

PROPRIETA' GENOTOSSICHE E PRE-SCREENING DI CANCEROGENESI

A. CARERE

Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO. - Dopo una introduzione sullo stato attuale delle conoscenze sull'impiego di tests di mutagenesi per la valutazione del rischio genetico e per la predizione di quello cancerogeno, si fa riferimento ai lavori svolti in sede CEE (Lussemburgo) per la definizione dei tests di mutagenesi (All. V) per il dossier minimo della VI Modifica

Dopo ampia discussione si è arrivati ad un accordo sulla necessità di utilizzare due tests, uno in un sistema genetico batterico (test di mutazioni geniche) ed uno a livello eucariotico (test di mutazioni cromosomiche). Sono stati inoltre definiti i protocollo sperimentali di 5 saggi di mutagenesi (test di mutazioni geniche in *Salmonella* ed in *E. coli*; test in vitro per l'induzione di aberrazioni cromosomiche in colture di cellule di mammifero; test in vivo per le aberrazioni cromosomiche nel midollo osseo di roditori; test del micronucleo in roditori).

Si fa riferimento ai suggerimenti dell'OCSE ed infine si discute il significato di tali scelte confrontandole con quelle di altre direttive della CEE.

Si conclude con un accenno a quanto si prevede per l'allegato VIII.

Prima di descrivere e commentare la situazione attuale riguardante la definizione dei tests di mutagenesi di

pre-screening della cancerogenesi nell'ambito della direttiva CEE 79/831 (VI Modifica), che è l'argomento di questo convegno, ritengo opportuno fare delle considerazioni generali sulla mutagenesi e sui criteri da seguire nella scelta dei tests.

La problematica della mutagenesi chimica ha acquistato una nuova e più importante dimensione dalla realizzazione che le mutazioni indotte in animali come i mammiferi (uomo compreso) possono riguardare non solo le cellule germinali interferendo con i meccanismi ereditari e producendo effetti deleteri come le malattie congenite, gli aborti e rari casi di cancro (retinoblastoma bilaterale), ma possono esercitare i loro effetti anche in cellule di tessuti di vari organi, cioè a livello delle cellule somatiche. Oggi si ritiene che le mutazioni somatiche siano uno dei meccanismi d'iniziazione della crescita tumorale; anche se restano ancora molti punti da chiarire sullo sviluppo del cancro, attualmente sono disponibili molte evidenze a favore di una stretta associazione tra potenziale cancerogeno e potenziale mutageno per la maggior parte degli agenti chimici. Conseguenza di questa realizzazione è che l'attività mutagena degli agenti chimici viene guardata come un possibile rischio per la salute umana non solo per le generazioni future, fatto di per sé tutt'altro che trascurabile, ma anche per le possibili conseguenze sugli individui attualmente esistenti.

Un altro fatto importante è stato la realizzazione che i fattori ambientali, e tra questi soprattutto gli agenti chimici, rappresentano le cause principali di cancro; una grande quantità di conoscenze accumulate nell'area della genetica fa ritenere probabile che essi possano svolgere i loro effetti deleteri anche a livello delle cellule germinali nella popolazione umana. Essendo quindi teoricamente possibile una prevenzione primaria assume importanza fondamentale l'identificazione degli agenti mutageni e/o cancerogeni prima che vengano a contatto con l'uomo. La consapevolezza della gravità ed irreversibilità dei rischi mutageni e/o cancerogeni che possono essere causati dal sempre crescente numero di prodotti chimici che vengono a contatto con l'uomo attraverso le vie più disparate, ha spinto le autorità sanitarie ed amministrative di vari Paesi e di organizzazioni sovranazionali come la CEE a cercare di definire normative per il controllo dei suddetti rischi, così come in passato si è fatto per le radiazioni. C'è tuttavia da osservare che tali iniziative si muovono molto lentamente, essendo quasi tutte in fase di

studio e non ancora ufficializzate, soprattutto a livello comunitario.

Oggi le proposte dei tests di mutagenesi possono essere formulate, nel quadro di qualsiasi programma tossicologico generale, sulla base di un impressionante "background" di conoscenze scientifiche sui meccanismi genetici ed anche sulla base di uno sviluppo imponente di procedure sperimentali che possono essere impiegate, alcune delle quali sono state convalidate a livello internazionale (Hollstein et al., Mutat. Res., 65, 1979, 133-226).

L'obiettivo principale dei tests di mutagenesi è quello di scoprire se un agente chimico può interagire con i meccanismi ereditari della cellula ad ognuno dei tre livelli di organizzazione genetica e cioè gene, cromosoma, genoma. Oltre ai tests che utilizzano eventi genetici specifici ai suddetti tre livelli di organizzazione genetica (tests di mutagenesi propriamente detti), sono rilevanti, ai fini della tossicologia genetica e del pre-screening di cancerogenesi, anche i tests che controllano l'induzione di danni primari al DNA attraverso misure di stimolazione o inibizione della ricombinazione e della riparazione.

Dato che nessuno dei tests sinora messi a punto, per quanto sensibile, è capace da solo di provvedere tutta questa informazione, per ora non esiste alternativa alla necessità di sottoporre gli agenti chimici ad una batteria di tests. Mentre l'approccio multi-test sembra ormai accettato internazionalmente, non c'è ancora pieno accordo su quale scelta e quale sequenza particolare di tests sia la più appropriata. In linea generale si possono distinguere tre tipi principali di approccio multi-test: 1) quello del "tier-test", cioè di diversi livelli di richieste a seconda dell'entità dell'esposizione; 2) quello della batteria di un numero fisso di tests complementari; 3) quello gerarchico, che in un certo senso combina gli elementi principali dei primi due approcci e prevede l'applicazione progressiva di tests di verifica; in pratica si basa sul riconoscimento di gerarchie di tests per gli stessi eventi genetici, dai più semplici a quelli più complessi e significativi per l'estrapolazione dei dati all'uomo.

E' difficile dire a priori quale di questi approcci sia il migliore. Un esempio tipico di approccio di batteria è quello formulato dalla Commissione Ministeriale Italiana per la Mutagenesi, Cancerogenesi e Teratogenesi (DM 5/V/77) che prevede, per tutte le sostanze chimiche nuove, l'impiego di cinque tests: due per l'induzione di

mutazioni geniche (uno procariotico ed uno eucariotico), due per le aberrazioni cromosomiche (un test "in vitro" ed uno "in vivo") ed un test per i danni primari al DNA (riparazione o ricombinazione). I risultati che si possono ottenere dall'impiego integrato e parallelo dei cinque tests permettono, rapidamente e con una spesa non eccessiva, di arrivare ad una valutazione adeguata del potenziale genetico degli agenti chimici ed anche del loro potenziale cancerogeno.

Un esempio degno di menzione, sia perchè storicamente è stato il primo, sia perchè ha influenzato i successivi, è l'approccio legislativo noto come "three-tier test protocol" formulato nel 1972 dal genetista inglese B. Bridges. L'approccio di Bridges era ispirato dai seguenti tre principi generali: 1) un mutageno chimico non deve essere immesso nell'ambiente umano se esiste un sostituto non mutageno; 2) l'estensione ed il rigore delle procedure di "screening" dovrebbero essere correlati all'intensità dell'esposizione e diffusione umana; 3) un agente mutageno può essere usato se il beneficio che comporta supera il rischio. Il protocollo distingue inoltre tre livelli di procedure: a) due tests "in vitro" (uno per le mutazioni geniche ed uno per quelle cromosomiche) per le sostanze di cui non si preveda ingestione e che non si accumulino nei tessuti; b) sostanze di larga diffusione (additivi alimentari, farmaci, cosmetici, pesticidi, ecc.) debbono essere sottoposti ad altri due tests "in vivo" su mammiferi; c) le sostanze risultate mutagene al primo o secondo livello debbono essere sottoposte ad un terzo livello di procedure che permettano una valutazione quantitativa del rischio seguita da una valutazione del rapporto rischio/beneficio.

Per quanto riguarda i criteri generali da seguire nella scelta dei tests, criteri che dovrebbero soddisfare sia il rigore scientifico che quello sanitario, ritengo che i principali siano i seguenti: a) il valore predittivo dell'insieme dei tests per determinare ogni tipo di evento genetico o danno primario al DNA; b) il valore predittivo per gli effetti ereditabili a livello delle cellule germinali; c) il valore predittivo nei confronti della cancerogenesi; d) la sensibilità a varie classi chimiche di composti; e) la rilevanza metabolica e fisiologica per l'uomo; f) la riproducibilità dei risultati; g) dimensioni della popolazione cellulare tali da evidenziare aumenti minimi rispetto alla frequenza di mutazione spontanea. Inoltre, non vanno dimenticati criteri pratici come la possibilità d'impiego su larga scala, la disponibilità attuale

di competenze, il costo, la durata, la semplicità della messa a punto e la facilità nel preparare personale qualificato; inoltre, non essendo stata ancora dimostrata, almeno in maniera chiara, la superiorità di alcuni tests rispetto ad altri, occorre dare la possibilità di scegliere tra tests alternativi per l'induzione dello stesso evento genetico.

In linea teorica, una buona batteria dovrebbe comprendere sia sistemi specifici per l'induzione di mutazioni geniche e cromosomiche che tests indicatori di danni primari al DNA (ricombinazione o riparazione).

Per quanto riguarda la direttiva CEE 79/831 (VI Modifica) concernente la classificazione, l'imballaggio e la etichettatura delle sostanze pericolose, diverse riunioni svoltesi in Lussemburgo tra le delegazioni dei Paesi membri, hanno portato alla definizione dei tests di mutagenesi (compreso il pre-screening di cancerogenesi) per il dossier di base (Allegato VII) da consegnare all'atto della notifica.

La posizione iniziale della CEE, condivisa da molti Paesi membri, è stata quella di avvalersi delle raccomandazioni contenute in un documento preparato dal gruppo OCSE (OECD) ed intitolato "Principles for the evaluation of the mutagenic and carcinogenic potential of chemicals" perché in tal modo si potesse arrivare a delle formulazioni in accordo con le posizioni di altri Paesi industrialmente importanti come gli USA, il Giappone e la Norvegia, che non fanno parte della CEE. Secondo questo documento i tests di mutagenesi da impiegare per il "Minimum Pre-market Data Set" (MPD), cioè per il dossier di base debbono essere semplici, riproducibili, sensibili alla classe di composti chimici in esame, di costo accettabile e debbono aver dimostrato l'utilità nello "screening" di un certo numero di composti chimici. In particolare per il dossier di base si suggeriscono due tests: uno batteriologico per la induzione di mutazioni geniche (test di Ames in prima istanza, con la possibilità d'impiego dell'E.coli) ed uno citogenetico per le aberrazioni cromosomiche, con la preferenza accordata ai tests "in vitro" rispetto a quelli "in vivo" (analisi metafasica del midollo osseo oppure micronucleo in roditori). Dopo lunghe discussioni in Lussemburgo si è arrivati, con qualche inevitabile compromesso, alla seguente formulazione: 1) un test per l'induzione di mutazioni geniche in cellule procariotiche come la S. typhimurium; l'E.coli è anche accettabile. La scelta tra questi due microrganismi può essere determinata dalla na-

tura chimica della sostanza da saggiare; 2) un test per l'induzione di mutazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate "in vitro"; un test "in vivo" (test del micronucleo o analisi metafasica di cellule di midollo osseo di roditori) è anche accettabile. Oltre a ciò si è arrivati alla definizione dei protocolli sperimentali dei seguenti cinque tests utilizzabili per il dossier di base: test della S. typhimurium da applicare almeno su quattro ceppi (TA1535, TA1537, TA98 e TA100) con e senza attivazione metabolica; 3) test della reversione try⁻try⁺ in E. coli in tre ceppi (WP2, WP2uvrA e WP2uvrApKM 101) con e senza attivazione metabolica; 4) test citogenetico "in vitro" da applicarsi in colture di linee cellulari stabilizzate o colture primarie di cellule di mammifero; 5) test citogenetico "in vivo" in cellule del midollo osseo di roditori; 6) test del micronucleo in roditori.

C'è da osservare che la formulazione CEE, rispetto al documento OCSE, ha comportato un'attenuazione della priorità che era stata riconosciuta al test della Salmonella rispetto a quello dell'E. coli ed al test citogenetico "in vitro" rispetto a quelli "in vivo". A tale proposito occorre tener presente che l'impiego dei tre ceppi di E. coli WP2 proposti non può essere considerato equivalente all'impiego dei quattro ceppi di S. typhimurium per quanto riguarda la capacità di rivelare mutazioni puntiformi sia del tipo "sostituzione di base" che "inserzione o delezione" (in inglese "frame-shift"). Infatti il sistema genetico dell'E. coli WP2, che ha una mutazione "ochre" nello operon della triptofansintetasi, rivela essenzialmente mutazioni di tipo "sostituzione di base"; l'introduzione del plasmide pKM101 in uno dei ceppi WP2 permette di rilevare anche alcuni tipi di mutageni "frame-shift" ma non permette di rivelare altri tipi di "frame-shift" evidenziabili con i ceppi TA1537, TA1538 e TA98 di S. typhimurium: questi ultimi sono particolarmente sensibili alle mutazioni "frame-shift" grazie alla presenza, nel loro DNA, di sequenze nucleotidiche ripetute (-C-G-C-G-C-G-C-G- oppure -C-C-C-C-) che sono delle vere "hot spots" per la mutagenesi di certe classi di mutageni. C'è anche da dire che la presenza, nei ceppi di Salmonella, della mutazione rfa, che causa la perdita parziale della parete esterna lipopolisaccaridica della cellula batterica, facilita la diffusione di grosse molecole organiche (es. molte amine aromatiche e policiclici aromatici) dentro la cellula stessa. In conclusione si può dire che l'impiego dei ceppi di E. coli dovrebbe essere integrato con quello dei due ceppi

TA1537 e TA98 di Salmonella se non si vuole rischiare di non rivelare alcuni tipi di mutageni "frame-shift"; a tale riguardo è bene ricordare che le mutazioni di tipo "frame-shift", dal punto di vista genetico e forse cancerogeno sono da considerarsi più pericolose delle "sostituzioni di base".

Riguardo ai tests citogenetici si può dire che quelli "in vitro", almeno per lo screening iniziale, dovrebbe essere preferiti a quelli "in vivo", se non altro perchè più facilmente attuabili ed applicabili ad un ampio "range" di concentrazioni.

Le prossime riunioni in Lussemburgo saranno dedicate alla definizione dei criteri e dei tests da adottare per il dossier supplementare (Allegato VIII), che prevede due diversi livelli: il livello 1), per sostanze il cui quantitativo annuo è tra 10 e 50 tonnellate ed il livello 2), per quantitativi annui da 1.000 a 5.000 tonnellate. Riguardo al livello 1) si prevede quanto segue: nel caso di risultati negativi del dossier di base si debbono eseguire un test di verifica della mutagenesi (da scegliersi tra tests di mutazioni geniche in eucarioti e tests di aberrazioni cromosomiche "in vivo") ed un test di verifica del pre-screening di cancerogenesi, da scegliersi tra tests di mutagenesi (a livello genico e cromosomico), tests indicatori (riparazione, SCE, "crossing-over", conversione genica), tests di trasformazione. Se queste due prove di verifica sono negative allora s'interrompe questo tipo di sperimentazione; se il test di verifica della cancerogenesi è positivo, allora si ricorre alla cancerogenesi a lungo termine; se è positivo il test di verifica della mutagenesi, allora sono richiesti altri due saggi di mutagenesi. Nel caso del livello 2 è obbligatoria la cancerogenesi a lungo termine, oltre a prove di fertilità ed altri studi tossicocinetici. E' evidente che si tratta di un approccio di tipo gerarchico, che però allo stadio attuale è ancora molto confuso. Si tratterà di definire delle gerarchie di tests per lo stesso tipo di eventi genetici e delle particolari sequenze sulla base dei risultati dei vari tipi di tests.

Trattandosi di un compito molto delicato sarà opportuno che la Commissione italiana per la valutazione degli effetti mutageni, cancerogeni e teratogeni esamini attentamente il problema in modo da suggerire alla delegazione italiana gli orientamenti da seguire nelle prossime riunioni che si terranno in Lussemburgo.

PROPRIETA' TOSSICOLOGICHE E BUONE PRATICHE DI LABORATORIO

V. SILANO

Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO. - L'elaborazione dei metodi per la valutazione delle proprietà tossicologiche di cui all'Allegato V della Direttiva CEE 79/831, viene effettuata dal gruppo CEE di esperti nazionali designati dagli Stati membri che adegua a tal fine le linee guida predisposte da gruppi di esperti sotto il coordinamento dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE). La fase del lavoro finora conclusa riguarda i metodi relativi alle proprietà tossicologiche previste nell'Allegato VII della menzionata Direttiva e cioè, i metodi per la valutazione del la tossicità acuta e sub-acuta (orale, percutanea e inalatoria), dell'irritazione cutanea e oculare e della sensibilizzazione cutanea.

L'Allegato V conterrà nell'introduzione generale, fra l'altro, i principi delle Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) elaborati da un gruppo di esperti dell'OCSE e recentamente adottati dal Consiglio dell'OCSE.

Notevoli progressi sono stati realizzati a livello internazionale anche per quanto concerne l'armonizzazione dell'applicazione dei principi di GLP. Attualmente a li - vello OCSE sono in discussione le modalità per un approccio graduale all'applicazione delle GLP e i criteri per valutare i programmi nazionali di applicazione delle GLP. A livello nazionale sembra esservi un accordo sul fatto che l'applicazione delle GLP possa essere assicurata mediante un sistema di accreditazione di singoli Laboratori periodicamente rinnovabile sulla base di risultati di i - spezioni e di verifiche di alcuni studi svolti dai Laboratori accreditati. Restano ancora, tuttavia da approntare

gli strumenti normativi e le strutture operative per attuare quanto previsto dal programma di applicazione delle GLP.

1. PROPRIETA' TOSSICOLOGICHE

In accordo alle raccomandazioni del gruppo CEE di Coordinamento dei lavori per la elaborazione dell'Allegato V della Direttiva CEE 79/831, il gruppo CEE di Esperti nazionali incaricato di elaborare i metodi tossicologici, decise di iniziare i propri lavori dai metodi tossicologici previsti all'Allegato VII che, fatte salve le previste esenzioni, dovranno essere applicati a tutti i nuovi composti chimici industriali, indipendentemente dalle quantità commercializzate.

Questa prima parte di lavoro appena conclusa ha consentito di elaborare i metodi per l'accertamento delle caratteristiche di tossicità acuta e sub-acuta (28 giorni) per via orale, percutanea e inalatoria, dell'irritazione cutanea o oculare e della sensibilizzazione cutanea. Poichè questi metodi saranno pubblicati con tutti i dettagli sulla Gazzetta Ufficiale della CEE anche in lingua italiana, non è il caso di descriverli qui in grande dettaglio. Inoltre, poichè questi metodi sono stati elaborati adattando, con minori modifiche, alle finalità della Direttiva CEE 79/831 i metodi dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE), quanti fossero interessati possono prendere visione di tali metodi originali che sono stati recentemente adottati dal Consiglio della OCSE e pubblicati in lingua inglese e francese.

Ritengo, quindi, sufficiente in questa sede dare informazioni sintetiche sui metodi tossicologici menzionati, precisando che mi riferirò ai requisiti minimi sperimentali che dovranno caratterizzare le sperimentazioni tossicologiche effettuate secondo i metodi in questione.

La Tabella I confronta diversi parametri (specie, numero e sesso, livelli di dose, etc.) dei nuovi metodi tossicologici in questione.

Come risulta dalla Tabella I, la specie di elezione per le investigazioni di tossicità acuta e sub-acuta è il

ratto, per quelle di irritazione il coniglio, e per i saggi di sensibilizzazione è la cavia.

Il numero minimo di animali per gruppo sperimentale è in genere 5 per sesso, con l'eccezione dei gruppi dei saggi di irritazione (3 animali per gruppo) e di sensibilizzazione (20 animali dei due sessi per il gruppo trattato e 10 animali per il gruppo di controllo).

I livelli di dose sono 3 per la tossicità acuta e sub-acuta e 1 per gli altri saggi. La scelta dei livelli di dose della sostanza da saggiare è uno degli aspetti di maggiore importanza nella programmazione degli esperimenti di tossicità. Nel caso della tossicità acuta, essi devono essere scelti in modo da ottenere una curva dose-risposta e, dove possibile, permettere una valutazione della dose letale 50 (DL₅₀). Nel caso della tossicità sub-acuta il livello di dose più elevato dovrebbe causare effetti tossici, ma non letali e il più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Inoltre, per questi saggi di tossicità, è previsto un gruppo di controllo eventualmente trattato con il veicolo (se usato) e la duplicazione del gruppo di animali trattati con il livello di dose più elevato qualora si desideri valutare la reversibilità degli effetti. Nel caso dei saggi di irritazione è previsto un solo livello di dose; per i liquidi esso è 0.5 ml per l'irritazione cutanea e 0.1 ml per quello oculare e per i solidi o semi-solidi 0.5 g per l'irritazione cutanea e 0.1 g per quella oculare. Nel caso della sensibilità cutanea la dose raccomandata è quella massima tollerata.

Il trattamento degli animali con la sostanza da saggiare viene effettuato una sola volta nei saggi di tossicità acuta e in quelli di irritazione, mentre nel caso dei saggi di tossicità sub-acuta esso viene ripetuto per 28 giorni. La durata dei trattamenti inalatori è di 4 ore se acuti e di 6 ore/giorno se sub-acuti, mentre di quelli per cutanei è di 24 ore se acuti e di 6 ore/giorno se sub-acuti. La durata del trattamento, nel saggio di irritazione cutanea, è di 4 ore e in quello di irritazione oculare, variabile a secondo del potere irritante della sostanza in esame. Nel caso della sensibilizzazione cutanea la procedura del trattamento è più complessa poiché essa si divide in due fasi quella dell'induzione (iniezione intradermica al giorno 0 e applicazione sulla cute per 48 ore al giorno 7) e del saggio vero e proprio che viene effettuato al giorno 21 mediante applicazione sulla cute per 24 ore.

Osservazioni periodiche degli animali trattati e di controllo sono previste in tutti i diversi saggi, mentre la durata massima del periodo di osservazione varia a secondo del saggio (Tabella I) e particolarmente con la necessità di accertare la reversibilità degli effetti tossici.

Osservazioni dello stato di salute generale degli animali sono previste specificamente nei saggi di tossicità acuta e sub-acuta. Tali osservazioni debbono riguardare in particolare gli eventuali cambiamenti della pelle e del pelo, delle membrane mucose e degli occhi, della funzione respiratoria, motoria, circolatoria, nervosa e del comportamento. Particolare attenzione meritano i sintomi di tremori, convulsioni, eccessiva salivazione, diarrea, letargo e coma.

L'esame necroptico degli animali è previsto nei saggi di tossicità acuta e sub-acuta, mentre l'esame istopatologico è espressamente richiesto solo nei saggi di tossicità sub-acuta. In particolare è previsto che l'esame istopatologico sia effettuato su tutti gli organi e tessuti di tutti gli animali di controllo e di quelli trattati con il livello di dose più elevato. Gli organi e i tessuti che mostrano alterazioni attribuibili al trattamento con la sostanza in esame devono essere esaminati istologicamente anche negli altri gruppi di animali trattati con livelli di dose inferiori. L'osservazione di particolari tipi di lesioni è, invece, necessaria nei saggi di irritazione cutanea e oculare e di sensibilità cutanea.

Esami ematologici e di biochimica clinica sono previsti nei saggi di tossicità sub-acuta; essi consistono nella determinazione dell'ematocrito, della concentrazione dell'emoglobina, della conta degli eritrociti e leucociti, del potenziale di coagulazione, della attività della SGPT e SGOT, dell'urina, della reatinina, dell'albumina e delle proteine seriche totali e della bilirubina totale.

Un saggio limite è previsto sia nei saggi di tossicità acuta che cronica. Ciò significa che se nessun effetto letale (tossicità acuta) o tossico (tossicità sub-acuta) attribuibile alla sostanza in esame viene osservato in un gruppo di animali trattato con una dose particolarmente elevata, si può ritenere non necessario di svolgere ulteriori indagini. Le dosi dei saggi limite sono riportate, ove del caso, in tabella I.

2. BUONA PRATICA DI LABORATORIO

La buona pratica di laboratorio (GLP) riguarda il processo di organizzazione e le condizioni nelle quali gli studi di laboratorio sono pianificati, svolti, controllati e descritti in un rapporto finale. E' chiaro che la elaborazione e emanazione di norme nazionali di GLP hanno importanti implicazioni internazionali, particolarmente dal punto di vista degli scambi commerciali di composti chimici. E', infatti, evidente che se ogni Paese può accettare con fiducia i dati chimico-fisici, tossicologici e ecotossicologici prodotti in altri Paesi, la duplicazione dei saggi può essere evitata con notevole risparmio di tempi e di risorse.

Lo sviluppo di un approccio armonico a livello internazionale all'elaborazione dei principi di GLP e alla loro applicazione è in via di sviluppo a livello dell'OCSE. In particolare i principi delle GLP sono stati già definiti e recentemente adottati dal Consiglio dell'OCSE e saranno pubblicati senza alcun cambiamento nell'introduzione dell'Allegato V della Direttiva CEE 79/831. E' impossibile in questa sede descrivere in dettaglio i principi di GLP, ma si può dire in sintesi che essi forniscono norme di comportamento nello svolgimento degli studi sperimentali sui composti chimici che sono di validità generale nel senso che non dipendono dal particolare saggio effettuato o dalla particolare sostanza saggiata. Alcuni elementi di maggiore dettaglio sul contenuto del documento sui principi di GLP possono essere dedotti dalla tabella II. Nel mentre il lavoro sui principi di GLP si può dire concluso, attualmente è in piena fase di svolgimento a livello OCSE quello relativo all'elaborazione di un accordo internazionale per l'applicazione di tali principi. Il gruppo di esperti dell'OCSE ha già trovato l'accordo su due documenti riguardanti rispettivamente "l'applicazione dei principi OCSE di GLP" e "le raccomandazioni per i programmi nazionali di ispezione a laboratori". Non essendo possibile entrare nel dettaglio di questi documenti, basterà qui menzionare che vi è un accordo sul fatto che il Laboratorio che intende svolgere un particolare saggio ha la responsabilità di conformarsi ai principi di GLP e che le Autorità nazionali hanno la responsabilità di controllare ciò e di prevedere sanzioni nel caso i principi di GLP non siano applicati. Allo scopo di accertare che i Laboratori applichino i principi di GLP sono previste ispezioni pe -

riodiche e verifiche di alcuni studi svolti dal Laboratorio.

Pertanto i dati tossicologici ottenuti secondo una delle metodologie precedentemente descritte, applicata secondo i menzionati principi di GLP, dovranno essere accettati in qualsiasi Paese della CEE e dell'OCSE.

Il riconoscimento di programmi nazionali concernenti le GLP può avvenire mediante un accordo internazionale bilaterale o multilaterale.

Restano ancora da definire in una ultima riunione del gruppo di esperti dell'OCSE, prevista a Parigi nell'ottobre 1981, l'approccio graduale all'applicazione dei principi di GLP (ai laboratori, ai tipi di saggio e ai tipi di sostanze), i criteri per valutare la conformità dei programmi nazionali relativi alle GLP e la verifica dei provvedimenti adottati.

A livello nazionale occorre definire gli strumenti legislativi e operativi per dare seguito agli impegni internazionali già assunti o in via di assunzione.

Una possibilità è che il Governo italiano ricorra ad un meccanismo di autorizzazione dei laboratori qualificati. Con tale meccanismo l'Autorità nazionale competente potrebbe certificare che un particolare laboratorio è competente a effettuare uno o più tipi di saggi su una o più classi di sostanze chimiche secondo i criteri previsti dalla legge. Tale autorizzazione dovrebbe essere concessa per un periodo di tempo limitato (circa 2 anni) e rinnovata sulla base dei risultati di periodiche ispezioni ai laboratori e verifiche degli studi.

Restano da emanare le norme per conferire all'Autorità (Ministero della Sanità e Istituto Superiore di Sanità) nazionale competente il mandato di svolgere i seguenti compiti:

- a) predisporre e preparare il personale necessario per effettuare le ispezioni;
- b) pianificare ispezioni regolari dei laboratori;
- c) rilasciare i certificati di accreditazione;
- d) richiedere ai laboratori non in regola i miglioramenti necessari o, nei casi estremi, cancellare l'accreditazione;
- e) mantenere un registro dei laboratori approvati, completo dei tests per cui l'accreditazione è stata rilasciata;

f) fornire informazioni alla CEE e ad altri Organismi internazionali.

Un altro aspetto che richiede attenzione a livello nazionale è quello concernente l'applicazione dei principi di GLP ai diversi tipi di sostanze chimiche inclusi i farmaci, gli antiparassitari, i cosmetici, gli additivi alimentari, i prodotti chimici industriali, etc. Al momento il principale sviluppo nell'applicazione delle GLP in Italia sta avvenendo nel contesto del recepimento della Dirrettiva CEE 79/831 che, come è ben noto, concerne soltanto i nuovi prodotti chimici industriali.

Tabella I

CONFRONTO DI ALCUNI PARAMETRI DEI METODI DI SAGGI TOSSICOLOGICI FINORA ELABORATI PER LA PUBBLICAZIONE NELL'ALLEGATO V DELLA DIRETTIVA CEE 79/831

(a. gas; b. aerosol; c. solo per lo studio della reversibilità degli effetti.)

PARAMETRO	TOSSICITA' ACUTA			IRRITAZIONE		TOSSICITA' SUB-ACUTA			SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA
	orale	percutanea	inalatoria	cutanea	oculare	orale	percutanea	inalatoria	
Specie	ratto	ratto	ratto	coniglio	conig.	ratto	ratto,cavia, coniglio	ratto	Guinea Pig Maximization test cavia
Numero e sesso per gruppo	5F 5M	5F 5M	5F 5M	3	3	5F 5M	5F 5M	5F 5M	20 trattati (F e M) 10 controlli
Livelli di dose	3	3	3	1	1	3-2	3-2	3+2	1
Test limite	5g/kg	2g/kg	20 mg/1a 5 mg/1b	-	-	1g/kg/ die	1g/kg/die	-	-
Trattamento	singolo	singolo (24 ore)	singolo (24 ore)	4 ore	-	28 gg.	28 giorni 6/ore/die	28 giorni 6/ore/die	-
Periodo massimo di osservazione	14 gior.	14 gg.	14 giorni	14 gg.	21 gg.	28 gg. . 14C	28 giorni . 14C	28 giorni - 14C	48 - 72 ore
Osservazioni cliniche	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Esame necroptico	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Istopatologia	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Lesioni speciali	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Ematologia e Biochimica	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Tabella 2

INDICE DEL DOCUMENTO OCSE SUI PRINCIPI DI BUONA PRATICA DI
LABORATORIO

Sezione I Introduzione

- 0. Prefazione
- 1. Scopo
- 2. Definizione dei termini
- 2.1. Buona pratica di Laboratorio
- 2.2. Termini concernenti l'organizzazione della struttura per lo svolgimento dello studio
- 2.3. Termini concernenti lo studio
- 2.4. Termini concernenti la sostanza in esame

Sezione II Buona Pratica di Laboratorio

- 1. Organizzazione della struttura per lo svolgimento del lo studio e personale
- 1.1. Responsabilità della direzione
- 1.2. Responsabilità del direttore dello studio
- 1.3. Responsabilità del personale
- 2. Programma per assicurare la qualità dello studio
- 2.1. Aspetti generali
- 2.2. Responsabilità del personale addetto all'unità per assicurare la qualità dello studio
- 3. Strutture
- 3.1. Aspetti generali
- 3.2. Strutture per i sistemi di saggio
- 3.3. Strutture per trattare le sostanze di saggio e di riferimento
- 3.4. Strutture di archivio
- 3.5. Eliminazione dei rifiuti
- 4. Apparecchi, materiale e reagenti
- 4.1. Apparecchi
- 4.2. Materiali
- 4.3. Reagenti
- 5. Sistemi di saggio
- 5.1. Fisici e chimici
- 5.2. Biologici
- 6. Sostanze da saggiare e di riferimento
- 6.1. Ricevimento, trattamento, campionamento e conserva - zione
- 6.2. Caratterizzazione

- 7. Procedure operative standard
 - 7.1. Aspetti generali
 - 7.2. Applicazioni
- 8. Svolgimento dello studio
 - 8.1. Pianificazione dello studio
 - 8.2. Contenuto del piano dello studio
- 9. Rapporto sui risultati dello studio
 - 9.1. Aspetti generali
 - 9.2. Contenuto del rapporto finale
- 10. Conservazione e mantenimento dei registri e dei materiali
 - 10.1. Conservazione e consultazione
 - 10.2. Mantenimento

APPENDICE - Referenze

SEZIONE IV: INVENTARIO EUROPEO DELLE SOSTANZE CHIMICHE (EINECS)

ELABORAZIONE E FINALITA' DELL'INVENTARIO EUROPEO DELLE SOSTANZE CHIMICHE

G. MOSSELMANS

Servizio Ambiente della CEE, Bruxelles

RIASSUNTO. - La relazione traccia un quadro sintetico dei diversi lavori, iniziati nel 1979, che hanno portato alla decisione della Commissione dell'11 maggio 1981, che definisce la realizzazione dell'inventario delle sostanze esistenti sul mercato comunitario il 18 settembre 1981.

In particolare vengono brevemente definiti:

- l'inventario di base ECOIN
- il Compendio delle sostanze conosciute
- il Manuale "Come dichiarare per l'inventario EINECS"
- nonché i diversi formulari adottati per la dichiarazione.

1. PERCHE' L'INVENTARIO

Vista l'impostazione di questa 4^a Sezione del Convegno, mi limiterò a tracciare una breve cronistoria dell'inventario europeo.

Nel 1976 la Commissione CEE, sulla base di una esigenza che andava maturando già da tempo, presenta al Consiglio una proposta di modifica della direttiva sulle sostanze pericolose, meglio conosciuta poi come 6^a Modifica; uno dei punti qualificanti di tale proposta era, ed è tuttora, la notifica delle sostanze chimiche nuove, l'obbligo cioè di prepararne una vera e propria carta di identità, con tutte le proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche, che ne consentano la valutazione di pericolo per l'uomo e per l'ambiente prima dell'immissione sul mercato.

Se però da un punto di vista generale questa esigenza era sentita e condivisa da tutti i rappresentanti degli Stati membri, appariva immediatamente una domanda più che legittima: come stabilire il limite di demarcazione fra so-

stanze vecchie e sostanze nuove. E' risultato cioè che, non solo a livello governativo, ma anche a livello industriale, non si aveva una chiara ed esatta cognizione di quali e quante sostanze chimiche venivano prodotte, importate o comunque commercializzate nel territorio della Comunità. Nasceva e questo punto, quindi, l'esigenza di redigere un inventario delle sostanze esistenti di cui, devo dire, proprio la delegazione italiana si è fatta sin dall'inizio promotrice.

2. SCELTA DELLE MODALITA' OPERATIVE

L'art. 13, paragrafo 1, della 6^a Modifica precisa quindi che la Commissione stabilisce, segnatamente in base alle informazioni fornite dagli Stati membri, un inventario delle sostanze esistenti sul mercato comunitario il 18.9.1981.

Parallelamente ai lavori del Consiglio, la Commissione iniziava lo studio, con l'aiuto degli esperti degli Stati membri, delle modalità operative con cui tale problema andava affrontato. Si poneva infatti la necessità di scegliere fra diverse soluzioni, se cioè tutte le sostanze dovevano essere dichiarate dal fabbricante e/o dall'importatore, con o senza l'ausilio di una "candidate list", così come era stato già fatto dall'EPA per l'inventario americano, o se una soluzione mista poteva apparire più ragionevolmente attuabile. Tale soluzione mista, successivamente preferita alle altre, dopo lunghe discussioni, sia per motivi di costo che di tempo, prevedeva l'approntamento di un inventario di base, stabilito sulla base dei dati disponibili nelle liste esistenti a livello nazionale e internazionale, da integrare poi con le dichiarazioni supplementari da parte dei produttori e/o importatori.

3. ELABORAZIONE DELL'INVENTARIO

Una volta accettato il principio di base, facilmente traducibile in forma matematica:

Inventario finale = Inventario di base + Dichiarazione supplementare

rimaneva al Gruppo di lavoro della Commissione il compito

di definire esattamente ciascun termine di questa equazione.

3.1 INVENTARIO DI BASE ECOIN

L'inventario di base (ECOIN = European Core Inventory), è stato elaborato dalla Commissione, tenuto conto del parere del Comitato per l'adeguamento al progresso tecnico, ed è stato redatto sulla base dei dati disponibili che lasciano ragionevolmente ed obiettivamente presupporre l'esistenza sul mercato comunitario delle sostanze che in esso figurano.

Esso comprende:

- un indice numerico delle sostanze così come individuate dal "CAS Registry Number";
- un indice alfabetico della nomenclatura delle stesse sostanze;
- un indice delle formule molecolari.

Tuttavia se il sistema può apparire semplice da questa schematica descrizione, molte difficoltà sono state incontrate in fase operativa, tanto che si è pensato di utilizzare a questo scopo l'esperienza acquisita negli Stati Uniti dall'EPA per la compilazione dell'Inventario americano.

3.2 COMPENDIO DELLE SOSTANZE CONOSCIUTE

E' così nata l'idea di preparare un documento che facilitasse al massimo il compito del dichiarante, per il caso di sostanze non comprese nell'Inventario di base, ma di natura chimica ben definita e con un numero di riferimento CAS; tale documento ha preso il nome di "Compendio di sostanze note", e contiene circa 15.000 sostanze presenti sul mercato americano ma per le quali non è ragionevolmente possibile prevederne la presenza sul mercato della Comunità.

Esso comprende:

- un indice alfabetico della nomenclatura delle sostanze così come individuate dal "CAS Registry Number" e dal Codice EINECS attribuito dall'ECDIN;
- un indice per numero CAS delle stesse sostanze;

- un indice delle formule molecolari.

3.3 FORMULARI PER LE DICHIARAZIONI SUPPLEMENTARI

Per effettuare le dichiarazioni complementari sono stati definiti tre tipi di formulari, e precisamente:

- il formulario A da utilizzare per dichiarare le sostanze presenti nel Compendio di sostanze note, mediante i due codici numerici, il CAS Registry Number e il codice EINECS.
- il formulario B da utilizzare per dichiarare le sostanze non inserite nel Compendio, ma per le quali si conosce sia il numero CAS che la denominazione chimica secondo una nomenclatura internazionale riconosciuta.
- il formulario C da utilizzare per dichiarare le sostanze non ben definite nella loro struttura molecolare o prive di numero di riferimento CAS.

3.4 DEFINIZIONE DI UN DOCUMENTO ESPLICATIVO

Al fine di rendere chiare a tutti le scelte operative adottate e per consentire all'operazione "Inventario" di procedere nel migliore dei modi si è infine reso necessario preparare un documento esplicativo ad uso dei dichiaranti.

Tale documento, il cui titolo esatto è "Come fare la dichiarazione per l'Inventario EINECS", considera i due aspetti della dichiarazione, sia cioè quello amministrativo spiegando le modalità da seguire per compilare correttamente i formulari di dichiarazione, sia quello tecnico, definendo i criteri scientifici adottati e fornendo numerosi esempi pratici su come dichiarare.

4. TEMPO UTILE PER LA DICHIARAZIONE

Dal momento in cui l'Inventario di base ECOIN sarà pubblicato ufficialmente sulla Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, decorreranno esattamente nove mesi utili per effettuare le dichiarazioni complementari.

Tale lasso di tempo potrebbe apparire eccessivo, ma c'è da tener presente ad esempio il tempo necessario alle Aziende per verificare esattamente la natura chimica delle sostanze utilizzate: la Commissione infatti non potrà accettare dichiarazioni supplementari di sostanze indicate con denominazioni commerciali o di fantasia; tale verifica potrebbe richiedere un certo tempo se, ad esempio, si rendesse necessario da parte dell'Azienda interessata operante all'interno della Comunità contattare un eventuale produttore di materie prime di un Paese terzo. Inoltre nei nove mesi deve essere compresa anche l'eventuale corrispondenza tra l'Azienda e il Punto di contatto nazionale, e tra il Punto di contatto nazionale e la Commissione, in caso di dichiarazione errata da correggere o da riformulare.

5. PUNTO DI CONTATTO NAZIONALE

In base a quanto previsto dall'art. 13 della 6^a Modifica, gli Stati membri stabiliscono un Punto di contatto nazionale per l'Inventario EINECS con il compito di raccogliere e trasmettere alla Commissione le dichiarazioni presentate dal fabbricante e/o importatore. Senza dilungarmi sui compiti specifici di tale struttura, esaminati e discussi in un'apposita relazione, vorrei concludere sottolineando l'estrema importanza e delicatezza dei compiti assegnati ai diversi Punti di contatto nazionali, il cui ruolo sarà fondamentale nell'attuazione dell'EINECS, in quanto unici legami riconosciuti fra dichiarante e Servizi della Commissione.