RI-VALUTAZIONE DEL NUMERO DI ANIMALI E DEI COSTI PER I TEST IN VIVO PER OTTEMPERARE ALLE RICHIESTE DELLA LEGGE SULLE SOSTANZE CHIMICHE

RAPPORTO DEL TRANSATLANTIC THINK TANK FOR TOXICOLOGY

Di Costanza Rovida (costanza.rovida@chimici.it) e Thomas Hartung (thartung@jhsph.edu)

1 Introduzione

REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals, vale a dire: Registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche), il nuovo Regolamento europeo in materia di sostanze chimiche, è il più importante investimento mai concepito per quanto riguarda la sicurezza delle sostanze chimiche e dei prodotti al consumatore.

Constatando che non esistono informazioni sui possibili effetti dell'86% circa delle sostanze chimiche in circolazione (*White Paper* 2001, Roe et al. 1997), la legislazione europea del 2006 mira a raccogliere tali dati per tutte le sostanze chimiche prodotte o vendute in quantità pari o superiori a una tonnellata annua (REACH 2006). Negli Allegati, la legge specifica le informazioni che sono richieste per ogni sostanza chimica, classificandola in base alla quantità prodotta o venduta annualmente. Negli anni che hanno preceduto la stesura finale della legge, tra il 2001 e il 2005, ci sono stati diversi tentativi di stimare il costo del REACH sia in termini finanziari (vedi per esempio Pedersen et Al. 2003, RPA & Statistics 2002) sia per quanto riguarda il numero di animali necessari alla sperimentazione (*IEH Report*, 2001, van der Jagt et al., 2004, Hofer et al., 2004). Ma da allora niente di simile è più stato tentato.

Adesso, diverse fonti d'informazione ci permettono di rivedere le stime esistenti:

1. Il Regolamento è stato completato con la modifica di alcuni dei test richiesti (REACH, 2006).

2. L'Unione Europea si è allargata fino a comprendere 27 Stati membri anziché 12 (tre Paesi il primo gennaio 1995, 10 Paesi il primo maggio 2004 e altri due Paesi il primo gennaio 2007), cosa che modifica i dati precedenti il 1994 utilizzati negli altri studi.

3. Si registrano alcuni progressi nello sviluppo dei metodi alternativi.

4. Produttori e distributori dispongono di una nuova guida ai test in base alle richieste d'informazione contenute nel Regolamento (ECHA, 2008 a-c, Regulation 440/2008).

5. La pre-registrazione delle sostanze da parte delle aziende si è conclusa nel dicembre 2008.

6. Altri programmi sulla sicurezza delle sostanze chimiche prodotte in grandi quantitativi, sviluppati nel frattempo, ci forniscono nuovi dati e quadri di riferimento.

Sulla scorta di queste fonti d'informazione, abbiamo rivisto le stime che riguardano il fabbisogno di test in vivo.

2. Considerazioni sulla pre-registrazione delle sostanze chimiche

Il REACH chiede che vengano registrate sia le singole sostanze chimiche, sia quelle presenti nei composti, sia, ancora, quelle intenzionalmente rilasciate dai prodotti in commercio. Le registrazioni vengono sottoposte all'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA) e riguardano tutte le sostanze prodotte o importate nell'Unione Europea in quantità di una o più tonnellate all'anno. Tuttavia, le sostanze destinate ai prodotti medicinali per uso umano o veterinario o al cibo e al mangime per animali, e quelle relative a pochi altri casi specifici – per esempio le sostanze elementari (O2, N2, ecc.) e le sostanze esistenti in natura che non sono state chimicamente modificate - non hanno l'obbligo della registrazione (Articolo 2, Allegati IV e V).

L'applicazione del REACH ha preso il via nel giugno 2007, con la pubblicazione dei termini per la registrazione delle sostanze (Tabella 1). Il REACH distingue anche tra sostanze *phase-in* e *non-phase-in*. Per sostanze *non-phase-in* si intendono tutte le sostanze che sono state notificate in base alla Direttiva sulle Sostanze Pericolose 67/548/EEC e le sostanze introdotte sul mercato dopo l'applicazione del REACH. Si sottovaluta spesso il fatto che il REACH, con i nuovi requisiti che introduce nella sperimentazione, si applica anche a tutte le nuove sostanze chimiche che vengono notificate. Sostanze *phase-in* sono invece le sostanze che circolavano nella Comunità europea prima del 18 settembre 1981 ("sostanze chimiche esistenti") e quelle precedentemente designate come polimeri e non più considerate tali. Queste tre categorie, escludendo le sostanze chimiche di nuova introduzione, sono classificate nell'ESIS (European Chemical Substances Information System, Sistema informativo europeo sulle sostanze chimiche) rispettivamente in base al codice di registrazione ELINCS

(European List of Notified Chemical Substances, Inventario europeo delle sostanze chimiche notificate), al codice EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances, Registro europeo delle sostanze chimiche in commercio), e al codice NPL (No Longer Polymer, Non più polimeri).

Il REACH prevede una diversa scadenza per la registrazione delle sostanze in base alla quantità prodotta o in circolazione (Tabella 1). La fase di pre-registrazione si è ormai conclusa e dovrebbe essere in corso la preparazione di un dossier di registrazione per ogni singola sostanza pre-registrata.

Il 18 dicembre 2008 (comunicato stampa ECHA, 2008) l'ECHA ha pubblicato un primo elenco di sostanze in base alla loro data di pre-registrazione. Circa 65.000 aziende hanno effettuato 2.750.000 di pre-registrazioni, un numero di gran lunga superiore alle 180.000 pre-registrazioni di 27.000 società previste originariamente (ECHA Memo, 2008). Facendo riferimento a una specifica scadenza di registrazione, le aziende segnalano il probabile volume di produzione e commercio delle sostanze chimiche che denunciano. L'ECHA ha eseguito uno screening delle sostanze registrate mettendo a confronto i composti con gli stessi numeri EC o CAS, cancellando quindi alcuni articoli. Nell'ultima lista pubblicata (Comunicato stampa ECHA, 2009) sono elencate 143.835 sostanze. Per 54.686 di queste il termine di registrazione scade nel 2010; per 59.599 nel 2013; e per 29.550 nel 2018. Sono numeri alquanto diversi da quelli pubblicati in altri studi sull'applicazione del REACH. In particolare, la maggior parte del lavoro svolto in preparazione del REACH era basato su un rapporto scritto da Pedersen et al. (2003). Le loro stime (Tabella 2) si fondavano sui dati riportati dallo IUCLID (International Uniform Chemical Information Database), che contiene informazioni sulle sostanze chimiche prodotte nell'Unione Europea tra il 1991 e il 1994. Anche se non disponiamo di cifre ufficiali, sembra evidente che si sia verificato un rilevante eccesso di pre-registrazioni da parte di laboratori a contratto, consulenti e altre società che intendono sfruttare questo strumento per ottenere informazioni di tipo economico. E tuttavia, questo elemento da solo non spiega il grande numero di pre-registrazioni effettuate.

E' degno di nota che le pre-registrazioni del 2008 siano molto più vicine come numero alle stime elaborate nel 2002 da *RPA and Statistics Sweden* sulla base di un questionario sottoposto ad aziende, autorità competenti e associazioni circa la produzione, l'importazione o l'uso di sostanze chimiche. Tale questionario era riuscito a documentare oltre alle sostanze EINECS, circa 30.000 nuove sostanze immesse sul mercato ogni anno e altre 100.000 sostanze intermedie isolate annualmente nell'Unione Europea. Le sostanze intermedie possono venire classificate nell'ESIS ma senza informazioni circa la quantità. La maggior incertezza nel rapporto di *RPA and Statistics* riguardava le quantità prodotte di ciascuna sostanza. All'incirca il 23% delle sostanze intermedie che vengono immesse sul mercato generano una certo grado di doppio conteggio. Per questo motivo, il rapporto RPA delinea quattro possibili scenari come si vede nella Tabella 3. I numeri degli scenari 3 e 4 sono più vicini all'effettivo numero di sostanze chimiche pre-registrate.

La sottostima delle sostanze che sarebbero poi state pre-registrate si deve a diverse ragioni.

1. Il rapporto di Pedersen et al. (2003) si fonda sullo IUCLID, che contiene informazioni sulle sostanze chimiche prodotte nell'Unione Europea in volumi di ≤10 tonnellate /anno nel periodo 1991-1994

2. Il rapporto non comprende le sostanze presenti nello IUCLID ma classificate come NLP (Non più polimeri). Alla fine anche le sostanze NLP devono essere pre-registrate. Secondo le regole di notifica delle nuove sostanze (Direttiva 67/548/EEC), i polimeri sono soggetti a regole speciali. Il termine polimero è stato ulteriormente definito nel 7° Emendamento della Direttiva 92/32/EEC, 1992). Questa modifica ha portato a non poter più considerare come polimeri certe sostanze che inizialmente erano state escluse dall'EINECS. Oggi per le sostanze NLP è richiesta la stessa pre-registrazione delle sostanze EINECS. E con ciò si aggiungono altre 700 sostanze circa alla pre-registrazione, anche se siamo ancora in un quadro di sottovalutazione dal momento che le notifiche dei NLP era su base volontaria.

3. I due rapporti di cui sopra (Pedersen et Al. 2003, RPA & Statistics 2002), compilati prima della pubblicazione ufficiale del REACH, si fondano su versioni non definitive del Regolamento. Per esempio, nessuno dei due contempla le sostanze intenzionalmente rilasciate dagli articoli, anche se queste sostanze ridurranno la possibilità di esonero per assenza di esposizione piuttosto che aumentare il numero complessivo di sostanze chimiche in circolazione.

4. Entrambi i rapporti si basavano su informazioni raccolte entro i confini dell'Unione Europea quando ne facevano parte soltanto dodici Stati membri, prima del 1995. Al momento dell'implementazione del Reach, l'UE comprendeva invece 27 Paesi e per giunta la regolamentazione viene applicata anche nella EEA (Area economica europea), che comprende altri tre Paesi, per un totale quindi di 30 Paesi.

5. Secondo il CEFIC (European Chemical Industry Council, 2009), negli anni 2002-2007 la vendita di sostanze chimiche è cresciuta un po' più lentamente del consumo (4,5% versus 5,2%). La crescita media delle importazioni negli ultimi cinque anni (7%) ha superato di parecchio quella delle esportazioni (3,6%). Stando ai

dati dello IUCLID, un tasso di crescita annuale intorno al 5% si traduce in una crescita del 97% dal 1994 alla preregistrazione del 2008.

Abbreviazioni e glossario

CAAT – Center for Alternative to Animal Testing presso la Johns Hopkins University di Baltimora, Usa.

CAS NUMBER o NUMERO CAS – Chemical Abstracts Service: identificativo numerico che individua in maniera univoca un composto chimico, assegnato dalla American Chemical Society a ogni sostanza chimica descritta in letteratura (elementi, composti, polimeri, leghe, ecc.)

CEFIC – European Chemical Industry Council

CMR – Sostanze cancerogene, mutagene, tossiche per la riproduzione

CRO – Contract Research Organisation

CSA – Chemical safety assessment. Valutazione del rischio chimico richiesta da REACH nella fase di registrazione di una sostanza

CSR – Chemical safety report. Rapporto sulla sicurezza chimica della sostanza richiesto dall'ECHA al produttore o importatore della sostanza

ECETOC – European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals

ECHA – European Chemical Agency. Agenzia europea per le sostanze chimiche, Helsinki, Finlandia

EC NUMBER - European Commission number: è un codice di sette cifre assegnato alle sostanze chimiche in circolazione nell'Unione europea

EDC – Endocrine disruptors, sostanze che alterano la funzionalità del sistema endocrino

EINECS – Europea Inventory of Existing Commercial Chemical Substances

ELINCS – Europea List of Notified Chemical Substances

EPA – US Environmental Protection Agency

ESIS – European Chemical Substances Information System

HPV - High Production Volume chemicals

HPVIS – High Production Volume Information System, database dell'Epa americana

IEH – Institute for Environment and Healt, Cranfield University, UK

IN SILICO – Studi tramite simulazione matematica al computer

IN VITRO – Studi/esperimenti effettuati in provetta

IN VIVO – Esperimenti con gli animali

ITS – Integrated Testing Strategy

IUCLID – International Uniform Chemical Information Database

NLP - No Longer Polymer (non più polimero)

NTP - National Toxicology Program, USA

OECD / OCSE – Organisation for Economic Co-operation and Development/Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (Trenta paesi membri)

PBT - Persistent Bioaccumulative and Toxic Chemicals, sostanze persistenti bioaccumulanti e tossiche

PMI – Piccole e medie imprese

(Q)SAR Quantitative Structure Activity Relationship (tossicologia tramite computer, metodo in silico)

SOSTANZE INTERMEDIE – sostanze fabbricate, consumate o utilizzate per essere trasformate mediante un processo chimico (sintesi) in un'altra sostanza

SOSTANZE NON PHASE IN - Tutte le sostanze notificate in accordo al regolamento Ce 67/548 e sostanze immesse sul mercato successivamente all'entrata in vigore di REACH.

SOSTANZE PHASE-IN – tutte le sostanze in circolazione nel Mercato comune europeo prima del 18 settembre 1981 ('sostanze chimiche esistenti') e quelle precedentemente designate come polimeri ma giudicate non più tali, ovvero NLP

UVCB – Sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti o materiali biologici di reazioni complesse

Tabella 1. Elenco delle scadenze REACH

CMR: sostanze carcinogene, mutagene e tossiche nella riproduzione

Data	Evento
30 dicembre 2006	**Pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale**
1 giugno 2007	**Entrata in vigore**
1 giugno 2008	**Inizio della pre-registrazione delle sostanze phase-in**
1 dicembre 2008	**Conclusione della fase di pre-registrazione**
1 dicembre 2010	**Termine per la Registrazione delle sostanze che ricadono nelle disposizioni dell'Allegato X:** **>1000 t/a;** **>100 t/a (sostanze che possono causare effetti avversi sull'ambiente, classificate come R50/53 secondo la Direttiva 67/548/EC);** **>1 t/a (sostanze classificate come CMR, categoria 1 o 2, secondo la Direttiva 67/548/EC**
1 giugno 2013	**Termine per la Registrazione delle sostanze che ricadono nelle disposizioni dell'Allegato IX**
1 giugno 2018	**Termine per la Registrazione delle sostanze che ricadono nelle disposizioni degli Allegati VII e VIII: > 1 t/a**

Tabella 2. Confronto fra il numero delle sostanze pre-registrate e le previsioni di Pedersen et al. (2003)

Fonte: ECHA, comunicati stampa 2008 e 2009; Pedersen et al. 2003

Data di Registrazione	Pre-registrate	Pedersen et al.	
1 dicembre 2010	**54.686**	**2.704**	**> 1000 t/a**
1 giugno 2013	**59.599**	**2.461**	**> 100 t/a**
1 giugno 2018	**29.550**	**24.177**	**> 1 t/a**
Totale	**143.835**	**29.342**	

Tabella 3. Numero totale di sostanze chimiche che richiedono la registrazione nell'ambito del REACH secondo le stime di RPA & Statistics, 2002

Numero previsto di registrazioni	
33.865	**Scenario 1 : basso numero di sostanze chimiche e nessun intermedio**
76.365	**Scenario 2: basso numero sia di sostanze chimiche che di intermedi**
93.365	**Scenario 3: numero medio sia di sostanze chimiche che di intermedi**
118.865	**Scenario 4: alto numero sia di sostanze chimiche che di intermedi**

Fonte: ECHA, Comunicati stampa 2008 e 2009

Data di registrazione	Numero delle sostanze pre-registrate	
1/12/2010	EINECS 47.166 ELINCS 1.730 NLP 692 Altre 5.098	
1/6/2013	EINECS 53.038 ELINCS 2.097 NLP 10 Altre 4.454	
1/6/2018	EINECS - ELINCS - NPL - Altre 29.550	

Tabella 5. Elenco delle sostanze pre-registrate secondo la data di registrazione

Fonte: ECHA, Comunicati stampa 2008 e 2009. L'elenco non comprende le sostanze registrate in ritardo

Data di registrazione	Sostanze non phase-in	Sostanze phase-in	Non classificate	Totale
30/11/2010	1.730	47.858	5.098	54.686
31/5/2013	2.097	53.048	4.454	59.599
31/5/2018	-------	------	29.550	29.550
Totale	3.827	100.906	39.102	143.835

Tabella 6. Sostanze pre-registrate senza una preesistente classificazione in ESIS, secondo la data di registrazione

Fonte: ECHA, comunicati stampa 2008 e 2009

Scadenza registrazione	Con numero CAS	Senza numero CAS	Totale senza un regolare numero EC
1/12/2010	765	4.333	5.098
1/6/2013	1.394	3.060	4.454
1/6/2018	14.928	14.622	29.550
Totale	17.087	22.015	39.102

2.1 Analisi delle sostanze pre-registrate

L'elenco fornito dall'ECHA comprende, per ogni sostanza pre-registrata, il numero EC, il numero CAS, il nome chimico, e la prima data di registrazione. Ciò consente un'analisi più dettagliata per stabilire se tutte le sostanze dell'elenco intero avranno una registrazione completa e quanti test saranno necessari per ottemperare al Chemical Safety Report (CSR – Report di sicurezza chimica), come richiesto negli Allegati VII-X. La prima cifra del numero EC indica se la sostanza chimica si trova nell'elenco EINECS oppure ELINCS oppure NLP. L'EINECS contiene tutte le sostanze chimiche ufficialmente registrate come presenti sul mercato europeo tra il primo gennaio 1971 e il 18 settembre 1981, per un totale di 100.204 sostanze. Tutte le sostanze immesse nel mercato europeo dopo il 18 settembre 1981 sono classificate come "nuove" sostanze chimiche elencate nel database ELINCS, per un totale di 4.381 sostanze. Queste ultime sono già state notificate in base alla Direttiva 67/548/EEC e l'intero dossier può essere accettato come registrazione al REACH senza la necessità di ulteriori test in vivo.

Il numero EC consente di identificare a quale categoria appartiene una determinata sostanza chimica, dal momento che tutte le sostanze EINECS cominciano con "2", tutte quelle ELINCS cominciano con "4" e tutte quelle NLP cominciano con "5". In base a questi dati, le sostanze chimiche pre-registrate sono state suddivise e raggruppate come si vede nella Tabella 4, che fornisce i numeri per tutte le sostanze precedentemente classificate nel database ESIS che sono state pre-registrate, con l'aggiunta di alcune sostanze che non hanno un numero EC e di conseguenza non erano state prese in considerazione nelle stime precedenti.

Considerando le sostanze EINECS e NLP come sostanze di tipo *phase-in*, quelle ELINCS come sostanze *non-phase-in*, e le sostanze non classificate come "altre", le sostanze pre-registrate possono essere ulteriormente raggruppate come risulta dalla Tabella 5.

La maggior parte delle sostanze ELINCS sono state pre-registrate (3.827 sostanze *non-phase-in* contro 4.381 sostanze dell'elenco ELINCS). L'alto numero di pre-registrazioni può essere facilmente spiegata come una misura precauzionale adottata prevalentemente da utilizzatori a valle di tali sostanze. Le sostanze non-phase-in richiederanno una valutazione extra soltanto nel caso di un loro utilizzo in un nuovo ambito tale da esigere una nuova valutazione. Ragionevolmente, si può pensare che questo accada per un numero limitato di sostanze. Tuttavia, se dalla notifica originaria nel corso degli ultimi 27 anni la produzione è aumentata, potrebbero emergere nuove richieste di informazione. Questo potrebbe rivelarsi vero soprattutto per le nuove sostanze chimiche per le quali si suggerisce la scadenza del 2010, in quanto significa che il dichiarante ha volumi di produzione più grandi o specifici motivi di preoccupazione, tali da richiedere ulteriori test non richiesti abitualmente per le nuove sostanze chimiche.

Il numero delle sostanze *phase-in* è esattamente lo stesso di quelle contenute negli elenchi EINECS e NLP, con la sola eccezione di una sostanza NLP. E' singolare che nessuna di loro appartenga alla categoria di tonnellaggio inferiore, cioè quella con scadenza del 2018. Le sostanze "altre" sono quelle che non avevano un numero EC durante la pre-registrazione e alle quali ne è stato attribuito uno nuovo. Per rendere la registrazione più semplice, ECHA ha assegnato i nuovi numeri EC facendo cominciare per "6" le sostanze che non possedevano in precedenza alcun numero EC ma avevano un numero CAS (classe 6-EC), per "9" le sostanze che in precedenza non avevano né un numero EC né un numero CAS (classe 9-EC). I dati relativi a queste sostanze si trovano nella Tabella 6.

L'esistenza di 22.015 sostanze senza una precedente classificazione (né EC né CAS) è sorprendente, a maggior ragione dal momento che 4.333 di esse sembrano essere presenti sul mercato europeo in misura superiore alle 1000 tonnellate/anno, cosa che ci riporta al termine del 2010 per la registrazione. Un campione rappresentativo di tali composti viene analizzato più avanti.

2.2 Valutazione qualitativa

Dopo una valutazione del numero di sostanze pre-registrate in ambito REACH, è importante procedere a una valutazione qualitativa su che cosa esattamente figuri in questa lista. Come si legge nel capitolo dedicato alle

definizioni (REACH, articolo 3), per sostanza si deve intendere "un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale o ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal processo utilizzato". Stando a questa definizione, la medesima sostanza può essere inclusa in diversi elenchi, cosa che può spiegare l'altissimo numero di sostanze pre-registrate.

Diverse società o singoli individui hanno certamente abusato dello strumento della pre-registrazione, perché la pre-registrazione di una sostanza dà loro il diritto di partecipare al forum responsabile della registrazione di quella medesima sostanza (SIEF). Tra questi ci sono le organizzazioni di ricerca a contratto –(Contract Research Organisations, CRO) che vogliono proporre nuovi test per quella sostanza, consulenti che mirano ad essere coinvolti nel processo di registrazione, concorrenti che puntano ad acquisire informazioni sulla sostanza, e così via.

Tuttavia, a determinare il gran numero di pre-registrazioni sono stati certamente in primo luogo gli errori commessi dai dichiaranti. Infatti c'è il diffuso timore che REACH possa condurre alla chiusura delle società che non ottemperano ai requisiti del nuovo regolamento. Nell'Unione Europea la maggior parte delle società che operano nel settore chimico sono piccole o medie imprese (PMI), che si occupano in prevalenza di preparati o articoli manufatturati e che in genere non hanno alcuna specifica competenza in fatto di tossicologia chimica. Al presente non esistono dati ufficiali, ma è noto che parecchi degli utilizzatori a valle hanno registrato le sostanze che utilizzano, pur se acquistate in Europa. Un altro elemento da tenere presente è la presenza di tutte le sostanze già classificate nel database di ELINCS mentre era stato chiaramente specificato che per le sostanze *non-phase-in* (vale a dire le sostanze presenti nelle liste ELINCS) non occorreva la pre-registrazione.

Sul suo sito internet, ECHA ipotizza sui possibili motivi che hanno erroneamente portato alla pre-registrazione di almeno 14.000 sostanze, e tra questi annovera una cattiva conoscenza dell'inglese (l'unico linguaggio ammesso per la pre-registrazione) e all'introduzione di tutti i componenti delle miscele anche da parte degli utilizzatori a valle (ECHA, comunicato stampa 2009). ECHA ha già scremato alcune delle registrazioni iniziali (ECHA, comunicato stampa 2008) ma non ha nessuna autorità per cancellare le richieste senza un opportuno coinvolgimento del registrante.

Al fine di capire meglio le ragioni di questi inserimenti non corretti, abbiamo selezionato una campionatura casuale tra le 39.102 sostanze prive di numero EC. E' difficile ragionare su ogni singola sostanza. Infatti solo a coloro che hanno pre-registrato una sostanza è consentito accedere al database dell'ECHA, che può fornire ulteriori informazioni. Alcuni esempi tra i casi selezionati a caso includono:

Sostanze senza una precedente classificazione EC ma con un numero CAS (classe 6-EC):

a. EC 606-203-6, CAS # 1902-01-8 *Butanoic acid, 2,4-dihydroxy-3,3-dimethyl-, monosodium salt*: la forma acida di questa sostanza chimica è l'acido pantoico, componente del coenzima A. Lo stesso acido pantoico non risulta pre-registrato. Anche se mancano le prove, si tratta presumibilmente di una sostanza farmaceutica intermedia che va registrata se prodotta in quantità superiore alle 1000 tonnellate all'anno.

b. EC 616-851-1, CAS # 8005-02-5 C.I. *Solvent Black 7*: si tratta di un colorante alimentare e non rientra nella casistica del REACH (articolo 2). Ci sono una ventina di sostanze registrate come Solvent Black, tutte egualmente prive di numero EC.

c. EC 618-464-3, CAS # 9011-05-6 *Urea, polimero con formaldeide*: il suo nome comune è Polynoxylin e viene utilizzato come antisettico topico. In quanto prodotto farmaceutico non rientra nella casistica del REACH (articolo 2).

Sostanze prive di numero CAS e EC (classe 9-EC):

a. EC 921-055-5, *Pig iron*: Pig iron (ghisa di prima fusione) è il prodotto intermedio della fusione del metallo di ferro con carbone/coke per ottenere una forma più pura di ferro, ed è già presente con un altro nome e relativi numeri CAS e EINECS (CAS 65996-67-0, EINECS 265-998-4, Iron, furnace/altoforno).

b. EC 923-825-6, *Pépins de raisin*: è il nome francese dell'olio di semi di vinaccioli. Esistono numerose registrazioni relative alla lavorazione dell'uva, alcune delle quali diverse solo per lo spelling, come per esempio *Pulpe de raisin* (EC 924-336-0), *Pepin de raisin* (EC 920-890-2) e altri ancora. Stando all'Allegato V del REACH tutti gli estratti e i prodotti naturali sono esentati dalla registrazione.

c. EC 924-1080, *Reaction product of cement clinker, calcium sulphate, water and either ashes (residues or slags, ferrous metal, blast furnace)*: capire il significato di questa registrazione è impossibile. Presumibilmente ha a che fare con un processo di recupero. Ma questo capitolo del REACH è ancora vago e una nuova guida sugli scarti e le sostanze di recupero (about waste and recovered substances) è

attesa a breve termine. Ci sono una ventina di registrazioni con nomi di sostanze molto simili, diverse solo per alcune lettere, chiaramente riferite tutte allo stesso prodotto.

d. EC 917-706-8 *Eisen* : definizione di sostanza totalmente inadeguata.

Tra le sostanze della classe EN 9 ci sono 13.692 registrazioni con il nome della sostanza che inizia con "reaction mass" (massa di reazione). D'altra parte, una ricerca sulle sostanze registrate come "reaction product" (prodotto di reazione) fornisce 4.468 registrazioni. Queste ultime sono considerate come *sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di reazioni complesse e materiali biologici* (UVCB). Per le UVCB occorre identificare e descrivere tutti i componenti presenti in misura superiore al 10%. Inoltre, l'origine del prodotto deve essere perfettamente descritta. E' possibile che questi dati siano già presenti nell'inserimento completo della sostanza, che però è accessibile solo all'ECHA e ai registranti.

2.3 Ulteriori considerazioni sul numero delle pre-registrazioni

Dalla Tabella 5 si evince che le 100.906 sostanze EINECS più le 39.102 sostanze non classificate portano a un totale di 140.008 sostanze chimiche che possono richiedere prolungati test per essere registrate. Si tratta di un numero molto più grande di quello preventivato (29.342), e comprendere la ragione di questo enorme divario è della massima importanza.

REACH trae origine dal libro bianco "*Strategie per una futura politica delle sostanze chimiche*" presentato nel 2001 (*Libro Bianco*, 2001). Questo primo documento menzionava solo le sostanze chimiche degli elenchi EINECS ed ELINCS. Oggi il REACH comprende anche gli intermedi isolati, le sostanze presenti nelle miscele importate e quelle intenzionalmente rilasciate dagli articoli. Le precedenti stime circa l'impatto del REACH sull'economia dell'Unione europea si basavano sul *Libro Bianco* e su altre analisi, generalmente simili. Il regolamento definitivo è stato pubblicato il 30 dicembre 2006.

Con ogni probabilità questo spiega come mai le prime stime prevedessero che non sarebbero state registrate più di 29.342 sostanze (Tabella 2). A queste devono essere subito sommati tutti i NLP, che però sono solo 703 e aumentano di poco il numero delle sostanze portandolo a circa 30.000.

In aggiunta alla stima di 30.000 sostanze, le sostanze intermedie isolate possono essere molto importanti, anche se tipologia e ammontare della produzione non risultano da nessuna parte. RPA & Statistics (2002) nella sua ricerca ha contato almeno 85.000 possibili sostanze intermedie che devono essere registrate. Considerando queste ultime si arriva a 115 mila sostanze, una cifra ancora molto lontana dal numero delle sostanze che sono state effettivamente preregistrate. Occorrerà guardare altrove per trovare le sostanze che mancano all'appello. Anche se la pre-registrazione delle sostanze intermedie isolate è obbligatoria, se poi non vengono immesse sul mercato sono esentate dalla preparazione di un dossier, e nel caso di condizioni di utilizzo strettamente controllate, necessitano di un numero di dati ridotto. Il numero degli intermedi che richiedono una registrazione è difficile da calcolare ma probabilmente, soprattutto nel caso di tonnellaggi elevati, si verifica per molte delle sostanze chimiche di base utilizzate per sintetizzare prodotti di chimica fine.

Il REACH considera sostanze *phase-in* le sostanze chimiche che circolavano nella Comunità Europea prima del 1981 e registrate nello IUCLID (International Uniform Chemical Information Database). Questo spiega perché i primi lavori di valutazione prendono in considerazione le sostanze che erano presenti nello IUCLID nel periodo 1991-1994. Per quanto questa stima sia corretta da un punto di vista qualitativo, poiché l'EINECS contiene oggi lo stesso numero di sostanze chimiche, da un punto di vista quantitativo sottostima in modo radicale la quantità di ogni sostanza chimica che circola attualmente nell'Unione Europea. In teoria, il quadro delineato dallo IUCLID per gli anni 1991-1994 dovrebbe combaciare con la realtà odierna, dal momento che tutte le nuove sostanze chimiche sono state registrate in ELINCS. Il fatto, però, è che non considera il contributo dato dalla crescita percentuale dell'industria chimica e i successivi allargamenti della UE avvenuti nel 1995 con l'ingresso di Austria, Svezia e Finlandia, nel 2004 con la Repubblica Ceca, l'Estonia, l'Ungheria, la Lettonia, la Lituania, la Polonia, la Slovacchia, la Slovenia, Malta e Cipro, e nel 2007 con l'inclusione di Bulgaria e Romania. In aggiunta, il REACH si applica anche ai paesi dell'Area Economica Europea, che comprende anche Norvegia, Liechtenstein e Islanda.

Quantificare i dati relativi a questi Paesi è molto difficile perché le fonti di informazione sono difficilmente accessibili. Tuttavia, è noto (Angerer et al., CEFIC, 2009) che l'industria chimica gioca un ruolo importante nell'economia di alcuni dei nuovi stati membri dell'UE. Il flusso commerciale della maggior parte di quei paesi si svolgeva con la Russia e i paesi dell'Est piuttosto che con l'Europa dei 15; vale a dire, essi contribuivano in misura molto limitata al mercato chimico dell'UE-12 del 1991. E come se non bastasse, la maggior parte della

produzione si concentrava sulle "sostanze chimiche di base" piuttosto che sui prodotti di chimica fine. Esse differiscono sia per il volume che per la funzione, poiché i prodotti di chimica fine vengono fatti in quantità minori e per usi specifici. E' ragionevole supporre che le sostanze chimiche di base siano tutte presenti nel registro EINECS, aumentando il volume delle sostanze chimiche attualmente in circolazione nell'UE.

Infine, il tasso di crescita media annua dell'industria chimica era molto più alto nella maggior parte dei nuovi Stati membri (Polonia, Repubblica Ceca, Estonia) di quanto non lo fosse nei vecchi Stati membri (Angerer et al., 2007, CEFIC, 2009). Stando al CEFIC (Consiglio dell'Industria chimica europea, 2009), nel 2007 le vendite del settore chimico nell'Europa dei 15 ammontavano a 501 miliardi di euro contro i 94,5 miliardi nel resto dell'Europa. Considerando che nel 1993 l'Austria, la Finlandia e la Svezia non erano ancora incluse nell'UE e che alcuni dei paesi non rientravano nel REACH, un tasso di crescita del 18% del fatturato dell'industria chimica sembra realistico.

2.4 Conclusioni sul numero delle registrazioni previste

Le informazioni di cui si dispone attualmente sono insufficienti per valutare in modo preciso le sostanze chimiche che richiederanno un ulteriore set di test in vivo per preparare il dossier di registrazione. Ma si può azzardare una stima approssimativa.

Tutte le sostanze che hanno un numero ELINCS sono state registrate e, in generale, dispongono di tutto quel che serve per ottemperare ai requisiti del regolamento REACH. Per questo motivo non vengono considerate in questo studio, anche se alcune di loro potranno richiedere un'ulteriore valutazione. Sono escluse anche le sostanze che appartengono alle categorie EC "6" e "9" perché gli esempi illustrati in precedenza hanno mostrato che la maggior parte di loro non rientrano nella casistica REACH oppure sono già state pre-registrate con un altro nome e un appropriato numero EN. Naturamente, l'eliminazione di queste due categorie - sostanze della lista ELINCS e sostanze con numero 6/9 – dal novero delle sostanze che richiedono ulteriori test in vivo non è del tutto corretta. Tuttavia, queste due omissioni dovrebbero essere controbilanciate dal numero delle sostanze considerate in questo studio che verranno cancellate dalla registrazione o saranno registrate a un livello di tonnellaggio più basso. L'omissione di tutte le sostanze che non risultano precedentemente registrate nel sistema informativo ESIS porta sicuramente a una grande sottovalutazione del numero totale di registrazioni che verranno richieste.

Tutte le sostanze *phase-in* pre-registrate, cioè le sostanze classificate nei database EINECS e NLP, sono state incluse nella valutazione, dando per scontato che i produttori ne conoscano le quantità prodotte e commercializzate. Questo totale di 100.906 sostanze sarà diviso come segue:

- 47.858 sostanze presenti nella UE in quantità superiore alle 1000 tonnellate/anno, ricadenti nelle disposizioni dell'Allegato X del REACH
- 53.048 sostanze chimiche presenti nella UE in quantità superiori alle 100 tonnellate/anno, ricadenti nelle disposizioni dell'Alegato IX del REACH

Questo può essere considerato uno scenario abbastanza realistico circa il numero di sostanze chimiche che dovranno essere registrate con un Rapporto sulla sicurezza chimica (CSR/CSA).

Un altro approccio consiste nel partire dal numero di sostanze chimiche ipotizzato in Pedersen et al. (2003), che si fonda su un quadro realistico della situazione nell'Unione Europea negli anni 1991-1994 e aumentare queste cifre di un fattore che deriva dalla crescita dell'industria chimica come descritta dal CEFIC (2009), vale a dire un fattore pari a 1,97 dovuto alla crescita generale dell'industria chimica più un fattore pari a 1,18 dovuto all'allargamento dell'UE (vedi sopra). Anche questo approccio comporta una sottovalutazione delle cifre complessive, dal momento che non vengono prese in considerazione né gli intermedi isolati né le sostanze che vengono intenzionalmente rilasciate dagli articoli. Le UVCB sono sostanzialmente escluse da tutti questi calcoli. Presumibilmente, esse sono per la maggior parte miscele di altre sostanze chimiche conosciute e possiamo aspettarci un rilevante utilizzo delle operazioni di raggruppamento e read-across.

Tutte queste considerazioni sono riassunte nella Tabella 7. E' probabile che la realtà si collochi tra gli scenari 2 e 3 di questa Tabella, con un numero totale di sostanze chimiche da registrare che oscilla tra le 68.000 e le 100.000.

3. Numero di test tossicologici in vivo

Le tipologie dei test tossicologici in vivo richiesti dal rapporto di sicurezza chimica (CSR) per ogni sostanza chimica sono descritti nei vari Allegati REACH, come evidenziato dalla Tabella 8. Il tipo di test richiesti è più specificatamente determinato dalla produzione totale o dal volume commercializzato e adattato in base agli usi previsti o alla tossicità rilevata. REACH richiede immediatamente i risultati dei test descritti negli allegati VII e VIII, mentre i test che rientrano nella casistica descritta negli Allegati IX e X sono proposti dal dichiarante ed eseguiti solo dopo che hanno ricevuto l'autorizzazione dall'ECHA.

L'allegato VII esclude il CSR e richiede, come test in vivo, soltanto sensibilizzazione della pelle e tossicità acuta. Lo studio di tossicità acuta per via orale viene esteso dall'Allegato VIII ad una somministrazione per via, cutanea o per inalazione. Inoltre, il test di tossicità ripetuta a breve termine può richiedere ulteriori studi nel caso ci fossero indicazioni tossicologiche particolarmente preoccupanti. Non c'è bisogno dello screening di tossicità sul sistema riproduttivo quando viene richiesto uno studio completo. Per questo endpoint uno studio di tossicità nello sviluppo viene eseguito su una seconda specie in base ai risultati del primo test e di tutti gli altri dati disponibili di rilievo. Il test di irritazione della pelle è ancora citato nell'Allegato VII, anche se non è più obbligatorio dal momento che le alternative in vitro sono pienamente accettate.

In realtà, REACH richiede molti altri test, come quelli per la valutazione delle proprietà chimico-fisiche, test in vitro e test in vivo su piante e invertebrati. Tutti questi test non rientrano nell'ambito del presente studio. REACH fa anche riferimento a rischi quali la sensibilizzazione dell'apparato respiratorio, le alterazioni del sistema endocrino, problemi legati allo sviluppo del sistema neurologico, ma poiché non figurano negli Allegati non sono stati presi in considerazione.

Se tutte le sostanze pre-registrate richiedessero test in vivo, i costi finali e il numero degli animali sacrificati sarebbe enorme. L'effettivo numero di test sarà il risultato di diversi fattori, tra i quali:

- L'informazione esistente e disponibile: alcune sostanze sono già state testate e/o comprese in altre normative, che forniscono un livello equivalente di protezione (per esempio la Biocidal Products Directive, la Medicinal Products Directive, il US High Production Volume chemical program). Nel REACH c'è l'obbligo di utilizzare qualsiasi informazione e di condividere qualsiasi risultato disponibile se ottenuto con un test in vivo.
- Esoneri: talvolta l'applicabilità di un test dipende dalle proprietà chimico-fisiche della sostanza. Altri test sono determinati dai risultati di un test precedente.
- Alcuni dei test previsti negli Allegati più alti possono essere omessi in base a considerazioni sulla effettiva esposizione alla sostanza. Le disposizioni circa questa possibilità sono state aggiornate di recente (Regulation 134, 2009).
- (Q)SAR e cioè Quantitative Structure Activity Relationship, grouping, metodo read-across: un modello teorico può predire le proprietà di una sostanza (QSAR, approccio in silico, vedi anche articolo di Hartung e Hoffmann nel numero 26, 3/9 di *Altex*), oppure una serie di sostanze che appartengono alla stessa classe chimica possono essere raggruppate e si procede a testarne una sola (grouping), oppure le proprietà di una sostanza possono essere derivate dall'informazione esistente per una sostanza simile (read-across).
- Metodi in vitro e altri approcci alternativi sono accettati quando opportuni, come specificato nell'Allegato XI.

Le strategie di riduzione dei test eseguiti per ciascuna sostanza è bene accetta al REACH. L'Allegato XI sottolinea le regole generali per essere comunque conformi alle richieste degli Allegati dal numero VII al numero X.

Pedersen et al. (2003) hanno cercato di stimare l'incidenza di ciascuno di questi fattori sul computo finale. In questo studio, è stato applicato lo stesso approccio al numero delle sostanze pre-registrate che seguiranno la via della piena registrazione, vale a dire 47.858 sostanze dell'Allegato X, e 53.048 sostanze che ricadono nelle disposizioni dell'Allegato IX. In realtà, una serie di nuove strategie di ricerca, che derivano dalle linee guida per l'industria con le richieste d'informazione per specifici endpoints pubblicate dall'ECHA (2008 a-c) offrono un nuovo compendio sia dei dati disponibili sia del panorama delle alternative in silico e in vitro, comprese le nuove possibilità di riduzione e raffinamento. Una precisa quantificazione di questi fattori non è possibile a questo stadio di applicazione del REACH, in assenza di informazioni sull'ammissione/accettazione di approcci alternativi.

Tabella 7. Stime del prevedibile numero di dossier che saranno presentati per la Registrazione

Scenari diversi a seconda dei quantitativi immessi sul mercato (e cioè richieste base di test). Nello scenario 1 si considerano tutte le pre-registrazioni; nello scenario 2 si calcolano i probabili errori nella pre-registrazione, come spiegato nel testo; nello scenario 4 si trovano le stime di Perdersen et al. 2003; lo scenario 3 corregge lo scenario 4 calcolando un 97% di crescita dell'industria chimica in 14 anni e una del 18% dell'Unione Europea.

Scenario	**>1 t/a**	**>10 t/a**	**>100 t/a**	**>1000 t/a**	**Totale**
1 Sostanze pre-registrate	**29.550**		**59.599**	**54.686**	**143.835**
2 Solo sostanze phase-in			**53.048**	**47.858**	**100.906**
3 Con crescita del mercato 1994-2008	**44.632**	**11.570**	**5.721**	**6.286**	**68.208**
4 Stime di Pedersen et al. (2003)	**19.200**	**4.977**	**2.461**	**2.704**	**29.342**

Tabella 8. Test in vivo richiesti negli Allegati VIII, IX e X del Regolamento REACH

REACH §	Test	Alleg. VII ≥1t/a scadenza 2018	Alleg. VIII ≥10/a scadenza 2018	Alleg. IX ≥100 t/a scadenza 2013	Alleg. X ≥ 1000 t/a scadenza 2010
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo		X	X	X
8.3	Sensibilizzazione cutanea	X	X	X	X
8.4	Ulteriore mutagenicità			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)
8.6.1	Tossicità rip. breve termine		X	X	X
8.6.2	Tossicità subcronica			X	X
8.6.3	Tossicità rip. a lungo termine				X
8.7.1	Screening toss. sviluppo		X	X	
8.7.2	Studio toss. nello sviluppo			X	X
8.7.3	Tossicità per la riprod. 2 gen.			X	X
8.9.1	Cancerogenicità				X
9.1.3	Toss. a breve termine su pesci		X		
9.1.6	Toss. pesci a lungo termine			X	X

9.3.2	BioAccumulo (pesci)			X	X
9.6.1	Toss. degli uccelli a lungo termine				X

Tabella 9. Dati esistenti per ciascun protocollo secondo Pedersen et al. (2003), sulla base dei dati forniti da RPA& Statistics (2001). Da notare che gli studi a lungo termine sugli uccelli non erano inclusi

	Test	Allegati		Allegato VIII	Allegato IX	Allegato X
8.1.1	Irritazione cutanea in vivo	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.3	Sensibilizzazione cutanea	VII	Set di base	17%	22%	22%
8.4	Ulteriore mutagenicità	IX	Livello 1		7%	7%
8.5	Tossicità acuta orale	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.5.2	Tossicità acuta per inalazione	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.5.3	Tossicità acuta per via dermica	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.6.1	Tossicità rip. a breve termine	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.6.2	Tossicità sub cronica	IX	Livello 1		7%	7%
8.6.3	Tossicità rip. lungo termine	X	Livello 2			5%
8.7.1	Screening toss. nello sviluppo	VIII	Set di base	17%	22%	22%
8.7.2	Studio toss. nello sviluppo	IX	Livello 1		7%	7%
8.7.3	Tossicità per la riprod. 2 gen.	IX	Livello 1		7%	7%
8.9.1	Cancerogenicità	X	Livello 2			5%
9.1.3	Toss. a breve termine su pesci	VIII	Set di base	17%	22%	22%
9.1.6	Toss. pesci a lungo termine	IX	Livello 1		7%	7%
9.3.2	BioAccumulo (pesci)	IX	Livello 1		7%	7%
9.6.1	Toss. degli uccelli a lungo termine	X	Livello 2			Nessun dato

3.1 Dati esistenti e dati promessi

Pedersen et al. (2003) hanno considerato sia la disponibilità di dati registrati nel database HPV (High Production Volume) sia di dati raccolti da *RPA and Statistics* mediante una indagine eseguita con le industrie e altri organismi. *Rpa and Statistics* (vedi anche la Tabella 2 di Pedersen et al., 2003) ha raggruppato i test in set di base, livello 1 e livello 2 (Base set, Level 1, and Level 2 data), come descritto dalla Direttiva 67/548. Ora, per quanto riguarda il REACH, questa classificazione corrisponde approssimativamente agli Allegati VII e VIII, Allegato IX e Allegato X rispettivamente.

La Tabella 9 riporta i valori percentuali dei dati disponibili. I valori percentuali comprendono sia i dati esistenti sia altre informazioni di cui le industrie possono disporre (i cosiddetti dati promessi). Pedersen et al. (2003) considerano anche il contributo delle iniziative volontarie per offrire dati, basati sull'informazione disponibile negli Stati Uniti sul HPV Challenge Program, che comprende i test di base (base set tests) per le sostanze prodotte in grandi quantitativi. Per quanto riguarda le sostanze prodotte in bassi quantitativi, esiste uno studio sulle sostanze prodotte in Germania classificate nello IUCLID. Dal momento che i valori della Tabella 10 sono il risultato di un sondaggiogenerale, immaginiamo che essi includano anche i dati già presenti nello IUCLID e nel HPV Program americano.

L'HPV Challenge Program americano "sfida" le società a rendere pubblicamente disponibili i dati sulle sostanze chimiche prodotte o importate negli Stati Uniti nella quantità di 1 milione di pounds o più all'anno (circa 500 tonnellate). Le società hanno sponsorizzato più di 2.200 sostanze chimiche, 1400 delle quali circa direttamente attraverso l'HPV Challenge Program e oltre 860 indirettamente tramite iniziative internazionali. Solo le sostanze sponsorizzate attraverso l'HPV Challenge Program finiscono nel HPVIS (High Production Volume Information System). Attualmente il database HPVIS contiene oltre 340 *submissions* che rappresentano quasi 900 sostanze chimiche (EPA, 2009°). In precedenza (Bremer et al.) abbiamo valutato la parte più critica a proposito del numero di animali e dei costi, vale a dire i test di tossicità nella riproduzione e la quantità di risultati disponibili. Il database HPV contiene otto studi su una generazione e dieci studi su due generazioni come pure 43 screening di tossicità nello sviluppo (come confronto, il New Chemicals Database dell'Unione Europea comprende 55 studi su una generazione e14 studi su due generazioni e nessuno screening su 4.400 nuove sostanze registrate). Questi numeri sui dati disponibili oscillano tra lo 0,3% e il 2% del totale, un dato decisamente più basso del 7%-22% previsto. Nello stesso tempo è altamente improbabile che nuovi studi sulla tossicità nella riproduzione non siano stati già presentati per la notifica.

Un altro approccio adottato da Allanou et al. (1999) contava il numero di iscrizioni nella lista HPV dell'Unione Europea estraendoli direttamente dallo IUCLID. Su un totale di 2465 sostanze, Allanou et al. controllarono se: i) il campo corrispondente ad un endpoint specifico era stato riempito, e ii) se quella stringa era un numero. Tuttavia, anche assumendo che tutte queste 2,465 sostanze siano state pre-registrate nella categoria delle sostanze con la scadenza del 2010, la percentuale che se ne ricava sarebbe inferiore all'1% e quindi il suo impatto sui risultati finali sarebbe del tutto trascurabile (Tabella 9)

3.2 Esenzioni

Nell'Allegato VII fino al X, REACH fornisce alcune regole standard per ciascun endpoint su come eseguire il test nel caso non sia disponibile alcun dato. REACH segnala anche in quali situazioni il test può essere evitato, e cioè: se è possibile dimostrare scientificamente che non c'è esposizione o se eseguire il test è tecnicamente impossibile, o quando il risultato di un test è chiaramente derivato dalle informazioni ottenute per un altro endpoint. Per esempio, uno studio completo sulla tossicità nello sviluppo– (REACH §8.7.2) sarà eseguito per una sostanza che ricade nelle richieste dell'Allegato IX solo quando lo screening di tossicità nello sviluppo desse una risposta positiva. (REACH 8.7.1). Al contrario, le sostanze cui si applicano le disposizioni dell'Allegato X richiedono sempre uno studio completo di tossicità nello sviluppo e sono esonerate dallo screening test .

Le possibilità di esonero dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza chimica e non hanno a che fare quindi con il tonnellaggio che deve essere registrato. I valori proposti da Pedersen et al. (2003) sono riassunti nella Tabella 10. Sfortunatamente, al momento non ci sono informazioni che possano confermare questi numeri. Altri casi di minore importanza possono consentire l'esonero. Per esempio, un metabolito è coperto dai test effettuati sulle sostanze di partenza. Ma dal momento che queste possibilità

hanno un impatto inferiore sui numeri finali, non vengono prese in considerazione nei calcoli finali. Inoltre bisogna sottolineare che studi di screening non devono essere effettuati sulle sostanze che ricadono sotto le richieste degli Allegati relativi agli alti tonnellaggi che richiedono comunque in generale test più approfonditi.

Tabella 10. Possibilità di esenzione secondo Pedersen et al. (2003)

	Test	Esonero
8.1.1	Irritazione cutanea in vivo	
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo	
8.3	Sensibilizzazione cutanea	
8.4	Ulteriore mutagenicità	70%
8.5	Tossicità acuta orale	10%
8.5.2	Tossicità acuta per inalazione	50%
8.5.3	Tossicità acuta per via dermica	60%
8.6.1	Dose ripetuta a breve termine	25%
8.6.2	Tossicità subcronica	75%
8.6.3	Tossicità ripetuta a lungo termine	90%
8.7.1	Screening toss. nello sviluppo	10%
8.7.2	Studio toss. nello sviluppo	85%
8.7.3	Tossicità per la riproduzione su 2 generazioni	85%
8.9.1	Cancerogenicità	90%
9.1.3	Tossicità a breve termine su pesci	
9.1.6	Tossicità pesci a lungo termine	
9.3.2	BioAccumulo (pesci)	60%
9.6.1	Tossicità degli uccelli a lungo termine	99%

3.3 Numero finale di test richiesti per la registrazione: attuali orientamenti e metodi accettati

La Tabella 11 è il risultato dell'accorpamento delle Tabelle 9 e 10 applicate alle 53.048 e 47.858 sostanze che devono essere registrate secondo le disposizioni degli Allegati IX e X rispettivamente. I dati si riferiscono al numero dei test richiesti, considerando il numero totale delle sostanze chimiche meno quelle soggette a esonero. Per stimare il numero totale di animali necessari per ciascun endpoint, van der Jagt et al. (2004) hanno intrecciato le informazioni fornite da alcuni organismi accreditati con una vasta esperienza sul campo. Il numero finale risulta dall'applicazione delle linee guida ufficiali, formulate nella Council Regulation 440/2008, che di fatto implementano le corrispondenti linee guida dell'OECD (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) come giustamente segnalato da Hofer et al. (200). Nel nostro studio, abbiamo ripreso il numero medio di animali per test come stimato da van der Jagt per tutti gli endpoints, eccetto: REACH § 8.7.1. screening di tossicità nello sviluppo; REACH § 8.7.2. studio sulla tossicità nello sviluppo (due specie); e REACH 8.7.3 tossicità nella riproduzione su due generazioni. Di fatto, van der Jagt et al. (2004) non hanno preso in considerazione i cuccioli, che pure sono test inclusi nelle statistiche europee sull'utilizzo di animali. Per questi endpoints, consideriamo il numero di animali per ciascun test proposto da Hofer et al. (2004).

La Tabella 12, che presenta il risultato finale di questo approccio, dimostra che applicare il REACH secondo le direttive richiederebbe 141 milioni di animali vertebrati! Si tratta di un numero chiaramente inaccettabile, per motivi sia etici sia economici (Bottini e Hartung, 2009). Bisogna prendere in considerazione anche la

fattibilità, dal momento che l'Europa non ha le risorse necessarie per eseguire un tale numero di test in un periodo di tempo così breve (Rapporto IEH, 2001). Tuttavia, l'Introduzione agli Allegati da VII a X stabilisce chiaramente che: "Prima di eseguire nuovi test per determinare le proprietà elencate in questo Allegato, devono essere valutati tutti i dati in vitro disponibili, i dati in vivo, i dati storici sull'uomo, i dati (Q)SAR validati". Da questo punto di vista, REACH è stato uno dei primi atti legislativi a introdurre uno spirito di cambiamento nel campo della tossicologia, anche se la sua piena accettazione richiederà un certo tempo (Hartung 2009).

Tabella 11. Numero complessivo di test richiesti per ciascun endpoint basato sulla pre-registrazione effettiva, considerando sia i dati esistenti sia le possibili esenzioni

Questo calcolo del numero di test previsti dalle linee guida OECD per ciascuna sostanza chimica si basa sullo scenario 2 (Tabella 7), vale a dire sul numero di sostanze effettivamente pre-registrate meno i probabili errori. Considera sia i dati esistenti (Tabella 9) e i possibili esoneri (Tabella 10) ma non gli approcci alternativi.

	Test	Allegato	53.048 sostanze ≥100 t/a scadenza 2013	47.858 sostanze ≥1000 t/a scadenza 2010	Totale
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo	VIII	41.337	37.329	78.707
8.3	Sensibilizzazione cutanea	VII	41.377	37.329	78.707
8.4	Ulteriore mutagenicità	IX	14.800	13.352	28.153
8.5	Tossicità acuta orale	VIII	37.240	33.596	70.836
8.5.2	Tossicità acuta per inalazione	VIII	20.689	18.665	39.353
8.5.3	Tossicità acuta per via dermica	VIII	16.551	14.932	31.483
8.6.1	Dose ripetuta a breve termine	VIII	31.033	27.997	59.030
8.6.2	Tossicità subcronica	IX	12.334	11.127	23.461
8.6.3	Tossicità ripetuta a lungo termine	X	0	4.547	4.547
8.7.1	Screening toss. nello sviluppo	VIII	37.240	33.596	70.836
8.7.2	Studio toss. nello sviluppo	IX	7.400	6.676	14.076
8.7.3	Tossicità per la riprod. 2 generazioni	IX	7.400	6.676	14.076
8.9.1	Cancerogenicità	X	0	4.547	4.547
9.1.3	Tossicità a breve termine su pesci	VIII	41.377	37.329	78.707
9.1.6	Toss. pesci a lungo termine	IX	49.335	44.508	93.843
9.3.2	BioAccumulo (pesci)	IX	19.734	17.803	37.537
9.6.1	Toss. degli uccelli a lungo termine	X	0	479	479
	Totale		377.887	350.488	728.378

4. Impatto previsto degli approcci alternativi: metodi validati emergenti/non accettati e in via di validazione

Nel 2004, van der Jagt et al. hanno pubblicato un rapporto su come gli approcci alternativi possono ridurre l'uso degli esperimenti sugli animali nell'ambito del REACH. La prima parte riguarda i metodi (Q)SAR (Quantitative Structure Activity Relationship) e read-across. L'approccio (Q)SAR poggia sull'ipotesi che

una certa proprietà di una sostanza possa essere descritta in rapporto alla somiglianza della sua struttura chimica, nel suo insieme o parzialmente, con altre sostanze chimiche le cui proprietà sono note (Benfenati, 2007). La portata del modello (Q)SAR sta evolvendo rapidamente, grazie allo sviluppo della tecnologia computazionale e all'espandersi della disponibilità di database che forniscono informazioni sempre più dettagliate sulle sostanze chimiche. Ma se è vero che le potenzialità di questo approccio sono chiare, è altrettanto vero che esso può raramente venire utilizzato come tecnica autonoma per la valutazione di complessi endpoints tossicologici. Come descritto nelle guide tecniche dell'ECHA (ECHA Technical Guidance Documents, 2008-c), il metodo (Q)SAR è ben posizionato nella Strategia per i test integrati (ITS: Integrated Testing Strategy) per la valutazione delle proprietà tossicologiche, e la sua funzione principale è segnalare proprietà specifiche e ottimizzare il numero di test e di animali usati per ciascun endpoint. Secondo van der Jagt et al. (2004) i due approcci (Q)SAR e read across sono stati utilizzati nel HPV Challenge Program americano nella misura del 44% per endpoint relativi alla salute umana e del 35% per effetti ambientali. Pedersen et al. (2003) considerano il livello di affidabilità dei risultati (Q)SAR per ciascun endpoint. La Tabella 13 mostra i risultati ottenuti applicando l'approccio *RPA and Statistics* al numero totale dei test. In media il "buon" approccio (Q)SAR comporta una riduzione del 4,6%; l'approccio "discreto" una riduzione dell'1,9%, e l'approccio "conservativo" una riduzione dello 0,1%. Se questo è vero, l'utilità del metodo (Q)SAR è trascurabile. Il principale ostacolo all'utilizzo dei modelli (Q)SAR è il fatto che essi hanno un dominio di applicazione limitato, generalmente chiaro e definito per ciascun modello e fondato sulla somiglianza della struttura esaminata con le sostanze che sono state utilizzate per costruire il modello.

Bisogna inoltre sottolineare che le operazioni di calcolo (Q)SAR riguardano specifiche sostanze chimiche organiche con una struttura ben definita. Per questo motivo i composti inorganici, i composti organometallici, le miscele e le UVCB sono escluse in partenza. Barrat et al. (2007) hanno testato 400 sostanze chimiche selezionandole a caso da ESIS HPV e LPV. Per il solo fatto di escludere i composti inorganici e ionici, le miscele complesse e tutte le sostanze che non hanno una struttura chimica unica, il risultato è stato che l'approccio (Q)SAR poteva essere preso in considerazione soltanto per la metà di loro.

I dichiaranti possono applicare l'aproccio *read-across* a categorie di strutture chimiche, specialmente nell'area dell'alto tonnellaggio dove ci sono molte classi di prodotti grezzi o di raffineria largamente simili.

L'utilizzo dei metodi in vitro, anch'essi fortemente supportati dal REACH, dovrebbe abbassare il numero degli animali richiesti. Sfortunatamente, lo sviluppo di questi metodi per gli esperimenti più complessi e richiedenti un gran numero di animali lo sviluppo di questi metodi è ancora lontano sia dalla validazione che da una accettazione normativa.

Nei paragrafi seguenti passiamo in rassegna tutti gli endpoints che richiedono test in vivo. In ciascun caso avanziamo alcune congetture in un esercizio volto a simulare l'applicazione delle diverse tipologie di test e per calcolare il numero di animali necessari in ogni passo successivo. La maggior parte degli assunti derivano dall'esperienza personale. La loro plausibilità è passata al vaglio di sei esperti del REACH appartenenti al settore industriale e da un'autorità di vigilanza. Sebbene non esistano statistiche a supporto di tali congetture, esse possono dare un'idea dello scenario che prospetta l'applicazione del REACH.

Il numero medio di animali per ogni sostanza testata deriva dalle corrispondenti linee guida. Si arriva a un numero più basso quando si testano diverse sostanze chimiche con un unico controllo; un numero più alto può essere necessario quando la risposta non è conclusiva. Inoltre, bisogna considerare che alcuni dei test più complessi, come tossicità ripetuta a 90 giorni, cancerogenicità, ecc., possono essere eseguiti alla dose limite invece che su tre livelli di concentrazione soltanto quando non ci sono segni di tossicità alla sostanza . Test alla dose limite, quando previsti nella linea guida per quel test, possono risparmiare fino al 50% degli animali richiesti.

La Tabella 7 mostra quattro diversi scenari per il numero di sostanze che richiederanno dei test in vivo per la registrazione. Lo scenario numero 4 rappresenta grosso modo le previsioni di Pedersen et al. (2003) formulate circa cinque anni prima che si concludesse la fase di pre-registrazione e non sono più tenute in considerazione. Lo scenario numero 1 immagina la piena registrazione di tutte le sostanze pre-registrate: è di gran lunga lo scenario più pessimista e difficilmente rappresenta la situazione reale. Lo scenario numero 2 è probabilmente abbastanza vicino alla situazione reale per quanto riguarda il numero totale delle sostanze che verranno registrate. Tuttavia, l'alto numero di sostanze pre-registrate al livello superiore di tonnellaggio sembra piuttosto lontano dall'attuale situazione. Le previsioni dello scenario numero 3 della Tabella 7 sono alquanto ottimiste, ma hanno una presa migliore su tutti e quattro gli Allegati e le relative richieste, e sono state scelte per una analisi più dettagliata del fabbisogno di test in vivo. Questo approccio consente di distinguere in modo più preciso tra i differenti livelli di tonnellaggio immessi sul mercato, cosa impossibile per l'elenco delle sostanze pre-registrate. Questo scenario prevede 44.632 sostanze prodotte/commercializzate al livello ≥ 1 tonnellata/anno, 11.570 sostanze al livello ≥10 tonnellate/anno,

5.721 sostanze al livello ≥100 tonnellate/anno, 6.286 sostanze al livello ≥1000 tonnellate/anno. Significativamente, questi dati combaciano abbastanza bene con le stime fornite di recente in alcune presentazioni di ECHA circa il numero delle domande di registrazione previste per la fine del 2010, che vanno da 4.000 a 10.000. E' evidente che assumendo questi dati di partenza si arriva a una grande sottovalutazione sia del numero finale di animali necessari per la registrazione sia dei relativi costi.

Per quanto riguarda i costi abbiamo fatto riferimento alla indagine di Fleischer (2007) e – quando i dati mancavano- allevalutazioni fornite personalmente da un laboratorio conto terzi privato.

Tabella 12. Numero totale di animali richiesti per ciascun endpoint sulla base della effettiva pre-registrazione considerando l'informazione esistente e le possibilità di esonero ma non i metodi alternativi. Questo calcolo del numero di animali che seguendo le linee guida dell'OECD vengono utilizzati per ogni singola sostanza testata, si fonda sullo scenario 2 (Tabella 7), vale a dire sul numero di sostanze effettivamente pre-registrate meno i probabili errori. Considera sia i dati esistenti (Tabella 9) e i possibili esoneri (Tabella 10) ma non gli approcci alternativi. Il numero di animali provengono da Hofer et al. 2004

	Test	Allegato	Numero totale dei test richiesti	Numero di animali per test (media)	Totale animali usati	%
8.2.1	Irritazione degli occhi in vivo	VIII	78.707	2	157.413	0,11%
8.3	Sensibilizzazione cutanea	VII	78.707	23	1.810.254	1,28%
8.4	Ulteriore mutagenicità	IX	28.153	50	1.407.639	1,00%
8.5	Tossicità acuta orale	VIII	70.836	8	566.688	0,40%
8.5.2	Toss. acuta per inalazione	VIII	39.353	20	787.067	0,56%
8.5.3	Toss. acuta per via dermica	VIII	31.483	10	314.827	0,22%
8.6.1	Dose rip. a breve termine	VIII	59.030	50	2.951.501	2,09%
8.6.2	Tossicità subcronica	IX	23.461	32	750.741	0,53%
8.6.3	Tossicità rip. a lungo termine	X	4.547	160	727.442	0,52%
8.7.1	Screening toss. sviluppo	VIII	70.836	560	39.668.167	28,13%
8.7.2	Studio toss. nello sviluppo	IX	14.076	150	2.111.458	1,50%
8.7.3	Tossicità per la riprod. 2 gen.	IX	14.076	3.200	45.044.438	31,95%
8.9.1	Cancerogenicità	X	4.547	400	1.818.604	1,29%
9.1.3	Toss. a breve termine su pesci	VIII	78.707	14	1.101.894	0,78%
9.1.6	Toss. pesci a lungo termine	IX	93.843	400	37.537.032	26,62%
9.3.2	BioAccumulo (pesci)	IX	37.537	108	4.053.999	2,88%
9.6.1	Toss. degli uccelli a lungo termine	X	479	70	33.501	0,02%
	Totale				141.000.076	100,00%

4.1 Irritazione e corrosione degli occhi e della pelle

Quest'area è largamente coperta da metodi alternativi validati e accettati da Unione Europea e OECD, con l'importante eccezione dell'irritazione oculare (metodo OECD TG 405). Con i metodi alternativi si può valutare la corrosione oculare ed eventualmente fare uno screening iniziale per l'irritazioneoculare acuta. I test sono richiesti a partire dall'Allegato VIII in poi.

Stime per situazioni che non richiedono test:

- già classificate: 73% (ECB)
- dati sull'uomo: 1%
- corrosione della pelle (skin corrosive): 3% (Hoffmann et al., 2005)
- pH <2 o >11,5: 2%
- infiammabili a contatto con aria o acqua: 0,1%
- perossidi: 0,1%
- tossicità dermica acuta <400mg: 5%
- regola BfR e (Q)SAR: 10% (Rorije and Hulzebos, 2005)
- corrosione oculare in vitro: 5%
- non validati in vitro: 10%
- Read-across: 10%

Questo significa che mancano dati per il 26% delle sostanze chimiche. Di questi, il 45,2% può essere ottenuto senza test animali, e cioè il 14,3 % delle sostanze chimiche sarà testato secondo il TG 405 dell'OECD. Da tenere presente che i processi di validazione in corso promettono di sostituire questo test nel giro di pochi anni. Posto l'utilizzo di 1,3 animali per ogni sostanza testata, lo scenario più ottimistico dà un consumo di 10.229, 1.041 e 1.144 animali per le sostanze commercializzate in quantitativi superiori a 10t/anno, 100t/anno e 2000t/anno rispettivamente.

I costi previsti per il metodo OECD TG 405 è di circa 1.100 euro per ogni sostanza testata.

4.2 Sensibilizzazione della pelle

Il metodo OECD TG 429 (Local Lymph Node Assay, LLNA) è esplicitamente richiesto dall'Allegato VII in poi. Tuttavia, si può utilizzare anche il metodo OECD TG 406 che utilizza 15-30 cavie (guinea pigs) (maximization test vs Buehler) in base alle disposizioni esistenti (ECHA 2008).

Secondo l'ECB (European Chemical Bureau) esistono dati per il 20% (delle sostanze?) e non sono richiesti test per le sostanze corrosive (3%). Poiché non esistono metodi alternativi validati e la sensibilizzazione non può essere stabilita facendo ricorso al read-across, il 77% delle sostanze dovranno essere testate. Di fatto, ci sono alcuni metodi alternativi in via di sviluppo. Di particolare interesse i metodi (Q)SAR, parecchi dei quali sono ora pubblicamente disponibili. La percezione comune è che questo approccio può essere efficacemente utilizzato come parte di una batteria di metodi insieme con i risultati di test in vitro, come dimostrano i risultati di due progetti integrati dell'Unione Europea, Caesar e Sensitiv (www.caesar-project.eu; www.sens-it-iv.eu). Nel prossimo futuro, essi potrebbero fornire gli strumenti per ridurre il numero di animali utilizzati nei testi di sensibilizzazione cutanea. Al momento non ci sono metodiche accettate e anche la conoscenza di certi meccanismi è ancora scarsa, di conseguenza nel presente studio non si prende in considerazione il contributo dei metodi alternativi. La guida tecnica dell'ECHA non considera accettabile alcun metodo alternativo (ECHA Technical Guidance – ECHA, 2008a).

Si prevede che i due terzi delle sostanze chimiche che saranno testate per la sensibilizzazione della pelle si indirizzeranno verso il metodo LLNA in quanto test preferito dalla normativa e un terzo userà i metodi con le cavie (23 animali, supponendo un utilizzo uguale di GPMT e Buehler). Si prevede anche che nella metà dei casi verrà usato il metodo LLNA nella versione ridotta validata, che utilizza 8 animali anziché 16. Il conteggio finale considera l'applicazione di ogni linea guida al 25,7% di tutte le registrazioni. Il costo

previsto è di 3.290 euro per il LLNA e di 2.000 euro per la versione ridotta. Uno studio del tipo OECD TG 406 può costare fino a 4.000 euro.

4.3 Tossicità acuta

I test per via orale OECD TG 420, OECD TG 423 o OECD TG 425 (metodi accettati di raffinamento e riduzione) vengono richiesti dall'Allegato VII in poi con l'aggiunta di OECD TG 403 (per inalazione) o OECD TG 402 (per via cutanea) a partire dall'Allegato VIII. L'ECB, European Chemicals Bureau, ritiene che esistano dati per il 56% per via orale e per il 34% per altre vie. Si considera che la via cutanea è preferita a quella per inalazione nella misura di 9:1.

Il 3% delle sostanze corrosive per la pelle non hanno bisogno di essere testate. Non esistone alternative validate e/o accettate. Da segnalare che variazioni per test a blocchi per l'OECD TG 404 e OECD TG 402 sono in discussione presso l'OCSE (OECD). L'insieme di questi dati è riassunto nella Tavola 14, dove si trovano anche i costi medi. Recentemente, i coordinatori nazionali del Programma per l'ambiente, la salute e la sicurezza dell'OECD hanno approvato una nuova guida sulla tossicità acuta per inalazione (bozza OECD TG 436), che utilizza un numero significativamente ridotto di animali. L'approvazione definitiva di queste nuove linee guida è prevista entro la fine del 2009 (*ALTEX News*, 2/2009).

4.4 Tossicità a dosi ripetute

Un test ripetuto a 28 giorni su una sola specie animale è richiesto a partire dall'Allegato VIII in poi, eseguito secondo la somministrazione più significativa. Si ritiene che questa corrisponda, nella misura di 90:9:1, alla via orale, alla via cutanea e all'inalazione. Dall'Allegato IX in avanti deve essere aggiunto anche uno studio esteso a 90 giorni. L'ECB ritiene che siano disponibili dati in misura del 34% per lo studio a 28 giorni e del 7% per quello a 90 giorni.

Il test può essere evitato nel caso di esposizione non rilevante, intorno al 5%, con una necessità di test che raggiunge il 61% e l'88% rispettivamente. Non si prevede che prendano il via studi a lungo termine come l'OECD TG 452 con dosi ripetute a 12 mesi e più. In particolare, è stato previsto un numero minimo di animali solo per i gruppi a tre dosi. Altri tipi di test consecutivi non sono stati considerati.

L'uso del test OECD TG 452 viene scoraggiato nelle linee guida (ECHA, 2008) e quindi non è stato preso in considerazione in questi calcoli. L'apporto dei test OECD TG 453 e 422 viene calcolato rispettivamente ai paragrafi cancerogenicità e tossicità nella riproduzione.

L'insieme di questi dati è riassunto nella Tabella 15, che include anche i costi medi.

Tabella 13. Stime dell'accettazione di (Q)SAR, in %, come segnalato in Pedersen et al. (2003)

	Allegato VIII	Allegato IX	Allegato X
Buona	24%	6%	3%
Discreta	10%	2,5%	1,25%
Monservativa	0,4%	0,1%	0,05%

Tabella 14. Ipotesi sulle richieste per nuovi studi di tossicità acuta in vivo

Costo e numero minimo di animali secondo le linee guida OECD e percentuale stimata di sostanze per le quali si dovranno eseguire i differenti test di tossicità acuta, in base al tonnellaggio. Vedi capitolo 4.3.

	OECD TG 420, 423, 425	OECD TG 403	OECD TG 402
Animali	8-15, media 12	40-50, media 45	25-30, limit test 10, media 20
Costo in euro	1.500 euro	11.700 euro	2.000 euro
VII	44% (-3% corr) = 42,7%		
VIII	42,7%	10% di (66%-3% corr) = 6,4%	57,6%

IX	42,7%	6,4%	57,6%
X	42,7%	6,4%	57,6%

Tabella 15. Ipotesi sulle richieste per nuovi studi di tossicità in vivo con dose ripetuta

Costo e numero minimo di animali secondo le linee guida OCSE e percentuale stimata di sostanze per le quali si dovranno eseguire i differenti test di tossicità con dose ripetuta, in base al tonnellaggio. Vedi capitolo 4.4

	Studi a 28 giorni	Studi a 28 giorni	Studi a 28 giorni	Studi a 90 giorni	Studi a 90 giorni	Studi a 90 giorni
	OECD TG 407	OECD TG 410	OECD TG 412	OECD TG 408	OECD TG 411	OECD TG 413
Animali	40	40	40	80	80	80
Costo in euro	49.400	49.600	105.500	115.700	135.000	250.000
≥10 t/a	90% di 61% =54,9% -33% repro= 21,9%	5,5%	0,6%			
≥100 t/a	21,9%	5,5%	0,6%	90% di 88%=79,2%	7,9%	0,9%
≥1000 t/a	21,9%	5,5%	0,6%	79,2%	7,9%	0,9%

Tabella 16. Ipotesi sulle richieste per nuovi studi in vivo di tossicità sul sistema riproduttivo

Costo e numero minimo di animali secondo le linee guida OECD e percentuale stimata di sostanze per le quali si dovranno eseguire i differenti test di tossicità acuta, in base al tonnellaggio. Vedi capitolo 4.7

	OECD TG 421	OECD TG 422	OECD TG 414	OECD TG 414 + seconda specie	OECD TG 416	OECD TG 416 + seconda specie	OECD TG 426
Animali	560	412	784	560	3.200	2.100	1.400
Costo in euro	54.600	92.000	63.100	92.500	328.000	481.000	1.100.000
≥10 t/a	67%	33%	1%		1%+2,5%=3,5%		1,25%
≥100 t/a	67%	33%	95%	76%	(80% di 95%)	3,5%	1,25%
≥1000 t/a					100%	80%	1,25%

4.5 Mutagenicità

In base alle linee guida (ECHA, 2008°), l'Allegato VII richiede un Ames test, che nel caso di risultati positivi passa alle richieste dell'Allegato VIII per la mutagenicità. L'Allegato VIII prevede altri due test in vitro. Secondo Kirkland et al. (2005), il test di Ames test ha una specificità del 73,9% per i non-cancerogeni, quindi una percentuale di falsi negativi del 26,1%. La sensibilità del metodo è circa il 90%. Di conseguenza, assumendo che la percentuale di cancerogeni veri tra le sostanze chimiche sia del 10%, con il test di Ames si avrebbe una percentuale di positivi del 23,5% (9% reali più 14.5% di falsi-positivi). Nel caso di risultati

positivi, generalmente dovrà essere considerato un test in vivo; riteniamo che verrà eseguito nell'80% dei casi, vale a dire per il 21,2% delle sostanze chimiche dell'Allegato VII.

La percentuale di falsi-positivi per l'insieme dei test dell'Allegato VIII oscilla tra il 75% e il 95% (Kirkland et al., 2005), quindi è ragionevole assumere che insieme con i veri-positivi, circa il 90% delle sostanze chimiche verrà preso in considerazione per i test in vivo, e l'80% di questi, pari al 72% delle sostanze chimiche, verranno eseguiti.

Per quanto riguarda gli Allegati IX e X, i test in vivo devono essere considerati indipendentemente dai risultati dei test in vitro. L'ECB stima un 7% di dati disponibili; e di nuovo, ipotizzando l'esecuzione dell'80% dei test, il 74% delle sostanze verranno testate.

I test in vivo comprendono differenti prove di mutagenicità anche, se pur più raramente, sulle cellule germinali. Le linee guida prevedono da 1 a tre 3 test in vivo, da scegliere tra OECD TG 474, 475, 483, 478 e 486. Il fabbisogno per ciascuno di questi metodi sia per il costo sia per gli animali varia notevolmente. La media di 70 animali formulata in studi precedenti (Hofer et al., 2004) sembra realistica come pure il costo medio di 10.800 euro per ciascun test.

4.6 Cancerogenicità

I test con animali per la cancerogenicità vengono fortemente scoraggiati nella guida: "uno studio sulla cancerogenicità può essere giustificato solo occasionalmente. Se ci sono precisi sospetti che la sostanza possa essere cancerogena, e le informazioni derivate sia da test che da altre fonti non portano a conclusioni accettabili, sia in termini di rischio che di potenza, allora la possibilità di procedere a un test di cancerogenicità va presa in considerazione. In particolare, uno studio di questo tipo può essere richiesto per sostanze che abbiano un utilizzo ampio e dispersivo, o per sostanze che comportano frequenti o prolungate esposizioni da parte dell'uomo. Tuttavia, dovrebbe essere considerato solo in ultima istanza".

L'ECB stima un 4% di dati disponibili, cifra non significativa per il nostro studio.

Si presume che l'1% delle sostanze dell'Allegato X, e lo 0,1% di sostanze chimiche sospette degli altri Allegati verranno testate con il metodo OECD TG 451. L'utilizzo dell'OECD TG 453 può essere considerato equivalente.

Tutti i test di cancerogenicità sono alquanto lunghi e complessi, cosa che giustifica l'alto costo di 780.400 euro per sostanza con l'utilizzo di "soli" 400 ratti per studio.

4.7 Tossicità per la riproduzione

Una valutazione della tossicità per la riproduzione comprende lo screening di tossicità nello sviluppo (8.7.1.) previsto dall'Allegato VIII più il test di tossicità per lo sviluppo esteso (8.7.2.) e lo studio di tossicità nella riproduzione su due generazioni previsto dall'Allegato IX (8.7.3.) Lo studio di tossicità nello sviluppo viene generalmente eseguito su una specie, ma attualmente si raccomandano anche test su una seconda specie di non-roditori, modificando così le procedure attualmente in uso e accettate per la verifica della tossicità nella riproduzione. C'è anche una forte interconnessione con altri endpoints: infatti, un risultato positivo per gli organi riproduttivi nel test di tossicità ripetuta può portare a uno studio di tossicità su due generazioni, mentre le sostanze già classificate come cancerogene non hanno bisogno di test tossicologici per la riproduzione perché le misure di controllo del rischio devono essere già adeguate.

Bisogna considerare i seguenti test con animali:

- OECD TG 421, adottato il 27 luglio 1995: screening di tossicità per la riproduzione/sviluppo. La specie preferita è il ratto. Questo metodo richiede almeno 10 femmine e 10 maschi per dose, con tre dosi per ogni sostanza chimica più una dose di controllo. I cuccioli sono calcolati. Hofer et al. (2004), calcola 560 ratti e Fleischer(2007) considera un prezzo medio di 54.600 euro per lo studio sui ratti.
- OECD TG 422, adottato il 22 marzo 1996: studio di tossicità ripetuta in combinazione con screening di tossicità per la riproduzione/sviluppo. La specie preferita è il ratto. Questo metodo richiede almeno 10 femmine e 10 maschi per dose, con tre dosi per ogni sostanza più una dose di controllo. Contando i cuccioli arriva a una media di 412 animali per sostanza, il costo è di 92.000 euro per studio.
- OECD TG 414, adottato il 22 gennaio 2001: studio di tossicità nello sviluppo prenatale (Metodo UE B.31). La specie di roditori preferita è il ratto; la specie di non-roditori è il

coniglio. Il metodo richiede almeno 20 femmine incinte per dose, con tre dosi per ogni sostanza più una dose di controllo. L'uccisione delle femmine è prevista per il giorno prima del parto, si calcolano i cuccioli perché è risaputo che i feti percepiscono il dolore a partire approssimativamente dal 60 per cento del periodo di gestazione (Close et al. 1997). Fleischer (2007) calcola un prezzo medio di 63.100 euro per lo studio sui ratti e 92.500 euro per lo studio sui conigli. Si stima un utilizzo medio di 560 conigli per studio e di 784 ratti.

- OECD TG 416, adottato il 22 gennaio 2001: studio di tossicità per la riproduzione su due generazioni (Metodo UE B.35) La specie preferita è il ratto. Questo metodo richiede almeno 20 femmine e 20 maschi per dose, contre dosi per sostanza più una dose di controllo. Alcuni esemplari della generazione F1 vengono fatti accoppiare e i cuccioli della generazione F2 inclusi nello studio. Hofer et al. (2004) calcola 3.200 ratti e Fleischer (2007) indica un prezzo medio di 328.000 euro per lo studio sui ratti. Possiamo ipotizzare 2.100 conigli o 3.200 topi laddove venga richiesto il test su una seconda specie con un costo di 328.000 euro per test (per il calcolo si è utilizzato il numero più basso di 2.100). I test su una seconda specie viene specificatamente raccomandato nelle linee guida dell'ECHA.
- OECD TG 426, adottato il 16 ottobre 2007: neurotossicità nello sviluppo. La specie preferita è il ratto e il dosaggio comincia dalle femmine incinte, senza specificazioni sul numero di maschi da utilizzare. La richiesta finale è di 20 piccoli, senza indicazioni sul numero di genitori. Ipotizziamo che almeno 10 maschi e dieci femmine vengano selezionati come genitori per ogni dose di gruppo con tre dosi per ogni sostanza più una dose di controllo. In media, il metodo OECD TG 426 richiede 1.400 animali e costa 1,1 milione di euro.
- OECD TG 415, adottato il 26 maggio 1983: studio di tossicità nella riproduzione su una generazione (Metodo EU B.34). La specie preferita è il ratto. Il metodo richiede almeno 20 femmine e 20 maschi per dose, con tre dosi per ogni sostanza più una dose di controllo. Questo metodo non viene più preso in considerazione perché si pensa che lo studio su due generazioni (OECD TG 416) sarà il metodo preferito almeno fino a un accordo sul TG 415 da parte dell'OECD (OCSE), anche se sono all'esame alcune proposte di revisione dell'attuale strategia (Spielmann and Vogel, 2007).

La dimensione media di una figliata di ratto è di 8,2 piccoli (Kidwell and Weeth 1959), mentre quella di topo, la seconda specie preferita per il metodo OECD TG 416, è di 8,3 (Finn, 1963). Per i conigli, la figliata media è di 5,5 (Blasco et al. 1993), che significa circa un terzo in meno di animali. In particolare, mentre Hofer et al. (2004) calcola 3.200 ratti per ogni sostanza sottoposta a un test OECD TG 416, secondo Cooper et al. (2006) ne occorrono 2.600. Per coerenza con i dati utilizzati in precedenza, facciamo riferimento alle cifre fornite da Hofer et al. (2004), ma è possibile che per questo importante comparto il numero di animali sia sovrastimato nella misura del 20% circa.

L'ECHA ha pubblicato per le industrie una guida specifica relativa a ciascun endpoint. Qui sotto traduciamo queste linee guida in una stima dei test richiesti che ne derivano.

Richieste standard:

- Allegato VIII (10-100 t/a): OECD TG 421 o 422; poiché generalmente i dati dello studio sulle dosi ripetute a 28 giorni sono disponibili, ipotizziamo un uso del 67% del metodo OECD TG 421 e del 22% per il metodo OECD TG 422, ma, in aggiunta, "a seconda della natura dell'allarme… può essere più appropriato condurre uno studio di tossicità nella riproduzione su due generazioni… o uno studio di tossicità nello sviluppo prenatale"; assumiamo che si applichi questa procedura all'1% dei casi con OECD TG 414 e con OECD TG 416. I test su una seconda specie generalmente non vengono presi in considerazione.
- Allegato IX (100-1000 t/a): il metodo richiesto è l'OECD TG 416, che occasionalmente prevede anche l'utilizzo di una specie di non-roditori ("lo studio su una seconda specie verrà normalmente richiesto quando il primo studio è negativo", ipotizziamo che questo si applichi all'80% dei casi; in caso di particolare allarme (special concern) dovrebbe essere preso in considerazione anche un test di neurotossicità nello sviluppo (DNT).

- Allegato X (1000t/a): il metodo richiesto è l'OECD TG 416, che occasionalmente prevede anche una specie di non-roditori; i metodi OECD TG 421/22 e OECD TG 414 non sono richiesti; in caso di particolare allarme, dovrebbe essere preso in considerazione anche un test di neurotossicità nello sviluppo.

Richieste aggiuntive per i test: "L'esposizione dell'uomo, particolarmente quella dei consumatori, è prossima ai livelli ai quali possiamo aspettarci la tossicità", ipotizziamo che questo sia vero per cui nell'1% dei casi la sostanza passerà al livello di richieste superiore.

In particolare, "una chiara evidenza di effetti avversi" nei test OECD TG 421 o 422 "non comporterà la richiesta di eseguire uno studio su due generazioni a più alti livelli di tonnellaggio". "Un risultato negativo… rassicurerà circa l'assenza di questo specifico pericolo". Per il nostro studio,poiché il rischio nella riproduzione è raro e questi screening test generalmente non danno "chiara evidenza" ipotizzeremo un 5% di non luogo a procedere per quanto riguarda l'Allegato IX e nessun effetto nel caso dell'Allegato X, dal momento che questo non prevede alcun test OECD TG 421/422. In particolare, nel regolamento della Commissione Europea 134/2009 che modifica l'Allegato XI del REACH (pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea il 16 febbraio 2009) viene detto esplicitamente che il "derived no-effect level" (livello derivato senza effetto) derivato da un test di screening non può essere attendibile e giustificare l'omissione di un test esteso di tossicità per la riproduzione/sviluppo" proibendo di fatto questa importante possibilità di evitare alcuni test.

Allo stato attuale ci sono poche informazioni disponibili che consentano di evitare i test di tossicità per la riproduzione (tra 100 e 200 sostanze vengono riconosciute come sostanze tossiche per la riproduzione).

Un'ampia indagine (Bremer et al., 2007) è stata condotta su:

- L'Allegato I della Direttiva europea sulle sostanze pericolose 67/548/EEC
- "Proposition 65 list" dell'Office of Environmental Health Hazard Assessment dello Stato della California.
- L'European Chemical Substances Information System e il Chemical Data Sheet Information System dello IUCLID
- Il database americano NTP (US National Toxicology Program) relativo a studi sulla tossicità nella riproduzione.
- Il database dell'Integrated Risk Information System dell'EPA americana e la letteratura accreditata via peer review.
- Studi condotti secondo linee guida riconosciute o che quanto meno hanno esaminato un ventaglio relativamente ampio di parametri relativi alla riproduzione o lo sviluppo (US National Library of Medicine's TOXNET –Developmental and Reproductive Toxicity study).

Questa ricerca fornisce informazioni sufficienti solo per 71 sostanze classificate come positive. Anche assumendo una disponibilità di risultati negativi da studi da 2 a 20 volte più numerosi, questo numero non ha un impatto sull'insieme dei costi e dell'uso di animali ai fini del REACH .

I dati sull'uomo sono ancora meno frequenti e limitati alle medicine. L'Integrated Risk Information System dell'EPA americana sulle sostanze chimiche prodotte in grandi quantitativi, che è vicino al set di dati del REACH, conteneva informazioni sui test di tossicità nella riproduzione per solo 17 sostanze chimiche su 2.000. In questo studio ipotizzeremo una disponibilità di dati per l'1% delle sostanze.

In conclusione, i dati disponibili sono irrilevanti, e limitano la possibilità di affidarsi ai metodi read-across e (Q)SAR. Entro certi limiti, si può prendere in considerazione l'idea di raggruppare le sostanze e testare i rappresentanti più rappresentativi di una serie di omologhi, ma l'esperienza fatta nell'area delle medicine ha insegnato che persino gli enantiomeri (thalidomide) o leggere variazioni strutturali (acido retinoico) si comportano in modo del tutto diverso per quanto riguarda il rischio riproduttivo. Ipotizziamo un effetto di risparmio del 5% ai fini del presente studio.

Le linee guida suggeriscono anche che per le sostanze "per le quali è stato identificato un meccanismo di tossicità che è causalmente collegato alla tossicità nella riproduzione… ci si può ragionevolmente attendere che presentino lo stesso modello di tossicità nella riproduzione". Tuttavia conosciamo solo pochissimi meccanismi di tossicità per la riproduzione che possano essere applicati a più sostanze chimiche, con l'unica eccezione dei composti che perturbano il sistema endocrino. Quest'ultimo caso non fa parte delle richieste standard di test avanzate dal REACH. Il raggruppamento di sostanze non ha quindi un ruolo di rilievo nella riduzione dei test necessari, tuttavia nel nostro studio ipotizzeremo un effetto di risparmio pari al 5%.

I test possono essere evitati anche laddove la sostanza è classificata come genotossica, cancerogena di categoria 1 o 2 e mutagena categoria 3 o cancerogena categoria 2 o mutagena per le cellule germinali (Mutagen Cat. 1 or Cat 2). Ai fini delle nostre stime ipotizziamo un 5% di questi casi. I test possono essere ulteriormente evitati se "tutti e tre i requisiti… sono soddisfatti": "a) una bassa attività tossicologica b) un assorbimento sistemico trascurabile e c) una esposizione dell'uomo insignificante. Il verificarsi di tutti e tre questi requisiti è raro e non supera il 5% dei casi.

I dati provenienti da altri metodi in vivo sono considerati un sostituto valido per i test di tossicità per la riproduzione, per esempio: "la sensibilità calcolata negli studi di tossicità ripetuta per individuare possibili effetti sugli organi riproduttivi può essere inferiore a quella degli studi di tossicità nella riproduzione per via del minor numero di animali per gruppo" e "si verifica durante lo sviluppo dei feti e dei giovani animali a dosi più basse che negli adulti". Al contrario, ulteriori studi di tossicità nella riproduzione possono essere innescati sulla base del peso dell'evidenza".

In particolare, "studi di tossicità con dosi ripetute possono segnalare la necessità di procedere a studi di neurotossicità nello sviluppo". Principio che viene ulteriormente spiegato dicendo che possono rendersi necessari nuovi importanti studi se si dimostra che la sostanza:

1) determina anomalie strutturali del sistema nervoso centrale
2) causa chiari segni di disfunzione funzionale o del comportamento per il coinvolgimento del sistema nervoso negli studi su adulti, per esempio negli studi di tossicità a dosi ripetute.
3) ha una modalità di azione che è stata strettamente collegata agli effetti neurotossici o di neurotossicità nello sviluppo.

Le stime degli studi sulla tossicità con dosi ripetute (Bitsch et al., 2006) suggeriscono che intorno al 10% delle sostanze chimiche hanno effetti neurotossici, perciò ipotizziamo che nella metà dei casi (5%) verranno presi in considerazione studi DNT e nel 2,5% dei casi verranno eseguiti, come suggerito nel metodo OECD TG 426. Ciò viene contestato da alcuni esperti ma ottimisticamente noi ipotizziamo che questo sarà possibile nella metà dei casi, con un 50% di riduzione dei costi e senza animali addizionali.

In aggiunta, si suggerisce che "la presenza di disturbi al sistema endocrino e danni alle ghiandole endocrine viene contemplata nel 10% delle sostanze chimiche (Bitsch et al., 2006), ciò che potrebbe indurre ad analoghe congetture nel 2,5% degli studi per due generazioni determinati dagli studi sulle dosi ripetute degli Allegati VIII e IX, per cui si può analogamente dedurre che un 2,5% di studi su due generazioni possano essere innescati da studi degli Allegati VIII e IX. Per i diversi test, le linee guida non identificano alcuna alternativa in vitro ufficialmente accettata dalla UE o da OECD né (Q)SAR ("non possono essere adeguatamente sostituiti da una batteria di modelli (Q)SAR").

La tossicità nella riproduzione risulta particolarmente difficile per le predizioni fondate sulla struttura, dal momento che talvolta persino gli enantiomeri o piccolissime modifiche alla struttura chimica cambiano il profilo tossico, come è ben noto per sostanze a rischio quali la thalidomide o i derivati della vitamina A. In effetti, una verifica sistematica dei più promettenti programmi (Q)SAR ha portato a risultati deludenti (Maslankiewicz et al., 2005). Il modello DEREKfW è stato testato con circa 100 sostanze tossiche per la riproduzione incluse nell'Allegato I della Direttiva 67/548/EEC. Circa il 90% delle sostanze classificate come sostanze che "compromettono la fertilità" e l'81% delle sostanze chimiche che danneggiano il feto non sono state individuate. Il sistema di categorizzazione di TSCA (Toxic Substances Control Act), programma EPA per le nuove sostanze chimiche non è riuscito nel 77% dei casi a individuare sostanze chimiche classificate nell'UE come agenti capaci di danneggiare la fertilità dei mammiferi, e non ha identificato correttamente l'82% delle sostanze tossiche per lo sviluppo.

Gli approcci in vitro vengono promossi dal progetto della UE RepProTect (Hareng et al., 2005), ma una strategia sostitutiva non è prevedibile. Attualmente, l'approccio più significativo è il processo di validazione di un test esteso di tossicità nella riproduzione su una generazione come sostituto del test su due generazioni. (Bremer et al. 2006, Spielmann and Vogel 2007, ECETOC 2008). Tuttavia, i risultati positivi dei test in vitro possno portare alla richiesta di ulteriori test ("un risultato positivo in un test in vitro validato potrebbe fornire una giustificazione per ulteriori test").

Mettendo insieme tutte queste considerazioni, al massimo il 21% dei test con animali vertebrati possono essere evitati sulla base dell'1% dei dati esistenti, <5% grouping, < 5% alteratori del sistema endocrino, <5% classificati cancerogeni e mutageni per le celule germinali, e <5% esposizione trascurabile. Il contributo delle alternative in vitro o (Q)SAR non è preso in considerazione. In particolare, c'è la possibilità di risparmiare qualcosa applicando il test solo alla dose limite di >1000 mg/kg più un gruppo di controllo, ma le linee guida del REACH per le industrie non menzionano neppure questa opzione, che non è quindi

stata ulteriormente considerata. Tutte queste considerazioni sono state riassunte nella Tabella 16, dove vengono elencati anche i costi medi.

4.8 BioAccumulo nei pesci

Il test ufficiale (solitamente l'OECD TG 305) è richiesto nell'Allegato IX così come quello per le sostanze PBT as well as for PBT substances).

Le linee guida sono conservative (ECHA, 2008b): "Data l'importanza di questo endpoint nella valutazione di una sostanza e il numero relativamente piccolo di sostanze che sono state correttamente testate, è necessario un approccio prudente". L'ECB considera un 19% di dati disponibili. L'impiego di modelli (Q)SAR per l'elucidazione della bioaccumulazione è largamente utilizzata per questo endpoint (Weisbrod et al. 2007, Caesar Project 2009), e fornisce un ulteriore contributo alla riduzione della domanda per i test in vivo.

Si ipotizza che il 10% delle sostanze chimiche verranno testate in accordo con gli Allegati IX e X. Inoltre, si assume che circa l'1% delle sostanze degli Allegati VII e VIII potrebbero essere classificate come PBT.

4.9 Tossicità acuta a lungo e a breve termine nei pesci

I test di tossicità a breve termine sui pesci sono richiesti nell'Allegato VIII, cioè per sostanze commercializzate in quantità superiori a 10 t/a. E' possibile evitare il test se è improbabile che la sostanza determini tossicità dell'acqua, per esempio se è altamente insolubile nell'acqua; ipotizziamo che questo avvenga nel 10% delle sostanze chimiche. Secondo l'ECB esistono dati per il 49% delle sostanze. Il test non è necessario quando è disponibile uno studio di tossicità a lungo termine, vale a dire, secondo l'ECB, nel 7% dei casi, ma si tratta di sostanze per le quali, generalmente, è disponibile anche uno studio di tossicità a breve termine. Ciò significa che il test verrà eseguito sul 45,9% delle sostanze. Stando alle linee guida dell'ECHA sui requisiti informativi (ECHA, 2008b), il metodo OECD TG 203 è il metodo accettato per l'accertamento della tossicità a breve termine sui pesci. Il costo medio per ogni test è di 4.200 euro (Fleischer, 2007), con un utilizzo di 42 pesci (van der Jagt et al. 2004). Inoltre ipotizziamo che nella metà dei casi verrà utilizzato l'approccio validato threshold-step-down, che riduce l'utilizzo di animali del 60%.

Per le sostanze elencate nell'Allegato IX è sempre richiesto un test di tossicità a lungo termine e non viene aggiunto alcuno studio nell'Allegato X. Per la tossicità a lungo termine nei pesci, i metodi preferiti sono OECD TG 210, 212 e 215, poiché essi prendono in considerazione diversi fasi nello sviluppo vitale dei pesci. Il metodo più usato è l'OECD TG 210, che ha un costo medio di 26.000 e 400 pesci per ogni sostanza chimica analizzata. Pensiamo che il test di tossicità a lungo termine sui pesci sia richiesto per il 5% delle sostanze prodotte in quantitativi <100t/a e per il 10% delle sostanze prodotte in quantitativi >100t/a.

4.10 Tossicità negli uccelli

Anche se REACH richiede questo test per le sostanze dell'Allegato X, l'esperienza con questo tipo di verifica è minima. Quindi sono pochissimi i dati e i metodi alternativi a disposizione. Poiché gli esoneri per le sostanze oltre le 1000 t/a sono altamente improbabili, ipotizziamo che questo test venga applicato nel 10% dei casi. Due metodi importanti, OECD TG 223 e OECD TG 205 utilizzano 70 uccelli (ECHA, 2008c); assumiamo che vengano usati con pari frequenza. La legge chiede studi per la tossicità a lungo termine ma a questo proposito non è ancora disponibile alcun test. Data l'incertezza e i numeri ridotti, si ipotizza che questo capitolo non incida sui conteggi finali.

Tabella 17 . Stima del numero di animali necessari per i dossier di registrazione, secondo lo scenario 3. Totale: 54,4 milioni di animali

Test	OECD TG	Media di animali per test	≥1t/a	≥10t/a	≥100t/a	≥1000t/a	≥1t/a 44.632	≥10t/a 11.570	≥100t/a 5.721	≥1000 6.286	Totale	%

Irritazione degli occhi in vivo	405	1,3	14%	14%	14%	14%	8.123	2.106	1.041	1.144	12.414	0,02%
Sensibilizzazione cutanea	429 429 R 406	16 8 23	25,7% 25,7% 25,7%	25,7% 25,7% 25,7%	25,7% 25,7% 25,7%	25,7% 25,7% 25,7%	183.527 91.763 263.820	45.576 23.788 68.390	23.524 11.762 33.816	25.847 12.923 37.155	823.892	1,52%
Tossicità acuta	420/423/425 403 402	12 45 20	42,7%	42,7% 6,4% 57,6%	42,7% 6,4% 57,6%	42,7% 6,4% 57,6%	228.694	59.285 33.322 133.286	29.314 16.476 65.904	32.208 18.103 72.411	689.003	1,27%
Tossicità con dose ripetuta	407 410 412 408 411 413	40 40 40 80 80 80		21,9% 5,5% 0,6%	21,9% 5,5% 0,6% 79,2% 7,9% 9,0%	21,9% 5,5% 0,6% 79,2% 7,9% 9,0%		101.353 25.454 2776,8	50.115 12.586 1.373 362.472 36.156 41.190	55.063 13.829 1.509 398.263 39.726 45.257	1.187.122	2,19%
Mutagenicità	vedi testo	70	21,2%	72,0%	74,4%	74,4%	662.339	583,128	297.941	327.360	1.870.768	3,45%
Cancerogenicità	451	400	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	17.853	4.628	2.288	25.143	49.912	0,09%
Tossicità per la riproduzione	421 422 414 414, 2°specie 416 416, 2°specie 426	560 412 784 560 3200 2100 1400		67% 33% 1% 3,5% 1,25%	67% 33% 95% 76% 3,5% 1,25%	100% 80% 1,25%		4.341.064 1.573.057 90.709 1.295.840 202.475	2.146.459 777.805 4.260.882 2.434.790 640.734 100.115	20.114.299 10.560.007	48.648.236	89,62%
BioAccumulo (pesci)	305	16		1%	10%	10%		1.851	9.153	10.057	21.062	0,039%
Tossicità a breve termine (pesci)	203	42		45,9				223.046			223.046	0,41%
Tossicità a lungo termine (pesci)	210 (212, 215)	400		5%	10%	10%		231.400	228.834	251.429	711.662	1,31%
Tossicità degli uccelli lungo ter.	205, 223	70				10%				44.000	44.000	0,08%

Tabella 18 . Stima dei costi necessari per i dossier di registrazione, secondo lo scenario 3. Totale: 9,5 miliardi di euro

Test	OECD TG	Costo medio migliaia di euro	≥1t/a	≥10t/a	≥100t/a	≥1000t/a	≥1t/a 44.632	≥10t/a 11.570	≥100t/a 5.721	≥1000 6.286	Totale in migliaia di euro	%
Irritazione degli occhi in vivo	405	1.1	14%	14%	14%	14%	6.873	1.782	881	968	10.504	0,11%

Sensibilizzazione cutanea	**429** **429 R** **406**	**3.29** **2** **4**	**25,7%** **25,7%** **25,7%**	**25,7%** **25,7%** **25,7%**	**25,7%** **25,7%** **25,7%**	**25,7%** **25,7%** **25,7%**	**37.738** **22.941** **45.882**	**9.783** **5.947** **11.894**	**4.837** **2.941** **5.881**	**5.315** **3.231** **6.462**	**162.850**	**1,71%**
Tossicità acuta	**420/423/425** **403** **402**	**1.5** **11.7** **2**	**42,7%**	**42,7%** **6,4%** **57,6%**	**42,7%** **6,4%** **57,6%**	**42,7%** **6,4%** **57,6%**	**28.587**	**7.411** **8.664** **13.329**	**3.664** **4.284** **6.590**	**4.026** **4.707** **7.241**	**88.502**	**0,93%**
Tossicità con dose ripetuta	**407** **410** **412** **408** **411** **413**	**49.4** **49.6** **105.5** **115,7** **135** **250**		**21,9%** **5,5%** **0,6%**	**21,9%** **5,5%** **0,6%** **79,2%** **7,9%** **9,0%**	**21,9%** **5,5%** **0,6%** **79,2%** **7,9%** **9,0%**		**125.171** **31.563** **7323.81**	**61.891** **15.606** **3.621** **524.226** **61.013** **128.719**	**68.003** **17.147** **3.979** **575.988** **67.037** **141.429**	**1.832.718**	**19,22%**
Mutagenicità	**vedi testo**	**10.8**	**21,2%**	**72,0%**	**74,4%**	**74,4%**	**102.189**	**89.968**	**45.968**	**50.507**	**288.633**	**3,03%**
Cancerogenicità	**451**	**780.4**	**0,1%**	**0,1%**	**0,1%**	**1,0%**	**34.831**	**9.029**	**4.465**	**49.054**	**97.378**	**1,02%**
Tossicità per la riproduzione	**421** **422** **414** **414, 2°spec.** **416** **416, 2°spec.** **426**	**54.6** **92** **63.1** **92.5** **328** **481** **1100**		**67%** **33%** **1%** **3,5%** **1,25%**	**67%** **33%** **95%** **76%** **3,5%** **1,25%**	**100%** **80%** **1,25%**		**423.254** **351.265** **7.301** **132.824** **159.088**	**209.280** **173.685** **342.936** **402.175** **65.675** **78.662**	**2.061.716** **2.417.860** **86. 429**	**6.912.147**	**72,49%**
BioAccumulo (pesci)	**305**	**10**		**1%**	**10%**	**10%**		**1.157**	**5.721**	**6.286**	**13.164**	**0,14%**
Tossicità a breve termine sui pesci	**203**	**4.2**		**45,9**				**22.305**			**22.305**	**0,23%**
Tossicità pesci a lungo termine	**210** **(212, 215)**	**26.3**		**5%**	**10%**	**10%**		**15.215**	**15.046**	**16.531**	**46.792**	**0,49%**
Tossicità degli uccelli lungo ter.	**205, 223**	**96.2**				**10%**				**60.469**	**60.469**	**0,63%**

4.11 Compendio delle ipotesi e dei risultati

Le Tabelle 17 e 18 compendiano tutte le ipotesi dei precedenti paragrafi. Risulta abbastanza chiaro che gli studi più impegnativi sono quelli relativi ai test di tossicità per la riproduzione, con circa il 90% di tutti gli animali e il 70% dei costi per la registrazione.

Questo studio, fondato su stime piuttosto conservative, ha corretto il numero delle sostanze chimiche alle quali si applica il REACH a partire dal 1994, considerando la crescita dell'industria chimica e l'aumento degli Stati membri dell'UE, arrivando alla cifra di 68.000 sostanze circa. Ha inoltre computato il più basso numero di animali per test e trascurato la maggior parte delle situazioni che richiedono test supplementari per sospetto CMR (vedi glossario) e sostanze a lunga biopersistenza come pure i risultati di altri test *in vitro/in vivo/in silico* che richiedono ulteriori indagini, nonché tutta una serie di richieste di indagini non ancora definite (squilibri endocrini, irritazione respiratoria, sensibilizzazione respiratoria, neurotossicità nello sviluppo, ecc.). Le ipotesi che abbiamo formulato sono passate al vaglio degli esperti citati nei "ringraziamenti". Il risultato complessivo suggerisce un fabbisogno di 54 milioni di animali vertebrati e un costo di 9,5 miliardi di euro. Data la natura delle ipotesi che abbiamo avanzato, sono cifre che rappresentano lo scenario più ottimista. Che deve essere raffrontato con i 90.000 animali usati ogni anno in Europa per i test sulle nuove sostanze chimiche. REACH punta a completare la raccolta dei dati per la fine del 2018. Per quella data, le sostanze chimiche degli Allegati VII e VIII, che non hanno bisogno di autorizzazione per essere testate secondo quanto suggerito dal regolamento, devono essere registrate. In parallelo, per le sostanze dell'Allegato IX che devono essere registrate entro il 2013, il permesso di eseguire i test necessari deve essere dato entro due anni, e la loro esecuzione deve avvenire negli anni successivi. Così, la maggior

parte dei test comincerà intorno al 2012, cioè due anni dopo la registrazione delle sostanze dell'Allegato X, e in larga misura dovrebbero essere completati nel periodo relativamente breve di 6 anni. In teoria, questo significa che l'uso di animali nell'ambito dei test per le sostanze chimiche aumenterà di 100 volte mentre raddoppierà l'uso complessivo di animali in Europa. Tutto ciò ipoteca senza dubbio la fattibilità del programma. Senza un massiccio investimento in tecniche avanzate ad ampio spettro questo programma non può essere completato in un arco di tempo ragionevole. E' altrettanto ovvio che tali metodologie non saranno disponibili nel 2012.

In particolare, proprio nelle aree che richiedono un maggior numero di animali e investimenti – tossicità nella riproduzione, tossicità a dosi ripetute, tossicità a lungo termine nei pesci – non sono ancora emersi significativi approcci alternativi. Quanto meno non ci sono metodi in via di validazione e questo significa che non possiamo aspettarci alcun tipo di validazione/peer review/accettazione prima del 2018. Una eccezione di rilievo è la possibilità di sostituire lo studio su due generazioni con uno studio esteso su una generazione (Bremer et al. 2007, Spielmann and Vogel 2007, Moore et al. 2009). Ciò ridurrebbe l'utilizzo di animali per il test di un 40%-60%, portando a una riduzione del 15% nell'uso complessivo di animali. Ma questo inciderà sul costo dei test solo se lo studio esteso su una generazione, e cioè DNT e immuno-tossicità, non saranno resi obbligatori. In caso contrario, i costi dei test su due generazioni e quelli estesi/una generazione non differiranno sostanzialmente.

5 Conclusioni

La ri-valutazione del numero di animali e dei costi del REACH dimostra che le stime devono essere aumentate in modo sostanziale. Le pre-registrazioni hanno chiaramente superato ogni previsione e diversi fattori – come l'allargamento dell'UE a nuovi Stati membri e la crescita dell'industria chimica – sono stati trascurati nei primi studi in materia. Le linee guida per le industrie pubblicate dall'ECHA non offrono le auspicate possibilità di esonero e con ogni evidenza è stata ottimisticamente sopravvalutata la disponibilità di altre fonti di verifica delle caratteristiche e dei rischi inerenti alle sostanze chimiche. Nello stesso tempo, malgrado gli incentivi, lo sviluppo e la validazione di metodi alternativi sono stati minimi per gli endpoints più complessi. I successi ottenuti nelle aree della tossicità topica e acuta, della tossicità acuta nei pesci e della sensibilizzazione non si traducono in risparmi importanti, data la preponderanza di richieste di test relativi alla tossicità nella riproduzione. Questo mancato progresso è vero in modo particolare negli impegnativi settori della tossicità nella riproduzione e della tossicità a lungo termine nei pesci, con la sola eccezione del test esteso su una generazione (extended one-generation test) per rimpiazzare il test su due generazioni.

Date queste premesse, la fattibilità del REACH va rimessa in discussione. Inevitabilmente, sarà necessario sia fissare delle priorità nella richiesta dei test da eseguire sia ripensare il tipo di approccio e le metodologie impiegate per testare le sostanze, così come suggerito dall'EPA negli Stati Uniti (EPA 2009). E' fuori dubbio che lo scopo primario del REACH è proteggere la salute umana e l'ambiente da un'indesiderata esposizione ad agenti chimici. La sfida sarà raggiungere l'obiettivo in modo appropriato nel contesto del REACH facendo ricorso a tutte le informazioni e all'esperienza di cui disponiamo e riconoscendo che la maggior parte delle sostanze chimiche sono state prodotte e utilizzate in modo sicuro per molti anni senza test estensivi sugli animali.

Ringraziamenti

Questo studio ha dovuto formulare un certo numero di ipotesi laddove non erano disponibili fatti e numeri affidabili. Per la revisione critica di questi assunti e della plausibilità complessiva dei calcoli nonché per i suggerimenti avanzati, gli autori sono particolarmente grati a Neil Carmichael (ECETOC), Watze de Wolf (Dupont), Manfred Liebsch (German Federal Institute for Risk Assessment), David Owen (Shell), Richard D. Phillips (Exxon-Mobil) e Bennard van Ravenzwaay (Basf). Ringraziamo anche Wolfram Riedel (Bioservice) per ulteriori notizie sui costi e su specifici test con animali.

Corrispondenza:

Prof. Thomas Hartung, PD, PhD. Doerenkamp-Zbinden Professor and Chair for Evidence-based Toxicology John Hopkins University.

Bloomberg School of Public Health. Department of Environmental Health Sciences.

Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) 615 N.Wolfe St. Baltimore,MD. 21205, USA

Email: thartung@jhsph.edu

Riferimenti

*Allanou, R., Hansen, B. J. and Van der Bilt, Y. (1999). Public Availability of Data on EU High Production Volume Chemicals. JRC Report EUR 18966 EN (http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/) (consultato il 17 luglio 2009).
*ALTEXNews (2009). OECD: Experts approve new test guidelines for acute inhalation toxicity. http://www.altex.ch/de/index.html?id=17&ncat=1&nid=114 (visto 17 July 2009).
*Angerer, G., Sartorius, C., Skulimowski, A. M. J., Nordbeck, R., Luo, Z., Wolf, O. and Delgado, L. (2007). Implementation of REACH in the New Member States. Part two: Business Case Studies in Selected New Member States. *JRC Scientific and Technical Reports*; ftp.jrc.es/EURdoc/22790_2-ExeSumm.pdf (consultato il 2 agosto 2009).
*Barrat, M., Hoffmann, S. and Hartung, T. (2007). The suitability of 400 REACH-relevant existing chemicals for evaluation by in silico methods. *Risultati non pubblicati*.
*Benfenati, E. (2007). Predicting toxicity through computers: a changing world. *Chemistry Central Journal 32*, 1-7.
*Bitsch, A., Jacobi, S., Melber, C., Wahnschaffe, U., Simetska, N. and Mangelsdorf, I. (2006). REPDOSE: A database on repeated dose toxicity studies of commercial chemicals – A multifunctional tool. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 46 (3),* 202-210.
*Blasco, A., Santacreu, M. A., Thompson, R. and Haley, C. S. (1993). Estimates of genetic parameters for ovulation rate, prenatal survival and litter size in rabbits from an elliptical selection experiment. *Livestock Production Science. 34 (1-2),* 163-174.
*Bottini, A. and Hartung, T. (2009). Food for Thought … on the Economics of Animal Testing. *ALTEX 26*, 1-9.
*Bremer, S., Pellizzer, C., Hoffmann, S., Seidle, T. and Hartung, T. (2007). The development of new concepts for assessing reproductive toxicity applicable to large scale toxicological programs. *Curr. Pharm. Des. 13*, 3047-3058.

*Caesar Project (2009). Bioconcentration factor (BCF): The Endpoint. http://www.caesar-project.eu/ (visto il 17/07/2009).
*CEFIC (2009). Facts and Figures – The European Chemical Industry in a worldwide perspective, January 2009. http://www.cefic.be/factsandfigures/level02/growthindustry_index.html (consultato il 17 July 2009)
*Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. and Warwick C. (1997). Recommendation for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab. Anim. 31*,14-15.
*Cooper, R. L., Lamb, J. C., Barlow, S. M., Bentley, K., Brady, A. M., Doerrer, N. G., Eisenbrandt, D. L., Fenner-Crisp, P. A., Hines, R. N., Irvine, L. F. H., Kimmel, C. A., Koeter, H., Li, A. A., Makris, S. L., Sheets, L. P., Speijers, G. J. A. and Whitby, K. E. (2006). *Critical Reviews in Toxicology, 36*, 69-98.
*Directive 67/548/EEC (1967). COUNCILDIRECTIVE67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Official Journal of the European Communities, P 196.*
*Directive 92/32/EEC (1992). Council Directive 92/32/EEC of 30 April 1992 amending for the seventh time Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, *Official Journal of the European Communities, L 154.*
*ECHA (2008a). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. 428pp.
http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r7a_en.pdf?vers=20_08_08 (consultato il 17 giugno 2009).
*ECHA (2008b). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance. 234pp.
http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r7b_en.pdf?vers=20_08_08 (consultato il 17 giugno 2009).
*ECHA (2008c). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7c: Endpoint specific guidance. 235pp.
http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r7c_en.pdf?vers=20_08_08 (consultato il 17 giugno 2009).
*ECHA Memo (2008). REACH Pre-registration & Registration – Questions and Answers. MEMO/08/240, Brussels, 11th April 2008.
*ECHA Comunicato stampa (2008). 19 dicembre 2008 ECHA/PR/08/59.
http://echa.europa.eu/doc/press/pr_08_59_pubblication_pre-registered substances_list_20081219.pdf (consultato il 17 luglio 2009).

*ECHA Comunicato stampa (2009). 27 marzo 2009 ECHA/PR/09/03. http://echa.europa.eu/doc/press/pr_09_03_list_prereg_substances_20090327.pdf (consultato il 17 luglio 2009)
*ECETOC (2008). Workshop Report No. 12. Extended One-Generation Reproduction Toxicity Study, 14-15 April 2008, Barza d'Ispra, Italy, http://www.ecetoc.org/.
*EPA (2009a). High Production Volume Information System (HPVIS) http://www.epa.gov/HPV/hpvis/index.html (consultato il 17 luglio 2009).
*EPA (2009b). The U.S. Environmental Protection Agency's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals. http://www.epa.gov/osa/spc/toxicitytesting/ (consultato il 17 luglio 2009).
*Finn, C. A. (1963). Reproductive capacity and litter size in mice: effect of age and environment. *Journal of Reproduction and Fertility. 6*, 205-214.
*Fleischer, M. (2007). Testing Costs and Testing Capacity According to the REACH Requirements – Results of a Survey of Independent and Corporate GLP Laboratories in the EU and Switzerland. *Journal of Business Chemistry 4,* 96-114.
*Hareng, L., Pellizzer, C., Bremer, S., Schwarz, M. and Hartung, T. (2005). The Integrated Project ReProTect: a novel approach in reproductive toxicity hazard assessment. *Reproductive Toxicology, 20*, 441-452.
*Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century. *Nature 460,* 208-212.
*Höfer, T., Gerner, I., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R. and Wettig, K. (2004). Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol. 78*, 549–564.
*Hoffmann, S., Cole, T. and Hartung T. (2005). Skin irritation: prevalence, variability, and regulatory classification of existing in vivo data from industrial chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol, 41*, 159-166.
*IEH Report (2001). Testing requirements for proposals under the EC white paper 'strategy for a future chemicals policy'. Institute for Environment and Health, http://www.cranfield.ac.uk/health/researchareas/environmenthealth/ieh/ieh%20publications/w6.pdf, (consultato il 22 luglio 2009).
*Kidwell, J. F. and Weeth, H. J. (1959). Sex ratios and litter size in the laboratory rat. *J. Heredity 49*, 303-304.
*Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. and Müller, L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 584 (1-2),* 1-256.
*Maslankiewicz, L., Hulzebos, E. M., Vermeire, T. G., Müller, J.J.A. and Piersma, A. H. (2005). Can chemical structure predict reproductive toxicity? RIVM report 601200005. http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/7374/1/601200005.pdf, (consultato il 17 luglio 2009).
*Moore, N., Bremer, S., Carmichael, N., Daston, G., Dent, M., Gaoua-Chapelle, W., Hallmark, N., Hartung, T., Holzum, B., Hübel, U., Meisters, M.-L., Schneider, S., van Ravenzwaay, B. and Hennes, C. (2009). A modular approach to the extended one-generation reproduction toxicity study: Outcome of an ECETOC task force and International ECETOC/ECVAM workshop. *ATLA – Altern. Lab. Anim. 37*, 219-225.
*Pedersen, F., de Bruijn, J., Munn, S. and van Leeuwen, K. (2003). Assessment of additional testing needs under REACH – effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. *JRC Report EUR 20863*. http://home.hetnet.nl/~REACH/downloads/reachtestingneedsfinal.pdf (consultato il 27 luglio 2009).

*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. *Official Journal of the European Union, L 396/1-849.*
*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 440 (2008). COUNCILREGULATION (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal of the European Union. L 142, 1-739.*
*Roe, D., Pease, D., Florini, K. and Silbergeld, E. (1997). Toxic Ignorance: The continuing absence of basic health testing for Defense Fund, pp85 http://www.edf.org/documents/243_toxicignorance.pdf (consultato il 22 giugno 2009).

*Rorije, E. and Hulzebos, E. (2005). Evaluation of (Q)SARs for the Prediction of Skin Irritation/Corrosion Potential Physico-chemical exclusion rules. ECB publication, pp45 http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/QSAR/Evaluation_of_Skin_Irritation_QSARs.pdf (consultato il 18 June 2009).
*RPA and Statistics Sweden (2002). Assessment of the impact of new regulations in the chemicals sector. Final Report prepared for European Commission, DG ENTR.

http://ec.europa.eu/enterprise/reach/docs/whitepaper/bia_report-2002_06_en.pdf (consultato il 24 luglio 2009)
*Spielmann, H. and Vogel, R. (2007). The extended 1-generation study (OECD 415), as a replacement of the mammalian 2-generation study (OECD 416). *AATEX, 14*, 795-798.
*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 (consultato il 27 luglio 2009).
*Weisbrod, A. V., Burkhard, L. P., Arnot, J., Mekenyan, O., Howard, P. H., Russom, C., Boethling, R., Sakuratani, Y., Traas, T., Bridges, T., Lutz, C., Bonnell, M., Woodburn, K. and Parkerton, T. (2007). Workgroup Report: Review of Fish Bioaccumulation Databases Used to Identify Persistent, Bioaccumulative, *Toxic Substances. Environ Health Perspect. 115(2),* 255–261.
*White Paper (2001). Strategy for a future Chemicals Policy. Brussels, 27.2.2001 *COM(2001) 88 final*; www.sfc.fr/LivreBlancEU-REACH-01-2.pdf (consultato il 2 agosto 2009).

L'articolo originale in lingua inglese Re-Evaluation of Animal Numbers and Costs for In Vivo Tests to Accomplish REACH Legislation Requirements for Chemicals - a report by the Transatlantic Think Tank for Toxicology (t4) di Costanza Rovida e Thomas Hartung è uscito su ALTEX 26 - 3/09 - 187-201 (http://altweb.jhsph.edu/altex/26_3/index.html). Traduzione italiana: Vanna Brocca e Costanza Rovida.