei dati, il read across e il grouping, e il data waiving (utilizzato per dimostrare che non è necessario fornire dati): argomenti più specifici come i metodi *in vitro* e (Q)SAR occupano uno spazio minore.

Conclusioni, con qualche ottimismo

Non bisogna essere uno specialista per capire che nessun test *in vitro* verrà mai eseguito ai fini della preparazione di un dossier per il REACH, quantomeno nel prossimo futuro, e cioè per le due scadenze del 2010 (Allegato X) e del 2013 (Allegato IX) che sono anche le più importanti per il numero di animali che richiedono.

La scadenza del giugno 2018 riguarda le sostanze prodotte in quantità inferiori come specificato negli Allegati VII e VIII del REACH. Per quella data la speranza è che i metodi *in vitro* per la determinazione di semplici endpoints saranno disponibili. Si tratterà con ogni probabilità del test di irritazione cutanea e dell'occhio, del test di tossicità acuta e della sensibilizzazione cutanea. Sfortunatamente una previsione realistica non consente di allungare la lista.

Tossicità a breve termine sui pesci
• OECD Linea guida 203 (Pesci, test di tossicità acuta) • OECD Linea guida 204 (Pesci, test di tossicità prolungata: studio di 14 giorni) • EU Metodo C.1 (Tossicità acuta sui pesci) • EPA OPP 72-1 (Test di tossicità acuta sui pesci) • EPA OPPTS 850.1075 (Test di tossicità acuta sui pesci di acqua dolce e di mare) • EPA OPPTS 850.1085 (Test di tossicità acuta sui pesci mitigato da acido umico • ISO 7346-1 (Determinazione della tossicità acuta letale di sostanze su un pesce d'acqua dolce) • [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Parte 1: Metodo statico • ISO 7346-1 (Determinazione della tossicità acuta letale di sostanze su un pesce d'acqua dolce) • [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Parte 2: Metodo semi-statico • ISO 7346-1 (Determinazione della tossicità acuta letale di sostanze su un pesce d'acqua dolce) • [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Parte 3: Metodo a flusso continuo) • ISO 7346/1-3 (Determinazione della tossicità acuta letale di sostanze su un pesce d'acqua dolce) • [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] • Altra linea guida

Tab.2: Elenco delle linee guida che possono essere selezionate per la determinazione della tossicità a breve termine sui pesci

IUCLID 5.2 Sezione	Numero di campi	Box per testi liberi	Note
Dati amministrativi e referenze	20		
Materiali e metodi	9		
Sostanza testata	5	2	
Animali testati	6	1	dedicati per *in vivo*
Amministrazione, esposizione	14	7	dedicati per *in vivo*
Esami	*5*	*5*	possono essere usato *in vitro*
Risultati e discussione	7 ciascun endpoint	1	
	30	1	
Osservazioni generali	1	1	
Riassunto del richiedente e conclusioni	3	3	

Tab. 3: Tossicità per dose ripetuta, per via orale

Tuttavia c'è spazio per qualche barlume di ottimismo per quanto riguarda il numero di animali che verranno utilizzati nel REACH.
Per la scadenza del 2010, infatti, la legge richiede parecchi test molto costosi, come la cancerogenicità, la tossicità acuta su due generazioni, la tossicità a dosi ripetute su 90 giorni, eccetera. Questi test sono anche i più impegnativi per il numero di animali utilizzati. Tutti i SIEF in questo momento stanno dando battaglia per poter evitare questi test perché sono lunghi e costosi. Anche se non vi sono test *in vitro* sostitutivi, il REACH consente altre opzioni per evitarli (per esempio, se si dimostra che non c'è esposizione, quando la sostanza non è solubile in acqua, quando la sostanza è molto biodegradabile, ecc..). Altri importanti strumenti per ridurre il numero dei test *in vivo* eseguiti per il REACH sono category e read across, che permettono di estrapolare i risultati di un test da una sostanza a un'altra considerata equivalente. La validità di questa strategia deve essere debitamente giustificata dal momento che anche differenze minime nella struttura chimica possono avere un forte impatto sull'attività biologica.
Fino ad ora, solo pochi dossier hanno proposto studi che comportano un esteso utilizzo dei test animali. Toccherà a ECHA decidere quale strategia perseguire, se cercare di evitare il più possibile i test animali. In questo caso resta il fatto che alcune informazioni richieste dal REACH non verranno fornite.

Al di là di queste considerazioni, la mia personale impressione è che il principale risultato positivo del REACH sarà di tipo educativo. Per esempio, il primo passo nella preparazione di un dossier consiste nel raccogliere tutta la documentazione esistente su una determinata sostanza. Queste informazioni devono essere incluse nello IUCLID 5.2 in base a uno standard preciso. Ciò presenta un duplice vantaggio. **Primo, risulta ormai chiaro che i test animali eseguiti in base a protocolli differenti conducono a risultati diversi anche laddove la sostanza chimica e l'endpoint ricercato sono esattamente gli stessi. E questo non potrà che aumentare e diffondere la consapevolezza circa i limiti intrinseci dei test sugli animali.**
Secondo, dal momento che lo IUCLID 5.2 obbliga a una specifica standardizzazione, i nuovi test eseguiti in ottemperanza alle regole imposte dal sistema, forniranno dati provenienti da test *in vivo* con una maggiore rilevanza statistica. E poiché la maggior parte dei dossier saranno pubblici disporremo di un enorme data base che potrà essere sfruttato per la futura convalida dei metodi *in vitro*. E' noto, infatti, che la mancanza di dati pubblici è uno dei maggiori impedimenti alla convalida di nuovi metodi *in vitro* (Hartung 2007; Hoffmann et al. 2008).
Per concludere, tuttavia, il ricorso ai metodi *in vitro* potrà aumentare solo se si riuscirà a renderli più attraenti. Ecco alcune proposte:
- IUCLID 5.2 dovrebbe essere aggiornato con l'accettazione ufficiale dei risultati provenienti dai test *in vitro*.
- Bisognerebbe attribuire una qualche forma di ricompensa a coloro che impegnano tempo e risorse nella progettazione di test *in vitro* e ITS. In altre parole: il proposito dichiarato del legislatore di promuovere i metodi alternativi deve tradursi in vantaggi pratici per coloro che li adottano.
- Qualcosa di simile deve essere immaginato anche per i laboratori che lavorano per conto terzi. Alcuni finanziamenti dovrebbero essere garantiti ai laboratori che propongono test alternativi alla sperimentazione con gli animali
- Contemporaneamente dovrebbe essere condotta **una campagna di ampio respiro per aumentare la consapevolezza negli addetti ai lavori e nel pubblico in generale circa la sofferenza degli animali sottoposti a esperimenti e della inaffidabilità dei test *in vivo*. Non dovremmo più ignorare l'aspetto etico del problema, a cominciare dalle persone che sono direttamente coinvolte nella valutazione tossicologica delle sostanze chimiche.**

E' un dato di fatto che al momento non ci sono sufficienti metodi *in vitro* convalidati per far fronte alle richieste normative (Hartung e Daston, 2009). Tuttavia, dovremmo impegnarci maggiormente nell'elaborazione di efficaci strategie di test integrati, che possono migliorare la conoscenza delle proprietà tossicologiche delle sostanze e salvare molti animali da test crudeli. Oltre all'aspetto scientifico, maggiore attenzione va data anche a chi ha bisogno di nuovi test solo per essere in regola con la legge. Aumentare la consapevolezza circa i vantaggi degli approcci *in vitro* non può che portare benefici sia dal punto di vista etico sia da quello scientifico.
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products Official Journal of the European Union L 66, 26-35.

- European Risk Observatory Report (2009). Expert forecast on emerging chemical risks related to

occupational safety and health. http://osha.europa.eu/en/publications/reports/TE3008390ENC_chemical_risks (accessed 30 June 2010).

- ECHA News Alert (2010). IUCLID 5.2 is now available. ECHA/NA/10/04

- Hartung, T. and Daston G. (2009). Are *in vitro* tests suitable for Regulatory use? Toxicological Science 111(2), 233-237.

- Hartung, Tand Rovida, C. (2009). Chemical regulators have overreached. **Nature 460**, 1080-1081.

- Hartung, T. (2007). Food for thought … on validation. ALTEX 24, 67-72.

- Hoffmann, S., Edler, L., Gardner, I. et al. (2008). Points of reference in validation – the report and recommendations of ECVAM Workshop. ATLA 36, 343-352.

- Pedersen, F., de Bruijn, J., Munn, S. and van Leeuwen, K. (2003). Assessment of additional testing needs under REACH – ef¬fects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. JRC Report EUR 20863.
http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/REACH/PUBLICATIONS/REACH_testing_needs_final.pdf (accessed on 26 July 2010).

- Practical Guide 1: How to report *in vitro* data (2010). ECHA-10-B-04-EN.

- Practical Guide 10: How to avoid unnecessary testing on animals (2010). ECHA-10-B-17-EN.

- REACH (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC., 1-849.

- Regulation 134 (2009). Commission Regulation (EC) No 134/2009 of 16 February 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XI. Official Journal of the European Union L 46, 3-5.

- Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006.

- Rovida, C. and Hartung, T. (2009). Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals. ALTEX 26, 187-202.

- van der Jagt, K., Munn, S., Tørsløv, J. and de Bruijn, J. (2004). Alternative approaches can reduce the use of test animals under reach. Addendum to the report: Assessment of additional testing needs under REACH Effects of (Q)SARS, risk based testing and voluntary industry initiatives. JRC Report EUR 21405 EN, http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/REACH/PUBLICATIONS/Reducing_the_use_of_test_animals_under_

REACH_IHCP_report.pdf (accessed 26 July 2010).

- White Paper (2001). Strategy for a future Chemicals Policy. COM 88 final, Brussels, 27.2.2001.

Ringraziamenti
Ringrazio il Professor Dr. Thomas Hartung per aver riletto criticamente questo manoscritto. La mia riconoscenza va anche allo staff del CAAT per la revisione dello scritto e ad Alessandro Buccheri per le figure.

Corrispondenza
Costanza Rovida, CAAT-EU,
University of Konstanz -78457
Konstanz, Germany
costanza.rovida@chimici.it

L'articolo originale in lingua inglese **Food for Thought… Why No New In Vitro Tests Will Be Done for REACH by Registrants** (Per quale motivo nessun nuovo test *in vitro* verrà eseguito nell'ambito del REACH) è uscito su ALTEX 27, 2010. (http://www.altex.ch/en/index.html?id=50&iid=117&PHPSESSID=91ae85dca79a26dd065cd042523f213e&aid=1
Traduzione italiana di Vanna Brocca e Costanza Rovida.
La serie di articoli intitolata "Cibo per la mente" viene pubblicata da ALTEX, il periodico del Centro per le alternative ai test sugli animali (CAAT) la cui sede americana fa capo alla Johns Hopkins University di Baltimora e quella europea all'Università di Costanza, in Germania.