

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Workshop**  
**Linee guida dell'OCSE**  
**per la valutazione tossicologica:**  
**presentazione ed aggiornamenti**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 25-26 ottobre 2001

Atti a cura di  
Annarita Meneguz (a), Emanuela Testai (b) e Anna Maria Lopomo (b)

*(a) Laboratorio di Farmacologia*  
*(b) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**  
**02/41**

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. Linee guida dell'OCSE per la valutazione tossicologica: presentazione ed aggiornamenti. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 25-26 ottobre 2001.**

Atti a cura di Annarita Meneguz, Emanuela Testai e Anna Maria Lopomo  
2002, iv, 70 p. Rapporti ISTISAN 02/41 (in italiano e inglese)

L'immissione sul mercato delle sostanze chimiche di nuova produzione deve essere preceduta dalla presentazione di un dossier tossicologico per autorizzazione, classificazione ed etichettatura da parte della Autorità competente. Le Test Guidelines (TG) dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) descrivono i metodi standard da utilizzare nella conduzione di test a scopo regolatorio. La loro applicazione unitamente ai principi della buona pratica di laboratorio garantisce la produzione di dati armonizzati e di qualità, su cui si basa il mutuo riconoscimento dei dati tra gli Stati Membri. Il processo di revisione delle TG ha portato recentemente alla adozione delle nuove TG 420, 423 e 425 in sostituzione della TG 401 per i test di tossicità acuta orale. Questo volume raccoglie alcuni degli interventi presentati al Workshop allo scopo di illustrare sia l'attività dell'OCSE a livello internazionale e nazionale che gli aspetti scientifici e applicativi delle nuove TG.

*Parole chiave:* Valutazioni tossicologiche, Saggi, Linee guida, OCSE, Tossicità acuta, Tossicologia regolatoria

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. OECD Test Guidelines for toxicological evaluation: presentation and updates. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 25-26 October 2001.**

Proceedings edited by Annarita Meneguz, Emanuela Testai and Anna Maria Lopomo  
2002, iv, 70 p. Rapporti ISTISAN 02/41 (in Italian and English)

A toxicological dossier must be presented to the competent authority before marketing a new chemical, in order to start the authorisation, classification and labelling process. Regulatory tests have to be carried out by following the standard methods described in the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guidelines (TGs). Their application in good laboratory practice certified centres guarantees the production of harmonised quality data, which is the basis for the mutual acceptance of data within OECD Member States. The TGs periodical revision recently resulted in the adoption of new TGs (n. 420, 423, 425) for the oral acute toxicity testing, replacing the old TG 401, which is now in its phase out period. This volume collects some of the presentations illustrating the international and Italian OECD activity as well as the new TGs.

*Key words:* Chemical testing, Guidelines, OECD, Acute toxicity, Regulatory toxicology

Per informazioni su questo documento scrivere a: [lopomo@iss.it](mailto:lopomo@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it/pubblicazioni](http://www.iss.it/pubblicazioni).

# INDICE

<b>Premessa</b> .....	iii
<b>Valutazione tossicologica di sostanze chimiche e aggiornamento delle linee guida dell'OCSE: i test di tossicità acuta per via orale</b> <i>Annarita Meneguz, Emanuela Testai</i> .....	1
<b>Guidance on the application of three alternative test methods for acute oral toxicity to OECD Test Guideline 401</b> <i>Herman B.W.M. Koëter</i> .....	6
<b>Hints on OECD Test Guidelines programme and the Italian participation</b> <i>Alessandro di Domenico</i> .....	8
<b>Revisione delle linee guida OCSE alla luce della Direttiva europea 86/609</b> <i>Annalaura Stammati</i> .....	14
<b>Revised fixed dose procedure: OECD Test Guideline 420</b> <i>Peter Ridgway</i> .....	27
<b>Oral acute toxic class method: OECD Test Guideline 423</b> <i>Eva Schlede</i> .....	32
<b>An overview of Up-and-Down Procedure</b> <i>Deborah McCall</i> .....	37
<b>Attività dell'unità di monitoraggio della BPL</b> <i>Giuseppe Battaglino</i> .....	41
<b>Programma di visite congiunte dell'OCSE per la BPL e adozione delle linee guida</b> <i>Sergio Caroli</i> .....	46
<b>Linee guida dell'OCSE nel sistema di armonizzazione della classificazione delle sostanze chimiche</b> <i>Paola Di Prospero Fanghella, Roberto Binetti</i> .....	52
<b>Procedure di aggiornamento delle linee guida dell'OCSE nei centri di saggio</b> <i>Maria Mercede Brunetti</i> .....	63



## PREMESSA

In considerazione della frequenza con la quale i test di tossicità acuta orale vengono condotti a scopo regolatorio, risulta evidente l'impatto che possano avere i recenti cambiamenti nelle Test Guidelines (per uniformità in questo testo sempre indicate come TG) dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico, nella dizione inglese OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) che ne descrivono la conduzione. È perciò sembrata essenziale la diffusione dell'informazione sia presso gli utilizzatori delle TG (Centri di Saggio certificati BPL – Buona Pratica di Laboratorio – presso industrie e altre istituzioni pubbliche e private, Centri di ricerche a contratto) che presso i valutatori (esperti nelle commissioni nazionali per la registrazione di farmaci, pesticidi, sostanze chimiche) e gli ispettori ed esperti dell'Unità di Monitoraggio della BPL presso il Ministero della Salute.

Per questo motivo è stato organizzato il Workshop 'Linee guida dell'OCSE per la valutazione tossicologica: presentazione ed aggiornamenti' svoltosi il 25 e 26 ottobre 2001 presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che ha visto la partecipazione di un folto numero di operatori interessati, provenienti dalle varie realtà lavorative a cui le organizzatrici intendevano originariamente rivolgersi. I soggetti che si riteneva dovessero essere aggiornati sulla attività dell'OCSE riguardante le valutazioni tossicologiche per la valutazione del rischio, comprendono:

- le imprese che devono sottoporre i dati per la richiesta di registrazione dei singoli prodotti;
- le Autorità o le agenzie regolatorie, che hanno il compito di approvare o meno la registrazione di un prodotto previa analisi del dossier presentato e predisposizione di un rapporto di valutazione da parte di esperti specifici;
- i valutatori dei dati presentati a supporto delle domande.

Con l'organizzazione del Workshop si è tentato di porre le basi per la creazione di un sistema, che attualmente non è disponibile, che permetta una tempestiva e corretta diffusione dell'informazione affrontando le implicazioni e i coinvolgimenti differenziati connessi alla problematica dell'aggiornamento.

Uno degli aspetti più importanti è quello di individuare le modalità ed i tempi per il "recepimento" degli aggiornamenti delle linee guida nella normativa nazionale. Il termine "recepimento" non è forse il più corretto, non essendo le linee guida OCSE equiparabili a Direttive Europee, ma il problema è simile. Per fare solo un esempio fra i tanti possibili: alla data di eliminazione della TG 401, sarà ancora possibile prendere in considerazione test condotti con questa TG in data precedente al gennaio 2002? Seguendo il principio generale di progressiva riduzione nel numero degli animali utilizzati, questo dovrebbe essere possibile; si deve però osservare che al momento non sembra esservi un approccio comune a livello europeo. Qualunque sia la decisione, deve essere in qualche modo formalizzata e valere almeno su tutto il territorio nazionale e conseguentemente in tutti i contesti di valutazione del rischio: il processo di armonizzazione sarà solo in questo modo completo. Lo strumento per gestire questo "recepimento" potrebbe essere, almeno in una prima fase, quello delle Circolari ministeriali, che forse hanno una tempistica più adattabile alle esigenze di un processo che richiede rapide modifiche.

Dalla vivace discussione seguita alle presentazioni è chiaramente emersa inoltre la necessità di aumentare gli scambi di informazioni tra le varie componenti del sistema coinvolto nella sicurezza chimica e di promuovere la formazione degli operatori, strumento indispensabile per

rendere sempre più efficiente, adeguato ed aggiornato il processo di valutazione. Infatti la complessità raggiunta attualmente dal dossier di registrazione, implica che per il successivo esame, non si possa prescindere dall'acquisizione e dall'aggiornamento della normativa specifica riguardante l'insieme delle norme e linee guida che regolano la conduzione, la presentazione, l'esecuzione e la valutazione degli studi, che compongono il dossier, da parte di un sempre più ampio bacino di esperti.

Visto il successo della manifestazione e raccolto l'invito espresso dai partecipanti a che l'ISS assuma il ruolo di promotore e coordinatore di iniziative volte proprio alla diffusione dell'informazione e alla formazione in questo specifico settore, è in progetto la trasformazione di questa prima positiva esperienza in un appuntamento periodico a cadenza biennale. Nel frattempo, si è pensato di far cosa gradita pubblicando il presente volume che raccoglie le presentazioni di alcuni degli oratori. È stato mantenuto l'ordine, secondo il quale gli interventi si sono succeduti, che aveva lo scopo di presentare sia aspetti scientifici che applicativi in merito alle nuove TG; in particolare sono illustrate: l'attività dell'OCSE a livello internazionale (Herman B.W.M. Koëter, responsabile del Programma per la Salute e la Sicurezza Ambientale dell'OCSE a Parigi); l'esperienza di coordinamento nazionale (Alessandro di Domenico); la situazione aggiornata delle TG in revisione o in discussione per l'introduzione di metodi alternativi (Annalaura Stammati); le tre nuove TG attraverso l'intervento dei responsabili dei gruppi che ne hanno curato la stesura (Peter Ridgway, Eva Schlede, Deborah McCall); i legami con il sistema della BPL (Giuseppe Battaglini e Sergio Caroli); l'armonizzazione del sistema di classificazione della sostanze chimiche (Paola Di Prospero Fanghella e Roberto Binetti); il punto di vista del mondo industriale e dei Centri di ricerca a contratto (Maria Mercede Brunetti).

Il successo dell'iniziativa, prima nel suo genere negli Stati Membri, è stato recentemente ribadito in un documento OCSE sulle modalità attuate nei vari Stati Membri per 'familiarizzare' con le tre TG alternative alla vecchia TG 401. Nel documento, il segretariato OCSE, dopo aver ampiamente riportato gli scopi ed il tipo di organizzazione dato al Workshop italiano, descrive l'iniziativa americana partita sulla falsariga della nostra, tenutasi nel febbraio 2002 presso i *National Institutes of Health*, e auspica che altri Paesi seguano l'esempio dell'Italia organizzando incontri simili.

# VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DI SOSTANZE CHIMICHE E AGGIORNAMENTO DELLE LINEE GUIDA DELL'OCSE: I TEST DI TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE

Annarita Meneguz (a), Emanuela Testai (b)

(a) Laboratorio di Farmacologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'immissione sul mercato di tutte le sostanze chimiche di nuova produzione (pesticidi, farmaci, solventi, additivi alimentari, prodotti industriali in genere) deve essere preceduta da un processo di autorizzazione, classificazione ed etichettatura da parte dell'Autorità competente, a seguito della presentazione di un dossier tossicologico. Il dossier di registrazione, dal quale deriva la valutazione del rischio, ha raggiunto un notevole grado di complessità, comprendendo tutti gli studi sulle proprietà chimico-fisiche della sostanza in esame, i suoi effetti sulla salute umana e ambientale, nonché prove di efficacia rispetto all'impiego proposto. Ne consegue una notevole mole di lavoro relativa alla conduzione e alla presentazione degli studi da parte del notificante e alla valutazione del dossier da parte degli esperti dell'Autorità competente. Tutto il processo è regolato da normative specifiche, la cui acquisizione preventiva e il successivo aggiornamento da parte dei vari attori coinvolti rappresentano un fattore imprescindibile.

In relazione alla 'sicurezza chimica' (*Chemical Safety*), grande importanza riveste l'attività dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico, OECD *Organisation for Economic Co-operation and Development* nella dizione inglese), un'organizzazione intergovernativa che riunisce i rappresentanti di 30 Paesi industrializzati di Nord America, Europa e area del Pacifico. Infatti, nell'ambito del suo Programma per la salute e la sicurezza ambientale (*Environmental Health and Safety Programme*), l'OCSE pubblica una serie di documenti tra cui le Test Guidelines (TG) o Linee guida, in cui vengono descritti metodi utilizzati per l'identificazione di *hazard* associato all'esposizione a sostanze chimiche e i *Guidance Document*, in cui vengono raccolti una serie di dettagli tecnico-scientifici utili per la conduzione dei singoli test. Questi metodi sono considerati uno standard di riferimento nell'ambito del *chemical testing* e coprono l'intero spettro dei test richiesti dalle Autorità regolatorie nei dossier tossicologici ed ecotossicologici per la commercializzazione dei prodotti chimici. L'osservanza delle TG nella conduzione di test a scopo regolatorio, unitamente all'applicazione dei principi della Buona Pratica di Laboratorio (regolati in Italia dal DL.vo 120/1992 e successive modifiche), garantisce la produzione di dati armonizzati e di qualità. In questo modo è stato possibile sancire il principio del Mutuo Riconoscimento dei Dati (*Mutual Acceptance of Data*, MAD) tra tutti gli Stati Membri, che ha evitato la duplicazione dei test utilizzati a scopo regolatorio, non solo inutile dal punto di vista scientifico e dispendiosa in termini economici, ma anche in disaccordo con i principi etici legati al benessere animale (*Animal Welfare*), che spingono fortemente verso una riduzione del numero di animali da esperimento utilizzati. Il sistema del MAD ha reso più facili gli scambi commerciali tra gli Stati Membri, assicurando al tempo stesso la salvaguardia della salute umana ed ambientale.

L'OCSE ha iniziato la pubblicazione delle TG nel 1981. Originariamente erano 51; al momento attuale sono presenti più di 90 TG di cui alcune totalmente nuove, altre in forma revisionata rispetto all'originale, reperibili sul sito web dell'OCSE (<http://www.oecd.org>)

seguendo step successivi come: *Environment, Chemical Safety, Chemicals - Testing*. Alle TG in vigore vanno aggiunte quelle che sono attualmente in discussione e non ancora adottate, oltre a numerosi *Guidance Document*. Dal 1990, la struttura portante per lo sviluppo di nuove TG o per il loro aggiornamento, è costituita dal Test Guidelines Programme (TGP) dell'OCSE. Il compito del TGP è cruciale per il continuo adeguamento delle TG al progresso scientifico e tecnologico compiuto dalla sperimentazione tossicologica, delle necessità etiche dell'*Animal Welfare*, nonché di eventuali problematiche sanitarie e/o ambientali emergenti e considerate prioritarie. In questo settore un esempio è offerto dalla recente costituzione di una *task force (Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment – EDTA)*, per affrontare il problema del potenziale pericolo per la salute umana e ambientale che alcuni composti chimici esercitano sul sistema endocrino, e per approntare conseguentemente una strategia di screening e di testing armonizzata ed efficace.

Un ruolo centrale nel TGP è svolto dai Coordinatori Nazionali in rappresentanza degli Stati Membri (inclusa la Comunità Europea), che possono fare proposte per nuove TG o per aggiornamenti di TG già in vigore, pongono le priorità per la programmazione del lavoro e revisionano, con l'aiuto di esperti nazionali, i documenti prodotti dai vari Stati Membri. L'iter per l'adozione di una nuova TG richiede il raggiungimento di un accordo unanime tra gli Stati Membri rappresentati dai Coordinatori Nazionali, essendo l'OCSE una organizzazione di consenso, ed è per questo piuttosto lungo. In Italia, l'attività di coordinamento nazionale è svolta presso l'Istituto Superiore di Sanità, da Alessandro di Domenico (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia) coadiuvato dalla Segreteria Tecnica (Anna Maria Lopomo) e da esperti sia dell'Istituto, che di altre istituzioni pubbliche e private.

I risultati dei test di tossicità acuta sono richiesti per qualsiasi tipo di dossier di registrazione e rappresentano generalmente il primo stadio nel processo di valutazione delle proprietà tossicologiche di una sostanza chimica. I dati ottenuti da questo tipo di test sono utilizzati per la classificazione di pericolo e la relativa etichettatura; aiutano nell'identificazione dei livelli di trattamento negli studi di tossicità ripetuta; danno informazioni sugli organi bersaglio; danno le prime indicazioni di modalità di azione tossica e di possibile diagnosi e trattamento della intossicazione; permettono infine di comparare i livelli di tossicità e la relazione dose-risposta tra membri della stessa classe di sostanze chimiche. Il classico test di  $DL_{50}$  descritto da Trevan negli anni '20, che comporta il calcolo matematico del valore in grado di provocare la morte nel 50% degli animali trattati, è stato criticato per molti anni e non è più in uso. Il valore numerico della  $DL_{50}$  è, infatti, altamente dipendente da molteplici fattori endogeni ed esogeni, che spiegano anche le notevoli variazioni dei dati ottenuti in laboratori diversi, anche in studi di validazione. Il dato numerico di  $DL_{50}$ , seppur calcolato con procedure omogenee e corrette su un elevato numero di animali, non può essere considerato come una costante biologica, e permette quindi solo una stima approssimativa dell'intervallo di dosi tossiche per la specie in cui il test è stato condotto. La TG per il test tossicologico relativo alla tossicità acuta fu originariamente adottata nel maggio 1981 ed identificata come TG 401. Negli anni successivi, quel test di determinazione della  $DL_{50}$  fu oggetto di alcune critiche sostanziali, riguardanti principalmente il numero eccessivo di animali utilizzati. Tali commenti portarono l'OCSE alla decisione di organizzare un *Ad hoc Meeting of Experts on Acute Toxicity*. Gli esperti riunitisi nel 1986, ribadendo di lavorare seguendo tre principi basilari, ancora oggi validi (l'applicazione di 'buona scienza'; la preoccupazione per il benessere animale; la considerazione di necessità regolatorie), trovarono un accordo su alcune modifiche da apportare alla conduzione del test di tossicità acuta per via orale descritto nella TG 401 originale, tra cui:

- la conduzione del test su un solo sesso, con conferma sull'altro sesso ad un solo livello di dose;



- la conduzione del limit test ridotta da 5000 mg/kg a 2000 mg/kg, considerata una dose più realistica;
- la soppressione di quegli animali che durante il test mostrassero segni di gravi sofferenze.

La TG 401 nella sua versione aggiornata fu adottata ufficialmente nel 1987. Contestualmente furono distribuiti agli Stati Membri, per essere attentamente valutati, i documenti riguardanti tre nuovi approcci che avrebbero consentito la riduzione nel numero di animali utilizzati e/o la loro sofferenza. Tali documenti avrebbero costituito la base di partenza per le future TG per la conduzione del test di tossicità acuta orale, la TG 420 (*Fixed Dose Procedure*), la TG 423 (*Acute Toxic Class Method*) e la TG 425 (*Up-and-Down Procedure*). Grazie all'iniziativa intrapresa da Regno Unito e Germania per sviluppare ulteriormente e validare la *Fixed Dose Procedure* e la *Acute Toxic Class Method*, rispettivamente, i due metodi furono adottati come TG OCSE nel 1992 (TG 420) e nel 1996 (TG 423). Il terzo metodo (*Up-and-Down Procedure*) proposto e sviluppato dagli Stati Uniti fu approvato nel 1998 come TG 425. Dopo aver considerato tutte le possibilità offerte dalla coesistenza di quattro diverse TG per il test di tossicità acuta per via orale, i vari esperti riuniti a Roma nel 1998 raggiunsero un accordo sul fatto che le tre alternative alla TG 401 soddisfacessero le richieste regolatorie dei Paesi Membri fornendo sufficienti informazioni scientifiche per la salvaguardia della salute umana, nel rispetto dei principi del benessere animale. Pertanto la TG 401 poteva essere eliminata, fornendo un periodo di tempo adeguato (*phase out*) per permettere ai vari Stati Membri l'adeguamento alle nuove TG.

Da allora è stato intrapreso all'interno del TGP un intenso lavoro di revisione e affinamento delle tre TG alternative, da attuare prima della eliminazione definitiva della TG 401, nel quale sono state impegnate Annarita Meneguz, membro del gruppo di lavoro di Esperti *ad hoc*, e la Emanuela Testai come Esperto Nazionale. Tale processo di revisione delle tre TG alternative ha portato ad una ulteriore riduzione dell'uso di animali e ad un miglioramento dell'accuratezza dei metodi proposti. Le versioni aggiornate delle TG 420, 423 e 425 sono state adottate ufficialmente il 17 dicembre 2001 e a partire da quella data sostituiscono la TG 401, che in *phase out* per un anno, verrà ufficialmente eliminata il 20 dicembre 2002. Ne consegue che studi condotti a partire da quella data, utilizzando la TG non più valida, potranno non essere accettati dai valutatori dei dossier tossicologici. Contemporaneamente è stato preparato un *Guidance Document* in grado di fornire dettagli per l'applicazione e l'interpretazione dei vari metodi, che mette in evidenza le caratteristiche, i vantaggi e i limiti di ciascuno di essi.

I tre metodi infatti sono basati su principi e approcci sperimentali diversi, anche se tutti prevedono, in assenza di dati o indizi specifici che impongano una decisione diversa, che la sperimentazione venga effettuata su un solo sesso, generalmente quello femminile. Tale decisione di tipo conservativo scaturisce dai risultati di uno studio che mostra come, nel caso si osservino differenze di sesso nella suscettibilità alla tossicità acuta, le femmine siano generalmente più sensibili.

In sintesi i tre metodi possono essere così descritti:

- *TG 420 (Fixed Dose Procedure)*

Si basa sulla somministrazione a 5 animali di una dose iniziale da selezionare tra 5, 50, 500 o 2000 mg/kg ('dosi fisse'), che si sia dimostrata in grado di produrre in uno studio pilota chiari segni di tossicità. Se nessuna evidente tossicità si manifesta, si procede alla somministrazione della dose fissa superiore e così via, fino all'identificazione della dose tossica. La caratteristica distintiva di questo metodo è che l'*endpoint* rilevante non è rappresentato dalla letalità, ma da quelli che vengono indicati come 'chiari segni di tossicità'. La loro interpretazione è stata considerata un limite alla riproducibilità dei dati,

dovuta alla soggettività del giudizio dello sperimentatore, che è stata però smentita dai test di validazione condotti dagli inglesi. I risultati di questo test, permettono una stima del range di concentrazioni all'interno del quale si colloca la  $DL_{50}$ , compatibile con i criteri di classificazione delle sostanze in vigore nella UE.

– *TG 423 (Acute Toxic Class Method)*

Descrive una procedura a step, secondo la quale una delle dosi previste (5, 50, 500 e 2000 mg/kg) viene somministrata a tre animali per volta. L'assenza (o la presenza) di mortalità indotta dalla sostanza test negli animali trattati, determina il passaggio allo stadio successivo, utilizzando a seconda dei casi la dose maggiore o minore. L'intervallo di tempo che intercorre tra un gruppo di trattamento ed il successivo è determinato generalmente dalla comparsa e dalla severità degli effetti tossici osservati, anche se l'*endpoint* indicato dalla TG è comunque la letalità. Come nel caso della 420, il metodo permette la stima di un range per la  $DL_{50}$ , compatibile con il sistema di classificazione UE.

– *Up-and-Down Procedure (TG 425)*

Prevede la somministrazione ad un singolo animale di una dose, considerata come la stima teorica migliore della  $DL_{50}$  reale, calcolabile, per esempio, attraverso dati di letteratura su composti con struttura chimica simile. In dipendenza del risultato del trattamento (letalità, tossicità manifesta, assenza di effetto), viene calcolata (con un fattore 1,3 verso l'alto o verso il basso) la dose da somministrare successivamente ad un altro animale. Il processo continua fino a che non si identifica la dose per la quale si ottiene la risposta inversa alla precedente (sopravvivenza anziché mortalità o viceversa) e alla quale si trattano altri 4 animali. Il metodo risulta poco pratico in caso di tossicità ritardata; inoltre, quando non sia possibile identificare una dose di partenza che sia sufficientemente vicina alla  $DL_{50}$ , il numero di animali può essere particolarmente elevato. L'applicazione di modelli matematici e trattazioni statistiche sofisticate (condizioni facilitate dalla disponibilità di un software elaborato appositamente dall'EPA statunitense – *Environmental Protection Agency*), permettono la stima di un valore puntuale per la  $DL_{50}$ , e con solo un piccolo test addizionale anche la stima della pendenza della curva dose-risposta.

Le tre linee guida alternative offrono per la loro tipologia diverse modalità di approccio alla conduzione del test che permetterà una scelta più mirata in relazione al tipo di composto chimico in esame e che contribuirà a ridurre una serie di problematiche ricorrenti, emerse nell'analisi degli studi di tossicità acuta. Nell'ambito della revisione di un significativo numero di saggi di tossicità presentati nei dossier di registrazione di pesticidi, per esempio, sono emerse una serie di carenze che sono di seguito elencate:

- Il protocollo presentato non segue le indicazioni di TG accettate dall'Autorità regolatoria.
- Il prodotto utilizzato per la conduzione del test è molto diverso di quello di cui si chiede la registrazione.
- Il prodotto in esame viene diluito impropriamente (es. i liquidi dovrebbero essere saggiati come tali, la concentrazione di solidi o prodotti viscosi dovrebbe essere quella massima maneggiabile, per ogni deviazione si dovrebbero fornire spiegazioni).
- Il prodotto viene somministrato come volume costante anziché come concentrazione costante.

- Le informazioni che permettano di risalire alla dose in mg/kg somministrata non sono riportate.
- Gli animali non vengono messi a digiuno prima del trattamento (si può avere un effetto diluizione).
- Non viene rispettata la durata del periodo di quarantena.
- Gli animali sono già stati utilizzati in altro studio.
- Gli animali soffrono di malattie non dipendenti dal prodotto in esame.
- Mancanza di osservazione degli animali durante lo studio.
- Mancanza dei dati sul numero di animali, peso, sesso.

La revisione retrospettiva di questo tipo risulta spesso un ottimo strumento di lavoro per affrontare carenze più generali, spesso riconducibili ad una scarsa conoscenza delle linee guida e delle legislazioni vigenti sia da parte di chi prepara il dossier, che da parte di chi deve valutarlo.

Una delle spinte maggiori alla revisione delle TG sulla tossicità acuta è venuta dalla necessità di considerare i principi etici del 'benessere animale' e dalla politica dell'OCSE di progressiva introduzione di metodi, scientificamente validi ed affidabili, che siano alternativi ai test sugli animali. A questo proposito l'OCSE ha recentemente pubblicato un *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, con lo scopo di fornire i criteri utili per determinare le condizioni di sofferenza dell'animale che deve conseguentemente essere sacrificato per eutanasia. Nel preambolo del documento si dice chiaramente che, nell'ambito dell'applicazione del principio delle tre 'R' (*Replacement, Reduction and Refinement*), che è fortemente incoraggiato dall'OCSE, il *Guidance Document* va chiaramente verso il *refinement* dando indicazioni per una riduzione della sofferenza per gli animali e può essere applicato a qualsiasi sperimentazione tossicologica. La preparazione e l'adozione di *Guidance Document* come quello citato è solo uno degli obiettivi dell'OCSE nell'ambito dell'*Animal Welfare*; infatti cercando di raggiungere un consenso internazionale sulla necessità di andare in questa direzione, si prevede di rivedere, ove possibile, i test esistenti per tentare di diminuire il numero di animali utilizzati, di incentivare lo sviluppo e l'adozione di metodi alternativi ai test sugli animali, armonizzando i principi e i criteri internazionali per la validazione e l'accettazione di tali metodi.

# GUIDANCE ON THE APPLICATION OF THREE ALTERNATIVE TEST METHODS FOR ACUTE ORAL TOXICITY TO OECD TEST GUIDELINE 401

Herman B.W.M.Koëter  
*OECD Environment, Health and Safety Division, Paris, France*

At the initiative of the Istituto Superiore di Sanità (ISS) in Rome (Italy) an international workshop was organised to familiarise experts from the data submitting community (industry, contract laboratories and academia) and regulatory authorities with the details of Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) – Test Guidelines 420 (Fixed Dose Procedure), 423 (Acute Toxic Class Method) and 425 (Up-and-Down Procedure) – as alternatives to the conventional Test Guideline 401 for acute oral toxicity. As it is expected that in December 2001 the OECD Council will decide to delete Test Guideline 401, the introduction of the three alternative methods was considered timely. Although Test Guidelines 420, 423 and 425 were already adopted as alternatives to Guideline 401 in the 1990's, deletion of Guideline 401 was only considered after a substantial revision of all three alternatives (Table 1).

**Table 1. Overview of the Test Guidelines (TG) for acute toxicity**

<b>Test Guideline no.</b>	<b>Title</b>	<b>Adopted or draft</b>	<b>Animal welfare relevance</b>
<b>TG 401</b>	Acute Oral Toxicity	1981	Original guideline
	Acute Oral Toxicity	1987	Smaller number of animals; lowering of the limit dose level
	Acute Oral Toxicity	2001	Testing in one sex, considering the GHS, adding limit test, improving power
	Acute Oral Toxicity	2002	Deleted
<b>TG 402</b>	Acute Dermal Toxicity	1981	Original guideline
	Acute Dermal Toxicity	1987	Smaller number of animals; lowering of the limit dose level
<b>TG 403</b>	Acute Inhalation Toxicity	1981	Original guideline
<b>TG 420</b>	Fixed Dose Procedure (Acute Oral Toxicity)	1992	Alternative animal test to the conventional TG 401. Less suffering, smaller number of animals
	Fixed Dose Procedure (Acute Oral Toxicity)	2001	Further reduction of animals compared to the 1992 version
<b>TG 423</b>	Acute Toxic Class Method (Acute Oral Toxicity)	1996	Alternative animal test to the conventional TG 401. Much smaller number of animals (10% of TG 401)
	Acute Toxic Class Method (Acute Oral Toxicity)	2001	Further reduction of animals compared to the 1996 version
<b>TG 425</b>	Up-and-Down Procedure (Acute Oral Toxicity)	1998	Alternative animal test to the conventional TG 401. Smaller number of animals, provides a closer estimate of the LD <sub>50</sub> than 420, 423
	Up-and-Down Procedure (Acute Oral Toxicity)	2001	Further reduction of animals compared to the 1996 version, better accuracy
<b>GD 24</b>	Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing	2001	Provides background information and detailed guidance on the use of the three alternatives to TG 401

The revision was seen as crucial to enable the generation of point estimates with a sufficient level of confidence and to allow for the classification of chemicals according to the newly established Globally Harmonised Classification System (GHS).

GHS for classification and labelling of chemicals and chemical mixtures is a common and coherent approach to defining and classifying hazards, and communicating information on labels and safety data sheets; its target audiences include workers, consumers, transport workers, and emergency responders; it provides the underlying infrastructure for establishment of national, comprehensive chemical safety programs.

The principles of harmonization are that:

- protections will not be reduced;
- comprehensibility will be key;
- it is based on intrinsic properties (hazards) of chemicals and does not require additional testing;
- all systems will have to be changed.

The revision of the three alternatives started in October 1998 with an OECD Nominated Expert Meeting which was also held at the ISS in Rome. During the process of revision it became clear that an additional Guidance Document on Acute Toxicity testing was also needed to provide details and background information specific to each of the alternative methods. The Guidance Document would also provide information that would be helpful for the investigator to select the most appropriate method for his specific needs.

Technical agreement on the revision of the three alternative methods and the accompanying Guidance Document could only be reached in June 2001 after intense discussions and two additional Expert Meetings in Washington (1999) and Paris (2000), respectively. In order to allow sufficient time for the regulated and regulatory community to gain experience with the three alternative methods, Member countries decided that a one year “phasing-out” period was needed. Consequently, when in December 2001 Council will adopt the three alternative Guidelines and decide to delete Guideline 401, the actual “phasing-out” period will commence at the date of the Council Decision. As a result, the factual deletion of Guideline 401 will be in December 2002.

The Workshop provided an excellent opportunity for experts in the field of acute toxicity testing to communicate with the original developers of the three alternatives from Germany, the UK and USA, respectively, and to learn about the technical details of these revised tests. It further provided background information on the process of revision of the alternative methods as well as details of the discrepancies and technical difficulties that had to be overcome.

The Italian initiative to arrange for the Workshop was greatly appreciated by the OECD Secretariat, the invited speakers and the Workshop participants. It appeared to be a unique opportunity for experts in the field of acute toxicity to exchange in a very efficient way a wealth of information and to become familiar with the details of the revised alternative methods to Test Guideline 401. The Italian initiative, which was the first of its kind, was applauded in OECD and seen as an example for other Member countries to be followed. Currently the USA has indeed decided to arrange for a similar Workshop aimed at North American experts. This Workshop is scheduled for February 2002 in Washington. Also Germany has shown an interest in organising a similar Workshop.

# HINTS ON OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME AND THE ITALIAN PARTICIPATION

Alessandro di Domenico

*Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Setting the stage

In the framework of the Test Guidelines Programme (TGP), the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals (TGs) are a collection of the most relevant internationally-agreed methods to identify and characterize potential hazards of new and existing chemical substances and chemical preparations/mixtures. They cover tests for: physical-chemical properties; environmental effects; environmental fate (degradation and accumulation); human health effects.

TGs are used by government, industry, and independent laboratories. Since their adoption in 1981, they have become the recognized reference tool for the professionals dealing with chemical testing, in OECD countries as well as in non-Member countries. They are also the basic element of OECD's work on the Mutual Acceptance of Data (MAD), a Council action taken also in 1981. Due to this action, governments are required to accept test data developed for regulatory purposes in another country, if these data were developed in accordance with the TGs and Good Laboratory Practice (GLP) principles. Since 1997, the system has been open to non-OECD countries as well. The publication of OECD Test Guidelines and related documents is briefly outlined:

- Original publication in 1981: 51 Guidelines;
- 12 Addenda;
- more than 90 new/updated Guidelines;
- Detailed Review Documents;
- Guidance Documents, available as:
  - hard copy (loose-leaf)
  - CD-ROM
  - on-line (OECD bookshop)
- Draft Guidelines and Guidance Documents available on the Internet

TGs are primarily for use in regulatory safety testing and subsequent chemical and chemical product notification and registration. They may also be used for a variety of purposes including the selection and ranking of candidate chemicals during the development of new chemicals and products and, in general, in laboratory research. TGP output breakdown according to document type, status, and field of application are:

- I) ADOPTED GUIDELINES
  - Section 1 - Physical-Chemical Properties (21 TGs)
  - Section 2 - Effects on Biotic Systems (17 TGs)
  - Section 3 - Degradation and Accumulation (8 TGs)
  - Section 4 - Health Effects (43 TGs)
- II) ADOPTED GUIDANCE AND REVIEW DOCUMENTS (27 Documents)

### III) DRAFT GUIDELINES

Section 1 - Physical-Chemical Properties (3 TGs)

Section 2 - Effects on Biotic Systems (8 TGs)

Section 3 - Degradation and Accumulation (9 TGs)

Section 4 - Health Effects (*15 TGs*)

### IV) DRAFT GUIDANCE AND REVIEW DOCUMENTS (4 Documents)

The Guidelines are periodically updated along with progress in science. In addition, new ones are developed and agreed upon, based on needs identified by one or more of the following: OECD Member countries, the OECD Secretariat, international organizations, international scientific societies, non-governmental organizations (NGOs), the Business and Industry Advisory Committee (BIAC), and the Trade Union Advisory Committee (TUAC). OECD-wide networks of National Co-ordinators (NCs) and national experts allow input from scientists in government, academia, and industry.

Table 1 lists the subject areas covered by the OECD TGP.

In addition to the adopted and draft TGs and Guidance Documents (GDs), the TGP produces documents and reports providing the background information related to and explaining the TGP work.

Documents for official use, other than draft material, are available on a password-protected site whose access may be granted by a country's NC.

TGs are published in English and French, as approximately 1000 loose-leaf pages in binders; they are also available on CD-Rom. Both publications contain the 12 Addenda that have been published since the original publication in 1981.

There are several OECD expert groups and task forces currently active for the development of TGs and GDs, according to the following field (in italics) and subject (in brackets) breakdown:

– *environmental fate and effects*

[leaching studies; phototransformation of chemicals in water (3 Italian national experts in the group); terrestrial non-target plants toxicity testing; algae toxicity testing];

– *health effects*

[validation; percutaneous absorption testing and review panel; immunotoxicity testing; neurotoxicity testing; acute oral toxicity testing (1 Italian national expert in the group)];

– *endocrine disrupters*

[endocrine disrupters testing and assessment (EDTA) (2 Italian national experts in the task force); validation management group on screening and testing for mammalian effects of endocrine disrupters (VMG-mammalian) (1 Italian national expert in the group); validation management group on ecotoxicity test methods for endocrine disrupters (VMG-eco) (1 Italian national expert in the group); expert consultation on endocrine disrupters testing in fish; expert consultation on avian reproduction testing and endocrine disrupters testing in birds; expert consultation on endocrine disrupters testing in amphibian (1 Italian national expert in the group)].

**Table 1. List of OECD Test Guidelines Programme subject areas (the number of Italian national experts is shown in parenthesis)**

**PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES**

1. Physical-chemical properties, general (5 experts)
2. Flammability/explosivity (1 expert)
3. Polymers (1 expert)
4. Adsorption/desorption (2 experts)

**AQUATIC ECOTOXICOLOGY**

1. Algae (5 experts)
2. Daphnia and other zooplankton (5 experts)
3. Fish (8 experts)
4. Micro-organisms (4 experts)

**TERRESTRIAL ECOTOXICOLOGY**

1. Soil micro-organisms, particularly microflora (2 experts)
2. Soil arthropods (3 experts)
3. Earthworms (2 experts)
4. Honeybees (5 experts)
5. Plants (2 experts)
6. Birds (4 experts)

**ABIOTIC DEGRADATION**

1. Water (3 experts)
2. Soil (2 experts)
3. Atmosphere (2 experts)

**BIODEGRADATION**

1. Water (2 experts)
2. Soil (2 experts)

**ACCUMULATION**

1. Bioaccumulation in aquatic organisms (9 experts)

**HEALTH EFFECTS**

1. Systemic acute toxicity (5 experts)
2. Systemic short-term toxicity (5 experts)
3. Systemic long-term toxicity (5 experts)
4. Carcinogenicity (4 experts)
5. Skin and eye irritation/skin sensitisation (5 experts)
6. Genetic toxicity (6 experts)
7. Neurotoxicity (5 experts)
8. Phototoxicity (4 experts)
9. Reproductive and developmental effects (4 experts)
10. *In vitro* toxicity/alternatives (5 experts)
11. Immunotoxicity (2 experts)
12. Occupational exposure (5 experts)

**DATA ANALYSIS/STATISTICS (3 experts)**

**OTHERS (BASED ON BROAD ISSUES)**

1. Pesticides and biocides (3 experts)
2. Food additives (4 experts)
3. Biotechnology products and novel foods (6 experts)
4. Pharmaceuticals (2 experts)



## Developing new OECD Test Guidelines

New TGs are proposed through a Standard Project Submission Form (SPSF). The SPSF is available on the OECD Internet website. The information required by the SPSF is broadly summarized as follows:

- project title;
- submitted by;
- date of submission to the secretariat;
- details of country/stakeholder offering the lead;
- anticipated endproduct;
- proposed workplan and resource needs;
- underlying essential criteria;
- desirable criteria to be met;
- priority setting.

In the evaluation of a TG development proposal, much importance is given to two elements: the Essential Criteria and the Desirable Criteria to be met. When formulating a proposal, the aforesaid criteria, set and agreed upon by the NCs during their annual meetings, must be taken into consideration. These criteria, itemized hereafter, have been endorsed by the Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides, and Biotechnology (JM), and are a mandatory reference for setting the related TGP priorities:

– *Essential criteria*

1. Is there an existing or expected regulatory need/data requirement that will be covered by the proposed outcome of the project?
2. Does the work contribute to further the international harmonisation of hazard and risk assessment?
3. Does the proposed project address issues and/or endpoints which are of major human health or environmental concerns?
4. It is expected that the project will generate considerable support, or is the outcome relevant for just one or a few Member countries/stakeholders?

– *Desirable criteria*

1. If the expected outcome is a TG, would this guideline be intended for general use?
2. If the expected outcome would be a TG for specific rather than general use, would it be for...?
3. If the expected outcome of the project would be a TG, is there evidence that the proposed test is scientifically valid, reliable, and relevant?
4. Does the proposed project address endpoints/chemical properties not yet covered by existing OECD TGs?
5. If the expected outcome of the project submitted would be a TG, could any of the following be used as the basis for the proposed Guideline:...?
6. Are *animal welfare* concerns addressed and considered in the project?
7. Would the results of the proposed project contribute to savings in Member countries resources?
8. If the expected outcome of the proposed project is a GD or a Detailed Review Paper (DRP), will it be directly linked to the development of a particular TG or a series of TGs?
9. Is the project essential for the development or conduct of test(s) or is it aimed at providing additional guidance which would be helpful?

The phases to approve a new TG development proposal are a part of a complex process ending with the formal acceptance of the new TG by the Council, and its publication under the OECD logo. The NCs meetings (WNT) as well the JM activity are nodal steps in managing as well overseeing the development process of a TG. Such a process, that might last even several years, is exhibited in the scheme of Figure 1 and may be briefly explained as follows:

1. *Submission of the proposal by:* OECD Member countries, the OECD Secretariat, international organizations, international scientific societies, NGOs, BIAC, and/or TUAC.
2. *Completion of the SPSF:* form in OECD password-protected website; Essential Criteria and Desirable Criteria to be met.
3. *Priority Setting by NCs:* by written procedure; high, medium, or low ranking priorities; proposal for the annual workplan; endorsement by the JM.
4. *Start of the Project:* establishment of an *ad hoc* expert group; draft Guideline; circulation for expert review.
5. *Analysis of Comments:* national positions; revision of the proposal; justification for the changes; circulation for expert review.
6. *Arranging for Expert Meeting:* Secretariat involvement; workshop; *ad hoc* expert group meeting; nominated expert meeting.
7. *Adoption of new Guideline:* reaching scientific consensus; approval by NCs; endorsement by JM; Environmental Policy Committee (EPOC) approval for submission to OECD Council; Council adoption.

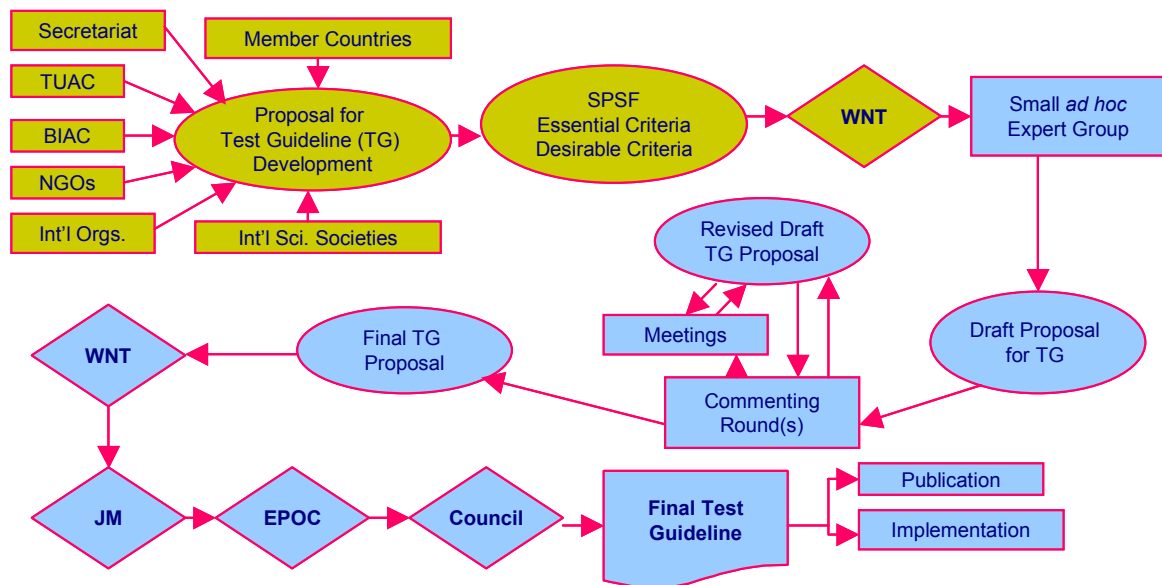


Figure 1. OECD Test Guideline development process (by courtesy of Herman B.W.M. Koëter, OECD)

Lastly, Italy has taken over the years an active role in developing/revising TGs. The OECD workshops organized since 1994 by the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute for Health, Rome) within the Test Guidelines Programme framework were:

- Consultation Meeting on “Subchronic and Chronic Toxicity Testing”  
Rome, 2-3 November 1995. (20 *Participants*)
- Working Group Meeting on “Avian Reproductive Testing”  
Rome, 25-26 September 1997. (26 *Participants*)
- Nominated Expert Meeting on “Mammalian Acute Toxicity Testing”  
Rome, 27-28 April 1998. (20 *Participants*)
- Meeting of the Working Group for the Development of a Test Guideline on  
“Phototransformation of Chemicals in Water”.  
Rome, 21-22 September 1998. (9 *Participants*).

## **Acknowledgement**

The author gratefully acknowledges the co-operation and assistance of Anna Maria Lopomo, who is part of the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute for Health) staff and has been full-time involved with the OECD work since 1994.

# REVISIONE DELLE LINEE GUIDA OCSE ALLA LUCE DELLA DIRETTIVA EUROPEA 86/609\*

Annalaura Stamatii

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

La Direttiva europea 86/609 (1) sulla protezione degli animali utilizzati nella sperimentazione e per altri fini scientifici recita all'art. 23:

La Commissione e gli Stati Membri devono incoraggiare le ricerca per lo sviluppo e la validazione di tecniche alternative che possano fornire lo stesso livello di informazione di quello ottenuto in esperimenti che facciano uso degli animali, ma che coinvolgano meno animali o che contemplino procedure meno dolorose, e devono attivare ogni altro passo che considerino appropriato ad incoraggiare la ricerca in questo settore. La Commissione e gli Stati Membri devono monitorare le tendenze nei metodi sperimentali.

Tale Direttiva è stata recepita in Italia con il Decreto Legislativo n. 116 del 1992 (2), che, all'art. 4, dice, tra l'altro, che qualora non fosse possibile evitare l'uso degli animali, "tra più esperimenti debbono preferirsi: 1) quelli che richiedono il minor numero di animali, 2) quelli che implicano l'impiego di animali con il più basso sviluppo neurologico; 3) quelli che causano meno dolore, sofferenza, angoscia o danni durevoli; 4) quelli che offrono maggiori probabilità di risultati soddisfacenti". Inoltre, il decreto parla di metodi alternativi per la "ottimizzazione dell'impiego degli animali" (art. 16) e stabilisce che nella programmazione dei piani di ricerca (art. 17) "saranno preferiti, ove possibile, quelli che si avvalgono di metodi alternativi".

Sia nella Direttiva che nel DL.vo 116/1992 si parla dunque di "metodi alternativi" e, nonostante che la loro definizione sia nota già da molti anni, vale ancora la pena di ricordarla, perché non è ancora stata completamente assimilata e metabolizzata. Essa risale ad un testo del 1959 (3), ed è comunemente conosciuta come la definizione delle 3R, dall'inglese *replace*, *reduce*, *refine*, per cui è alternativa alla sperimentazione animale una qualsiasi tecnica che:

- rimpiazzati totalmente l'uso degli animali con tecniche *in vitro*;
- riduca il numero degli animali necessari ad eseguire un determinato saggio, pur ottenendo lo stesso livello di informazione;
- raffini un metodo per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante l'esecuzione di un saggio.

Oltre alla definizione, che viene rifiutata dai gruppi animalisti più radicali, anche l'aggettivo "alternativo" è contestato da alcuni ambienti scientifici più conservatori, che preferiscono il termine complementare.

Sulla definizione delle 3R si basa, tra l'altro, anche la costituzione di Piattaforme Nazionali (PN) per i metodi alternativi, che richiedono, per essere considerate tali, la presenza di quattro figure rappresentanti di: governo, Università e/o Centri di ricerca, industria e organizzazioni

---

\* Questo contributo aggiorna quanto pubblicato nel *Rapporto ISTISAN 01/23* (p. 70-85) rispetto all'introduzione di metodi *in vitro* nelle linee guida OCSE.

animaliste. Le PN hanno compiti di grande importanza, quali a) comunicazione, informazione e promozione; b) compiti scientifici; c) etica, formazione e addestramento; d) validazione e ricadute legislative, con lo scopo fondamentale di accelerare l'implementazione dei metodi disponibili ed opportunamente validati. Alcuni Paesi hanno già delle PN ufficialmente costituite, altri, tra cui l'Italia, sono molto vicini alla costituzione definitiva, altri ancora hanno mostrato interesse verso questa iniziativa, ma devono ancora trovare i consensi tra le quattro parti senza la cui presenza non si può parlare di PN. Entro la fine del 2002, inoltre, si arriverà all'istituzione di Ecopa (*European Consensus of Platforms on Alternatives*) che consiste nel coordinamento delle PN dei vari Paesi e che avrà lo scopo di ottimizzare il lavoro delle diverse PN, di minimizzare i conflitti che dovessero sorgere circa la strategia da seguire per il raggiungimento delle 3R (*refinement, reduction, replacement*) e, comunque, di facilitare il collegamento tra le PN e tra queste e la Commissione europea.

A partire dalla Direttiva europea ci si è preoccupati di sviluppare nuovi metodi *in vitro*, che potessero essere utilizzati per l'attività regolatoria, o di modificare quelli *in vivo* esistenti per ridurre il numero degli animali e/o la loro sofferenza. I risultati ottenuti sono evidenti per quanto riguarda questi ultimi due obiettivi, più facili da raggiungere che non quello mirato alla sostituzione completa degli animali. C'è anche da tenere presente che la validazione di nuovi metodi, che serve ad accertare l'affidabilità (riproducibilità del metodo nel tempo e in laboratori diversi) e la rilevanza (significatività ed utilità di una procedura per il fine prefissato) di un metodo per uno scopo specifico (4), è un processo piuttosto lungo: è stato calcolato che intercorrono in media dieci anni per il compimento delle diverse fasi. Esso prevede, infatti: a) lo sviluppo del saggio nel laboratorio d'origine; b) la prevalidazione mirata alla verifica della trasferibilità del metodo e all'ottimizzazione del suo protocollo; c) lo studio di validazione vero e proprio; d) la valutazione indipendente dello studio e delle proposte; e) l'avvio delle procedure per l'accettazione a livello regolatorio. Prima di arrivare allo schema descritto sono state necessarie una serie di riunioni di esperti (5-9), che hanno elaborato il concetto di validazione e quindi modificato negli anni la procedura, anche sulla base dell'esperienza acquisita. Un processo lungo, dunque e che fino ad ora, come già detto ha prodotto maggiori risultati sul versante *reduction/refinement*, ma lo scenario offerto dalle nuove tecnologie suscita un certo ottimismo per quanto riguarda lo sviluppo di nuovi metodi che colmino il versante *replacement*. Infatti, già da alcuni anni la tossicologia tende ad orientarsi verso l'individuazione di parametri molecolari precoci ed affidabili e lo studio della loro alterazione in seguito all'esposizione a sostanze tossiche (10). Si sta inoltre aprendo una nuova era, quella genomica, che consente l'acquisizione di tecniche sempre più sofisticate e in grado di dare risposte sempre più precise e mirate (11). È anche per questo che è stato recentemente proposto di chiamare i metodi che non si basano sull'uso di animali, non più alternativi, ma "avanzati".

In questo capitolo si mostrerà con alcuni esempi come alcune linee guida (*Test Guideline*, TG) dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico), in particolare quelle inerenti al monitoraggio delle sostanze chimiche (*Section 4 - Health Effects*) sono state via via aggiornate per adeguarle alla Direttiva 86/609, modificando i protocolli proposti alla luce delle 3R. Inoltre, come vedremo, stanno per essere introdotti per la prima volta, almeno per quanto riguarda i saggi di tossicità, nuovi metodi *in vitro*. Questo è un fatto rilevante per l'implementazione dei metodi alternativi, perché l'OCSE è l'organismo che raccoglie non solo i Paesi membri europei, ma anche Stati Uniti, Giappone, ecc. e, dunque, è la sede dove avviene il confronto tra un numero più ampio di Paesi, anche se è necessario ricordare che le linee guida preparate da questo organismo sono delle raccomandazioni, mentre l'Unione Europea ha una politica di regolamentazione per i Paesi membri, che registra l'accoglimento, anche a livello nazionale, di nuove metodiche e interviene con direttive adeguate, che prima o poi devono essere necessariamente recepite.

Tralasciando le linee guida OCSE relative alla tossicità orale acuta, che sono discusse in dettaglio da altri autori e che rappresentano un esempio importante di riduzione del numero degli animali necessari ad eseguire il saggio, in questo capitolo verranno mostrati gli aggiornamenti successivi dei protocolli inerenti alla irritazione/corrosione dermale ed oculare, alla fototossicità, alla sensibilizzazione cutanea, e all'assorbimento e l'introduzione di nuovi protocolli che si basano sull'uso di metodi *in vitro* o *ex vivo*.

## TG 404: Irritazione dermale acuta/corrosione

Questo saggio viene fatto per osservare l'eventuale produzione di alterazioni reversibili di tipo infiammatorio (irritazione) o di danni irreversibili (corrosione) in seguito all'applicazione di sostanze sulla pelle e permette di classificarle in base alla loro pericolosità e di etichettarle, soprattutto ai fini della sicurezza durante la manipolazione ed il trasporto.

Il protocollo, contenuto nella TG 404 adottata nel 1981, prevede l'uso di diverse specie di mammifero, anche se il coniglio albino è quella preferita, perché considerata più sensibile dell'uomo, in particolare agli irritanti deboli e moderati. La sostanza in esame viene applicata sulla pelle rasata del coniglio e alla fine del periodo di esposizione (circa 4 ore) si va ad osservare il danno corrosivo o l'irritazione sviluppatasi (in questo caso viene assegnato un punteggio al grado di eritema/edema osservato), riferendosi come controllo a una parte di pelle non trattata dello stesso animale.

Questa procedura è stata molto criticata dal punto di vista etico, ma anche scientifico, perché il saggio è qualitativo e troppo legato all'interpretazione dell'operatore. Una prima revisione della linea guida risale al 1992, con la novità di poter utilizzare, almeno in una prima fase, un solo animale per un tempo più breve nel caso di sostanze presunte corrosive sulla base della struttura chimica o del pH. Questa nuova versione prevede anche la possibilità di valutare i risultati di test *in vitro* prima di procedere alla prova sugli animali.

La nuova proposta di aggiornamento (Draft 2000), ancora in circolazione tra gli esperti OCSE, differisce dalla versione precedente perché la linea guida è accompagnata da un "documento guida", che suggerisce una strategia a tappe volta a scoraggiare l'uso del saggio *in vivo* e che aveva dimostrato in uno studio di validazione di poter discriminare con sufficiente affidabilità le sostanze corrosive da quelle non corrosive (12). Nella Tabella 1 sono riportati i cambiamenti apportati alla linea guida durante i successivi aggiornamenti.

**Tabella 1. Irritazione dermale acuta/corrosione: aggiornamenti della TG 404**

Anno	Originale
1981	3 conigli albini
	<b>Aggiornamento</b>
1992	possibilità di usare 1 animale nella prima fase della sperimentazione <i>in vivo</i> inclusione di dati ottenuti da saggi <i>in vitro</i>
2000	raccomandazione di utilizzare strategia a tappe considerando tutte le informazioni disponibili

### Saggi alternativi

Si è in un primo momento cercato di sviluppare test *in vitro* in grado di identificare le sostanze corrosive, compito che si è rivelato relativamente più semplice rispetto ad altri tipi di danno, perché questa lesione non è legata a meccanismi di azione particolarmente sofisticati.

Sono oggi disponibili quattro saggi alternativi considerati scientificamente validi dal Comitato Scientifico di ECVAM (*European Centre for Validation of Alternative Methods*), che consentono la riduzione (TER) o la sostituzione (EPISKIN<sup>TM</sup>, EpiDerm e Corrositex) degli animali.

Questi protocolli sono stati introdotti durante il *27th Meeting for Adaptation to Technical Progress* (4 febbraio 2000) nell'annesso V *Testing Methods* della Direttiva 67/548/EEC, B40 (Tabella 2).

**Tabella 2. Saggi alternativi per la corrosione**

TEST ALTERNATIVI PER LA CORROSIONE	
Riduzione	Sostituzione
Resistenza Elettrica Transepiteliale (TER) (PELLE DI RATTO)	EPISKIN <sup>TM</sup> EpiDerm Corrositex (PELLE UMANA RICOSTITUITA)

### Misura della resistenza elettrica transcutanea

Questo saggio è stato messo a punto già da qualche anno (13) e utilizzato in diversi laboratori per evidenziare il potenziale corrosivo delle sostanze in esame.

Il protocollo sperimentale descritto nel *Rapporto ISTISAN 01/23* prevede l'uso della pelle della zona dorsale del ratto della quale viene misurata la resistenza elettrica transcutanea (*Transcutaneous Electrical Resistance*, TER) dopo trattamento con la sostanza in esame.

Il principio del test si basa sul fatto che se la pelle viene danneggiata in seguito all'esposizione alla sostanza, la resistenza elettrica diminuisce ed è stato stabilito di considerare corrosive le sostanze con valore di TER <5 Komega/disco di tessuto cutaneo. Si tratta quindi di un saggio *ex vivo* che si basa sull'uso di animali, ma che consente di ridurre il numero perché con uno solo è possibile effettuare un certo numero di prove.

TER è stato riconosciuto scientificamente validato dal Comitato Scientifico di ECVAM (ESAC) perché ha fornito risultati riproducibili nei tre laboratori che hanno partecipato allo studio di validazione con 60 sostanze appartenenti a diversi gruppi chimici.

Inoltre, in seguito ad una ottimizzazione del protocollo rispetto ad un precedente studio di prevalidazione, ha dimostrato di essere sufficientemente specifico e in grado di poter discriminare tra sostanze corrosive e non (14).

Questo protocollo è in circolazione tra gli esperti OCSE e sarà probabilmente presto introdotto in una nuova linea guida (*Draft proposal for a new guideline 430*, 27 marzo 2002).

### Modelli di pelle umana ricostituita

Episkin-SM<sup>TM</sup> è un kit commerciale, costituito da una matrice di collagene umano tipo I e III che rappresenta il derma, coperta da un film di collagene umano tipo IV su cui è stratificata epidermide differenziata derivata da cheratinociti umani. Questi ultimi vengono esposti alla sostanza in esame e la vitalità del tessuto è valutata misurando l'attività mitocondriale con un test come MTT, comunemente usato nei saggi di citotossicità. Questo modello di pelle umana ricostituita è stato considerato valido da ESAC (15) non solo per gli stessi motivi del precedente, ma anche perché ha individuato correttamente sostanze note, classificate *in vivo* in categorie di rischio in base alla loro capacità di provocare corrosione entro tempi stabiliti.

EpiDerm e Corrositex sono simili al precedente e dichiarati scientificamente validati da ESAC (16-17) ma, quest'ultimo può essere utilizzato solo per identificare basi organiche e acidi inorganici e loro derivati. I modelli di pelle umana ricostruita sono stati inclusi nella proposta di una nuova TG, la 431 del marzo 2002.

Per quanto riguarda invece l'aspetto dell'irritazione della pelle, la situazione è meno avanzata di quella precedente rispetto alla possibilità di usare metodi alternativi. Infatti, sono attualmente disponibili ed usati nella ricerca diversi modelli *in vitro* recentemente valutati durante un Workshop di ECVAM (18), ma solo per 3 kit commerciali (EpiDerm, EPISKIN, PREDISKIN<sup>TM</sup>) il protocollo è stato sufficientemente standardizzato per consentire uno studio di prevalidazione attualmente in corso. Gli altri modelli ancora in fase di sviluppo sono linee immortalizzate e colture primarie di cheratinociti umani, espianati e colture d'organo e modelli di pelle umana ricostituita. In questi ultimi, che meglio degli altri mimano la situazione *in vivo* anche per la presenza dello strato corneo, i cheratinociti differenziati crescono all'interfaccia aria-liquido su substrati di natura diversa. Secondo l'opinione degli esperti tutti questi modelli devono essere ulteriormente migliorati, ma è comunque necessario svilupparne di nuovi sulla base di una consolidata conoscenza dei meccanismi dei processi infiammatori della pelle.

## TG 405: Irritazione oculare acuta/corrosione

Come per l'irritazione cutanea, anche la TG 405 è stata più volte aggiornata rispetto a quella adottata nel 1981 e le novità rispetto alla versione originale, volte a ridurre l'uso degli animali, sono riportate nella Tabella 3.

**Tabella 3. Irritazione oculare acuta/corrosione: aggiornamenti della TG 405**

Anno	Originale
1981	3 conigli albini
	<b>Aggiornamento</b>
1987	proprietà fisico-chimiche inclusione di dati ottenuti da saggi <i>in vitro</i>
2000	raccomandazione di utilizzare strategia a tappe considerando tutte le informazioni disponibili

Un certo numero di studi di validazione di saggi *in vitro* per l'irritazione oculare sono stati condotti a livello nazionale e internazionale, ma per ora senza successo, per le ragioni discusse durante un workshop di ECVAM (19).

È attualmente in corso uno studio di fattibilità con cinque saggi *in vitro* (BCOP, EpiOcular, ICE, HET/CAM, NRU e RBC), che ha lo scopo di confrontare i risultati ottenuti con nuove sostanze/prodotti con quelli ottenuti con sostanze di riferimento.

## TG 406: Sensibilizzazione della pelle

La sensibilizzazione della pelle è una reazione cutanea mediata dal sistema immunitario. Per identificare le sostanze che possono provocare questo tipo di reazione bisogna ricorrere ai protocolli previsti dalla TG 406, adottata nel 1981 ed aggiornata nel 1992 (Tabella 4).



**Tabella 4. Sensibilizzazione della pelle**

Anno	Originale
1981	Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) Buehler Occluded Patch Test (BOPT)
	<b>Aggiornamento</b>
1992	Mouse Ear Swelling Test (MEST) Local Lymphonode Assay (LLNA)

La linea guida originale propone due test che utilizzano entrambi la cavia: *Guinea Pig Maximisation Test* (GPMT) che usa l'adiuvante per potenziare l'effetto (20) e il test di Buehler che non usa l'adiuvante (21). Nel primo caso agli animali (almeno 10 cavie) viene iniettata la sostanza in esame e l'adiuvante (Freunds Complete Adjuvant) per via intradermica. Dopo un periodo di riposo (fase di induzione) durante il quale si può sviluppare la risposta immunitaria, le cavie vengono nuovamente esposte alla sostanza per via topica. Nel secondo caso il procedimento è lo stesso, ma il test è meno sensibile del precedente perché non usa l'adiuvante. In tutti e due i casi l'effetto viene misurato dando un punteggio al grado di eritema e rigonfiamento sviluppatosi in seguito all'applicazione topica.

### Metodi alternativi all'uso della cavia

Poiché il sistema immunitario del topo è stato studiato in maniera più approfondita di quello della cavia, sono stati recentemente sviluppati due modelli animali che misurano l'aumento di spessore dell'orecchio (*Mouse Ear Swelling Test*, MEST) e l'aumento dell'attività proliferativa dei linfonodi (*Local Lymph Node Assay*, LLNA) del topo dopo trattamento con la sostanza in esame.

Questi due test hanno dimostrato di saper identificare in maniera affidabile sensibilizzanti non solo forti, ma anche moderati, inoltre riducono la sofferenza degli animali trattati (*refinement*) perché la sostanza non viene iniettata, non viene usato l'adiuvante e richiedono tempi più brevi del test classico (22-23).

Nella linea guida del 1992 si suggerisce di utilizzarli come primo approccio, per ridurre il numero e la sofferenza degli animali, e di ricorrere al test con la cavia solo in caso di risposta negativa.

### Local Lymph Node Assay (LLNA)

Dopo una serie di studi di validazione con esiti positivi (24, 22, 25-27), questo saggio è stato dichiarato scientificamente validato da ESAC (28) e la bozza di una nuova linea guida (TG 429 del novembre 2000) sta circolando tra gli esperti OCSE per commenti. Il metodo non è stato invece ancora introdotto nella Direttiva europea.

Come accennato sopra, questo saggio può essere considerato alternativo, perché consente di ridurre il numero e la sofferenza degli animali utilizzati. LLNA, il cui protocollo (29) è riportato nella Figura 1, richiede infatti un numero di animali inferiore ed un tempo di esecuzione più breve, perché può essere completato in una settimana, rispetto alle 3-4 settimane richieste dal saggio convenzionale.

Inoltre, consente una riduzione della sofferenza degli animali rispetto al saggio sulla cavia, perché considera come biomarcatore del danno l'attivazione dei linfonodi, cioè un indicatore precoce della manifestazione patologica.

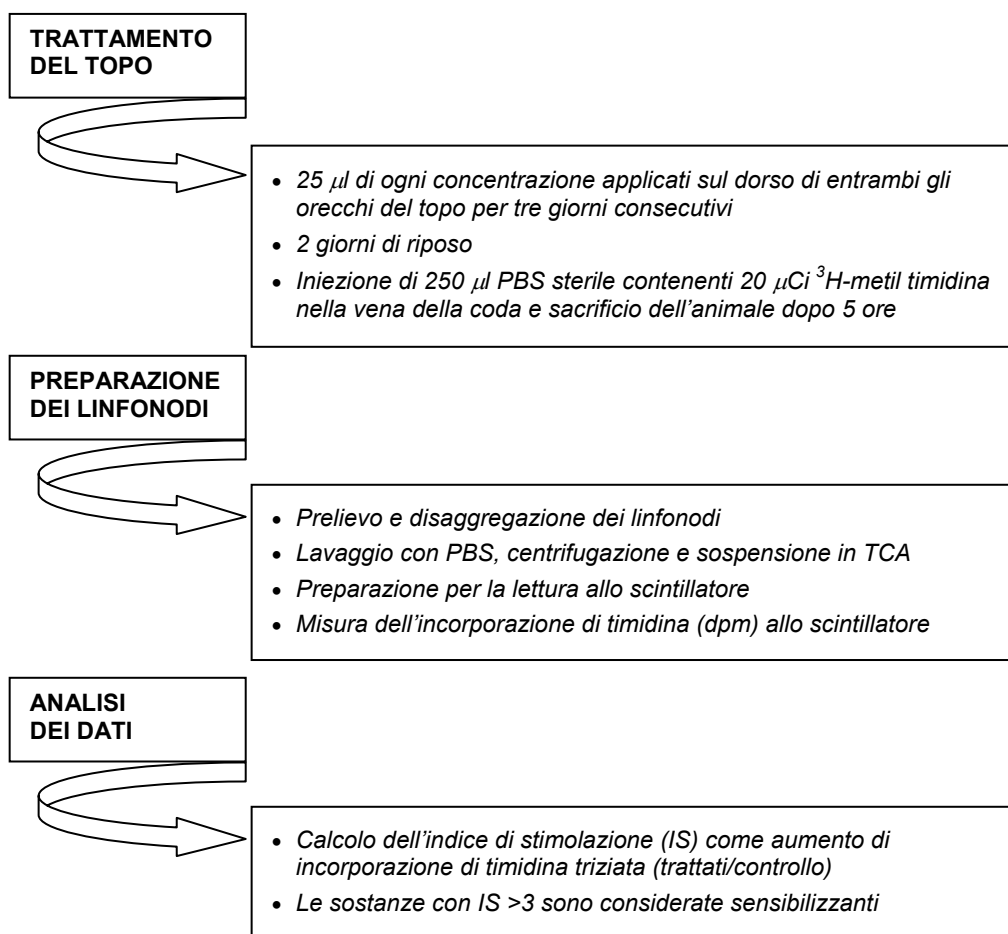


Figura 1. Disegno sperimentale del saggio LLNA

Questa fase di induzione è considerata più affidabile per l'identificazione del rischio che non la valutazione soggettiva della risposta secondaria. Un'ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che l'interpretazione dei risultati non è più qualitativa, ma si basa su una misura quantitativa del danno, mediante la determinazione dell'incorporazione di timidina triziata nei linfociti dei linfonodi dell'orecchio del topo (30).

Attualmente non ci sono saggi *in vitro* sufficientemente sviluppati da poter essere sottoposti a studi di validazione, tuttavia la ricerca è molto avanzata e si basa prevalentemente sulla misura del rilascio di interleuchine in cellule di natura diversa.

## Fototossicità

Un discorso particolare è quello della fototossicità, reazione acuta che può essere causata da un singolo trattamento con una sostanza contemporaneamente all'esposizione alle radiazioni visibili o UV: se l'esposizione alla sostanza avviene per via topica si parla di fotoirritazione. La fotoallergenicità, meno frequente della prima, è generalmente legata ad una risposta

immunitaria e può richiedere un certo tempo prima di manifestarsi dal momento dell'esposizione. Essendo questi due fastidiosi effetti collaterali che possono manifestarsi anche in seguito al trattamento con sostanze di uso corrente come i cosmetici, alcune linee guida internazionali riportano delle raccomandazioni per la conduzione di studi di fototossicità, tuttavia l'OCSE non ha ancora accettato una linea guida per studi di fotoirritazione *in vivo*, ma ha raccomandato l'uso di saggi *in vitro*, prima di ricorrere ai test con gli animali (31).

Gli studi *in vivo* per individuare il potenziale fototossico di sostanze chimiche utilizzano principalmente topi, conigli, ratti e cavie, ma i dati disponibili in letteratura sono difficilmente controllabili perché, in mancanza di un protocollo standardizzato, sono state utilizzate diverse fonti di luce e UV, diversi tempi e siti di esposizione e diverse dosi.

## **Saggi alternativi**

I metodi *in vitro* sviluppati in questo settore comprendono saggi per lo screening di sostanze fototossiche, che usano principalmente cellule in coltura, e modelli basati sui meccanismi molecolari e cellulari della fototossicità (32). Di questi solo uno, il saggio di assunzione di rosso neutro con cellule Balb/c 3T3, è stato considerato scientificamente valido da ESAC (33) e la proposta di una nuova linea guida sta circolando tra gli esperti OCSE per commenti.

### **Saggio di assunzione del rosso neutro con cellule Balb/c3T3**

Il saggio 3T3 NRU PI prevede l'uso di fibroblasti di topo (Balb/c 3T3, clone 31), sui quali, dopo trattamento con la sostanza in esame e dopo opportuno irraggiamento, viene effettuato il test di assunzione del rosso neutro.

Questo è un test di vitalità che si basa sull'assorbimento del colorante vitale all'interno dei lisosomi delle cellule ancora integre. Il saggio di assunzione del rosso neutro è stato pubblicato per la prima volta nel 1985 (34) come possibile alternativa *in vitro* al test di Draize sul coniglio ed utilizzato, sia pure dopo lievi aggiustamenti, per evidenziare il potere irritante di sostanze di varia natura. Successivamente il protocollo è stato modificato per adattarlo al test di fototossicità, introducendo una fase di incubazione con la sostanza in esame prima dell'irraggiamento ed utilizzando una soluzione di sali di Earles come mezzo di incubazione delle cellule durante il periodo di irraggiamento. Il protocollo sperimentale è stato descritto nel *Rapporto ISTISAN 01/23*.

Durante la fase di prevalidazione e lo studio di validazione vero e proprio che è stato condotto da nove laboratori con risultati riproducibili, il test ha dimostrato di essere predittivo e di saper discriminare tra sostanze fotoirritanti e non. 3T3 NRU PI è dunque un saggio di sostituzione (*replace*) che sarà certamente molto utile per un primo screening delle sostanze di cui si debba accertare un possibile effetto fotoirritante.

## **Saggi per l'assorbimento cutaneo**

Per assorbimento cutaneo si intende il processo mediante il quale una sostanza è trasportata dallo strato corneo attraverso l'epidermide ed il derma, fino a raggiungere il sistema circolatorio e quindi i diversi tessuti dell'organismo (35). I dati di assorbimento cutaneo sono generalmente richiesti per accertare il possibile rischio di sostanze che possono venire a contatto con la pelle sia volontariamente (cosmetici o farmaci) che accidentalmente (pesticidi, ecc.). Al momento le richieste legislative dei diversi Paesi sono molto diversificate e vanno da un protocollo molto esigente della EPA (*Environmental Protection Agency*) (basato sull'uso di un modello *in vivo*

che utilizza il ratto), specifico per i pesticidi, a richieste generiche di dati di tossicocinetica. Sempre a proposito dei pesticidi, la Direttiva europea 91/414 richiede, in Allegato 1, i dati di assorbimento cutaneo per l'inclusione dei principi attivi presenti nei pesticidi. Per il resto esistono generici documenti di discussione prodotti dall'EPA (36) e dalla *Food and Drug Administration* (FDA) (37-38), una linea guida prodotta da un gruppo della *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA) focalizzata sui prodotti cosmetici (39) e due bozze di linee guida OCSE per studi di assorbimento cutaneo *in vivo* (TG 427) ed *in vitro* (TG 428).

Esistono metodi più o meno accurati per la stima dell'assorbimento cutaneo *in vivo* (40-41) che utilizzano preferenzialmente il ratto. I limiti di questi studi sono legati soprattutto al fatto che la pelle degli animali, anche quella del ratto, è più permeabile di quella umana e quindi, nel caso di una estrapolazione dei risultati all'uomo, è necessario tener conto di questa maggiore sensibilità del modello animale. Esistono anche difficoltà di tipo pratico legate al fatto che è necessario proteggere il sito di applicazione della sostanza in esame per evitare che l'animale possa in qualche modo asportarne una parte.

## Saggi alternativi

I saggi *in vitro* attualmente disponibili, ma non ancora validati, per misurare l'assorbimento cutaneo (42-45) si basano fondamentalmente sulla misura della diffusione del composto in esame dalla superficie del campione di pelle in un recipiente di raccolta. In sostanza la cella di penetrazione è divisa da un campione di pelle in una "camera superiore" e una "inferiore" contenente un liquido "recettore" la cui composizione non deve alterare l'integrità della pelle e le sue caratteristiche di permeabilità (Figura 2).

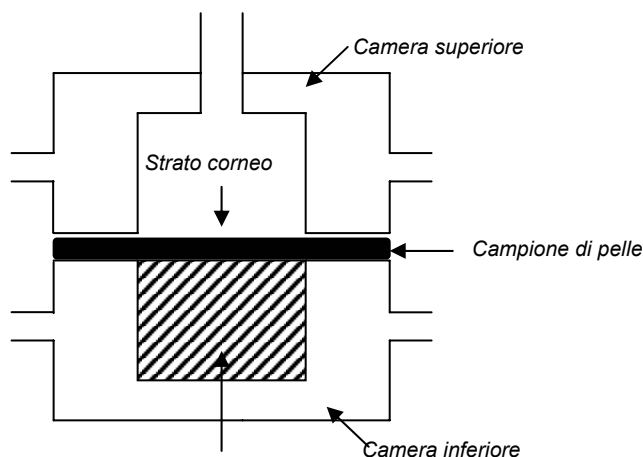


Figura 2. Schema della cella per lo studio dell'assorbimento cutaneo

I campioni di pelle sono normalmente preparati sotto forma di dischi di grandezza adeguata alla cella e possono essere costituiti da: 1) pelle intera, 2) derma separato dalla parte superiore del derma stesso e dall'epidermide con un dermatomo, 3) membrane epidermiche preparate trattando la pelle intera con mezzi enzimatici o chimici o con il calore.

In ogni caso, il campione viene collocato nella cella con lo strato corneo rivolto verso la camera superiore e, prima di applicare la sostanza in esame, ogni campione di pelle deve essere

controllato per la sua integrità con metodi diversi (penetrazione di una molecola marcata, misura della resistenza elettrica o della perdita di acqua attraverso l'epidermide).

I dettagli di questo sistema *in vitro* per l'assorbimento cutaneo sono riportati nella linea guida sviluppata dal COLIPA (39) che sostanzialmente riprende i principi contenuti nella proposta dell'OCSE.

## Conclusioni

È evidente la volontà dell'OCSE di revisionare periodicamente le linee guida, non solo alla luce delle nuove conoscenze scientifiche, ma anche per adeguarle alla politica della Direttiva europea 86/609. I protocolli dei saggi di tossicità più comuni sono stati tutti modificati negli ultimi anni e questo consentirà di ottenere a breve termine una buona riduzione del numero di animali utilizzati. È anche importante la decisione di eliminare al più presto, probabilmente entro il 2002, la linea guida originaria per la tossicità orale acuta, la TG 401, in modo da costringere gli operatori ad utilizzare le tecniche alternative già ufficialmente adottate. Protocolli basati su tecniche *in vitro*, già presenti nella Direttiva europea, sono vicine ad essere proposte tra le linee guida OCSE e questo da l'avvio all'inserimento di ulteriori protocolli che non si basano sull'uso degli animali.

È indubbiamente necessario, per accelerare l'accettazione di nuovi metodi a livello normativo, che la procedura della validazione venga il più possibile semplificata e divulgata ed è significativo a questo proposito il fatto che un documento guida dell'OCSE sulla validazione e accettazione regolatoria di metodi nuovi o aggiornati, sia in circolazione tra gli esperti per la sua approvazione.

Nel frattempo altri metodi sono stati considerati scientificamente validati dal Comitato scientifico di ECVAM, come per esempio tre saggi di embriotossicità: *Embryonic Stem Cell Test*, *Micromass Test*, and *Rat Whole Embryo Test*. Tuttavia questi saggi non possono per il momento sostituire i saggi di tossicità riproduttiva *in vivo*, ma possono essere considerati in una strategia a tappe.

Certamente la tossicologia *in vitro* ha fatto notevoli progressi negli ultimi anni (46), anche se non si può negare che, come già detto, gli avanzamenti più consistenti si sono avuti nel settore della riduzione del numero e della sofferenza degli animali piuttosto che in quello della sostituzione. Tuttavia i fronti aperti dalla biologia molecolare nel campo della tossicologia, diagnostica, terapia, ecc., fanno prevedere che il settore della sostituzione completa dell'animale nella sperimentazione verrà alimentato da una quantità notevole di nuovi metodi *in vitro* molto sensibili e fondati su meccanismi di azione.

## Bibliografia

1. CEE. Council Directive 24 Novembre 1986 on the approximation laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* no. L. 358/1, 18 December 1986.
2. Italia. Decreto legislativo n. 116. Attuazione della direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 40, 18 dicembre 1992. p. 5-25.
3. Russel WMS, Burch RL (Ed.). *The principle of human experimental technique*. London: Meuthen, 1959. (University Federation for Animal Welfare, Special Edition, 1992).

4. Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lovell DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielmann H, Zucco F. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. ECVAM Workshop Report 5. *Altern Lab Anim* 1995;23:129-47.
5. Frazier JF. Scientific criteria for validation of *in vitro* toxicity tests. OECD Environment Monograph No. 36, 1990, 62 p.
6. Balls M, Blaauboer BJ, Brusick D, Frazier JF, Lamb D, Pemberton M, Reinhardt C, Roberfroid M, Rosenkranz H, Schmid B, Spielmann H, Stamatii A, Walum E. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *Altern Lab Anim* 1990a;18:313-37.
7. Balls M, Botham P, Cordier A, Fumero S, Kayser D, Koëter H, Kuondakjian P, Lindquist NG, Meyer O, Pioda L, Reinhardt C, Rozemond H, Smyrniotis T, Spielmann H, Van Looy H, Van Der Venne MT, Walum E. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. *Altern Lab Anim* 1990b;18:339-44.
8. Balls M, Clothier RH. Comments on the scientific validation and regulatory acceptance on *in vitro* toxicity tests. *Toxicol In Vitro* 1991;5:535-8.
9. Ekwall B, Bondesson I, Hellberg S, Hogberg J, Romert L, Stenberg K, Walum E. Validation of *in vitro* cytotoxicity tests. Past and present strategies. *Altern Lab Anim* 1991;19:226-33.
10. Marshall E. Toxicology goes molecular. *Science* 1993;259:1394.
11. Isfort RJ, Lederberg J (Ed.). *Toxicology for the next millennium*. *Ann N Y Acad Scie* 2000;919.
12. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M. An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *Altern Lab Anim* 1998;26:709-20.
13. Oliver GJA, Pemberton MA, Rhodes C. An *in vitro* model for identifying skin corrosive chemicals. I. Initial validation. *Toxicol In Vitro* 1988;2:7-17.
14. ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) test (an *in vitro* test for skin corrosivity). *Altern Lab Anim* 1998a;26:275-7.
15. ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the EPISKIN™ test (an *in vitro* test for skin corrosivity). *Altern Lab Anim* 1998b;26:278-80.
16. ECVAM News and Views. Statement on the application of the EpiDerm™ human skin model for skin corrosivity testing. *Altern Lab Anim* 2000a;28:365-7.
17. ECVAM News and Views. Statement on the application of the Corrositex® assay for skin corrosivity testing. *Altern Lab Anim* 2001;29:96-7.
18. Van De Sandt J, Roguet R, Cohen C, Esdaile D, Ponc M, Corsini E, Barker C, Fusenig N, Liebsch M, Benford D, De Brugerolle De Fraissinette A, Fartasch M. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *Altern Lab Anim* 1999;27:723-43.
19. Balls M, Berg N, Bruner L, Curren RD, De Silva O, Earl LK, Esdaile DJ, Fentem JH, Liebsch M, Ohno Y, Prinsen MK, Spielmann H, Worth A. Eye irritation: the way forward. *Altern Lab Anim* 1999;27:53-77.
20. Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The Guinea pig maximisation test. *J Invest Dermatol* 1969;52:268.
21. Ritz HL, Buehler EV. In: Drill VA, Lazar P (Ed.). *Procedure for conducting the Guinea pig assay*. *Current concepts in dermatology*. New York: Academic Press; 1980. p. 25-40.

22. Basketter DA, Scholes EW, Kimber I, Botham PA, Hilton J, Miller K, Robbins MC, Harrison PTC, Waite SJ. Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with Guinea pig test data. *Toxicol Methods* 1991;1:30-43.
23. Gad SC, Dunn BJ, Dobbs DW, Reilly C, Walsh RD. Development and validation of an alternative dermal sensitisation test: the mouse ear swelling test (mest). *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;84:93-114.
24. Kimber I, Hilton J, Botham PA, Basketter DA, Scholes EW, Robbins ML, Harrison PT, Waite SJ. The murine local lymph node assay. Results of an inter-laboratory trial. *Toxicol Lett* 1991;55:203-13.
25. Scholes EW, Basketter DA, Sarl AE, Kimber I, Evans CD, Miller K, Robbins MC, Harrison PT, Waite SJ. The local lymph node assay: results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *J Appl Toxicol* 1992;12:217-22.
26. Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Scholes EW, Ladics GS, Loveless SE, House RV, Guy A. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 1995;103:63-73.
27. Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Lea L, House RV, Ladics GS, Loveless S.E, Hastings KL. Assessment of skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory exercise. *J Toxicol Environ Health* 1998;53:563-79.
28. ECVAM News and Views. Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitisation testing. *Altern Lab Anim* 2000b;28:366-7.
29. Loveless SE, Ladics GS, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Scholes EW, House RV, Hilton J, Dearman RJ, Kimber I. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 1996;108:141-52.
30. Kimber I, Hilton J, Weisenberger C. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of *in situ* measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis* 1989;21:215-20.
31. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), OECD Workshop on harmonisation of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. Paris: OECD Environment Directorate, Chemicals Group and Management Committee. Test Guidelines Programme, 1996, 15.
32. Spielmann H, Lovell WW, Holzle E, Johnson BE, Maurer T, Miranda MA, Pape WJW, Sapora O, Sladowski D. *In vitro* phototoxicity testing. ECVAM Workshop Report 2. *Altern Lab Anim* 1994;22:314-48.
33. ECVAM News and Views. Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxic potential). *Altern Lab Anim* 1998c;26:7-8.
34. Borenfreund E, Puerner J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alteration and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985;24:119-224.
35. de Heer C, Bosman-Hoefakker S, Hakkert BC. Principles for study protocols addressing the dermal absorption of pesticides. *Tno Report V98.356*. Tno Nutrition And Food Research Institute; 1999. p. 1-29.
36. ANON. Dermal exposure assessment: principles and applications. US Department of Commerce, Environmental Protection Agency Report N° EPA/600/8-91/011B, 1992, 450 p., Washington DC: US Department of Commerce.
37. Skelly JP, Shah VP, Maibach HI, Guy RH, Wester RC, Flynn G Yacobi A. FDA, AAPS report of the workshop on principles of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and equivalence. *Pharm Res* 1987;4:265-7.

38. ANON. Subdivision F Hazard Evaluation - Humans and domestic animals: proposed new guideline section 85-3. Dermal absorption studies of pesticides. *Federal Register* 1993, 58,202: 54,350.
39. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W. Test Guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol* 1999;37:191-205.
40. Kemppainen BW, Reifenrath WG (Ed.). *Methods for skin absorption*. Boca Raton: CRC press, 1990.
41. Marco GJ, Simoneaux BJ, Williams SC, Cassidy JE, Bissig R, Muecke W. Radiotracer approaches to rodent dermal studies. In: Honeycut RC, Zweig G, Ragsdale NN (Ed.). *Dermal exposure related to pesticide use. Discussion of risk assessment*. Washington DC: American Chemical Society; 1985.
42. Franz TJ. Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol* 1975;64:190-5.
43. Bronaugh RL, Collier SW. Protocol for *in vitro* percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI (Ed.). *In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals and applications*. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 237-41.
44. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR, Hoeck U, Kemper F, Maibach H, Marty J-P, Merk H, Parra J, Rekkas D, Rondelli I, Shaefer H, Tauber U, Verbiere N. Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report 13. *Altern Lab Anim* 1996;24:81-106.
45. Roberts MS, Walters KA (Ed.). *Dermal absorption and toxicity assessment*. Drugs and Pharmaceutical Sciences Series. New York: Marcel Dekker; 1998. Vol. 91.
46. Zucco F, Vignoli AL. *In vitro* toxicology in Europe (1986-1997). *Toxicol In Vitro* 1998;12:745-928.



# REVISED FIXED DOSE PROCEDURE: OECD TEST GUIDELINE 420

Peter Ridgway  
*Health and Safety Executive, UK*

The Fixed Dose Procedure (FDP) was introduced as OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guideline 420 in 1992, as an alternative to the conventional method for assessing acute oral toxicity (1). The conventional method, which is described in OECD Test Guideline 401, was designed to identify the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) and uses death of animals as an endpoint (2). The FDP, first proposed in 1984 by the British Toxicology Society (3), relies on the observation of clear signs of toxicity at one of a series of fixed dose levels. These fixed dose levels were selected as those most likely to allow substances to be classified according to toxic hazard broadly in line with the European Union hazard classification system for dangerous substances (EC Directive 67/548/EEC and subsequent amendments and adaptations). UK and international *in vivo* validation studies, and regulatory experience have demonstrated that the FDP is able to provide the information on the acute toxic hazards required by many regulators and classifies substances in a similar manner to the conventional method, while using fewer animals and causing less suffering (4-6). This represents a refinement and reduction, in terms of the '3Rs' (replace, reduce, refine) of Russell and Burch (7).

In 1999, as part of an OECD initiative to phase out Test Guideline 401, a review of the alternative oral acute toxicity methods, including the FDP, was launched. The aim of the review was to update the alternative methods so that these can meet the regulatory needs of all OECD Member countries, provide further reductions in the number of animals used and introduce refinements to reduce the pain and distress of animals. The regulatory needs of Member countries included the capability to classify substances according to the criteria of the Globally Harmonised Hazard Classification and Labelling scheme (GHS) (8).

The aim of this paper is to describe the revised FDP and its properties.

## The revised FDP

In the revised procedure, animals of a single sex are dosed in a sequential manner using pre-specified dose levels of 5, 50, 300 or 2000 mg/kg (there is also an additional optional fixed dose of 5000 mg/kg). A sighting study is conducted first, which commences with the dosing of a single animal at one of the fixed doses. The starting dose is usually selected based on information already available on the substance or knowledge of structurally related substances as a dose likely to produce some signs of toxicity, but not mortality. In the absence of information on an appropriate dose, a starting dose of 300 mg/kg is used. Additional single animals are then dosed sequentially at higher or lower dose levels depending on the outcome for the preceding animal, as shown in Figure 1.

The sighting study is completed when a decision on the starting dose for the main study can be made, or when death occurs at the lowest fixed dose. In the main study, groups of four or five animals are dosed following the sequential procedure shown in Figure 2. The main study is terminated when a fixed dose causing evident toxicity (or no more than one death in a group of five animals tested) is identified, when no effects are seen at the fixed dose below that causing

mortality of a single animal tested in the sighting study or of two or more animals at a main study dose, when no effects are seen at the highest fixed dose, or when deaths occur at the lowest fixed dose. On completion of the test, the substance may be classified into one of the GHS classes, as indicated in Figure 2.

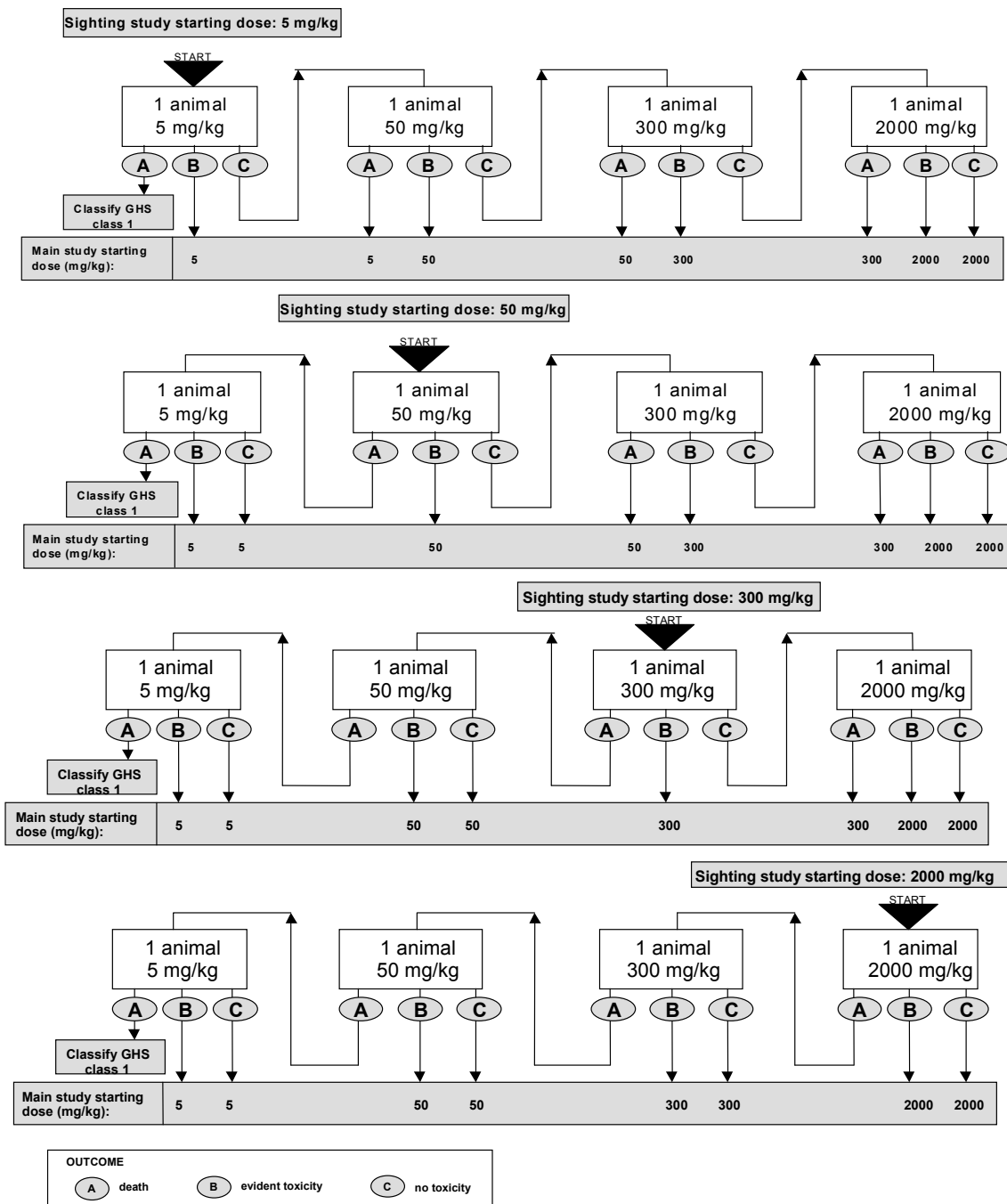
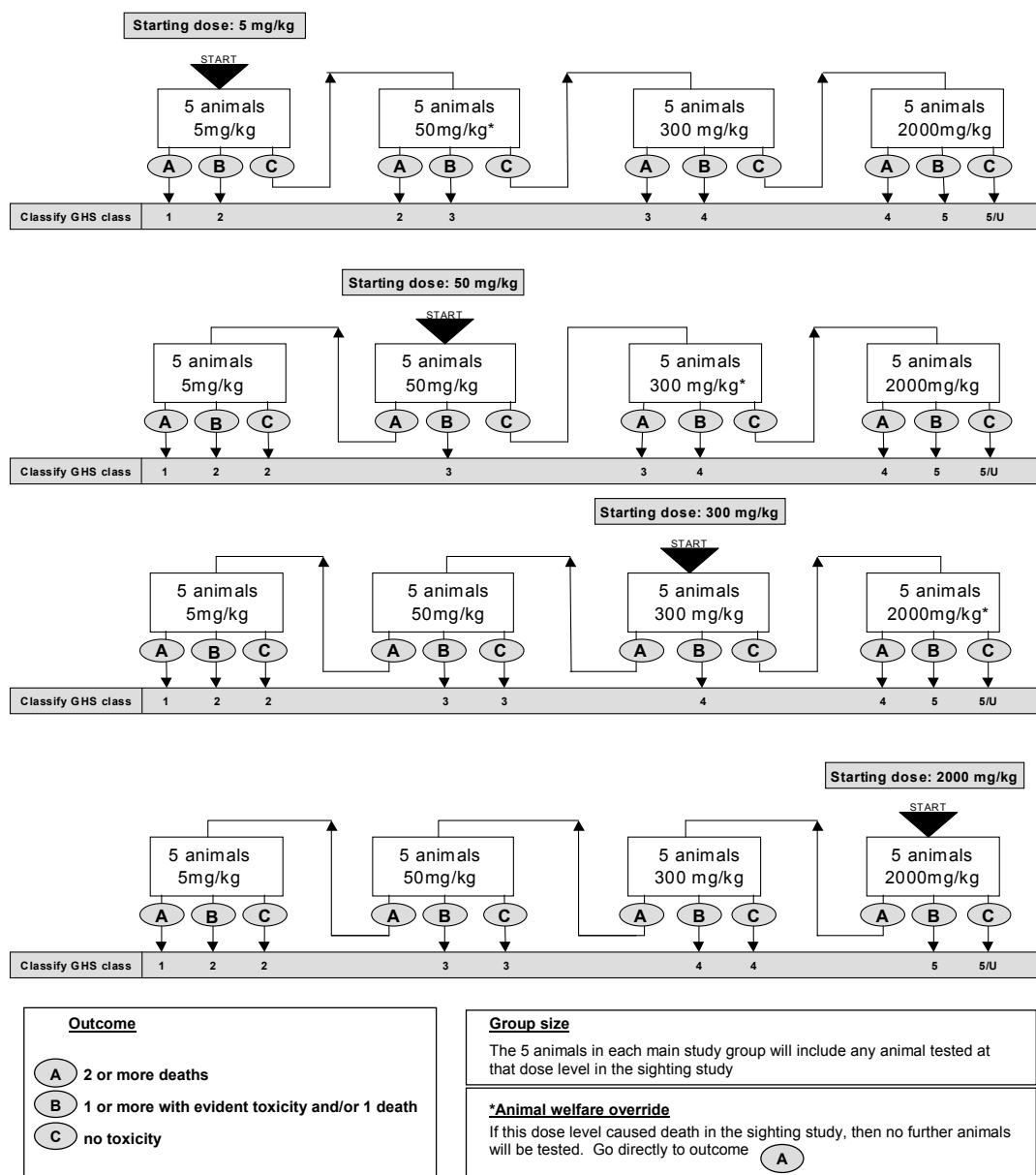


Figure 1. Revised FDP - sighting study



**Figure 2. Revised FDP- main study**

Alternatively, the substances may be classified according to the EU classification system, by considering GHS classes 1 and 2 as equivalent to EU ‘very toxic’, GHS class 3 as EU ‘toxic’ and GHS class 4 as EU ‘harmful’.

Whilst similar to the original FDP, the revised procedure differs in a number of important respects. First, the dose levels used in the revised procedure correspond to the GHS classification boundaries. Second, the maximum number of animals tested at each fixed dose is reduced from at least ten in the original procedure to five in the revised FDP, providing a significant saving in the numbers of animals used and numbers experiencing substance related death or toxicity. However, the reduction in the number of animals used inevitably leads to

decreased reproducibility, albeit slight, particularly for substances with shallow dose-response curves. Animals of a single sex only are tested. Unless it is anticipated that males may be more susceptible, females will generally be used. Furthermore, the revised procedure provides clear guidance on how to conduct and interpret the sighting study. Also, the results for sighting study animals are incorporated into the main study, so that only four further animals are tested in the main study at fixed doses that have been investigated in the sighting study. Finally, the rule determining when testing stops or continues at a higher or lower dose has been modified. In the original FDP, if any animals die, testing continues at a lower dose.

## Evaluation of the revised procedure

A statistical model is used to assess the performance of the FDP for substances with a range of LD<sub>50</sub> values and mortality dose-response slopes. The statistical model is similar to that described by Whitehead and Curnow (9) and Stallard and Whitehead (10).

The statistical evaluation indicates that the revised FDP has the capability to classify substances for acute oral toxicity generally in the same, or a more stringent, hazard class as that allocated on the basis of the LD<sub>50</sub> value, according to the criteria of either GHS or the EU classification scheme. The probability of achieving the same classification is greatest for substances with a steep dose response curve and for substances with TD<sub>50</sub> (the dose causing toxicity in 50% of animals) close to the LD<sub>50</sub>. The likelihood of allocation to a less stringent class is minimal, and is only a significant possibility for substances with an LD<sub>50</sub> just below a classification boundary. For such substances test methods that provide a direct estimate of the LD<sub>50</sub> are likely give a greater risk of a less stringent classification. The revised FDP has a bias towards a more stringent classification, a design trade-off that minimises the risks of less stringent classification. Whitehead and Curnow (9) and Stallard and Whitehead (10) found that the original FDP has a high risk of classifying substances with a steep slope in a less stringent manner within the EU scheme, when compared with an LD<sub>50</sub> derived classification; this undesirable property is eliminated in the revised FDP.

The evaluation indicates that the revised FDP will usually require five or six animals, and will only very occasionally require more. Often the test will be completed with the dosing of single animals at one or two fixed doses in the sighting study and a further four animals at one fixed dose level in the main study. An assessment of the regulatory use of the original FDP for testing new industrial chemicals found that on average 14 animals were used per test (6). Thus, the revised FDP uses considerably fewer animals. The number of animals dying as a result of treatment using the revised FDP is expected to range from none to two in most cases. Using the original FDP, typically between none and three treatment-related deaths can be expected.

The evaluation also shows that the classification outcome, total numbers of animals used and number of treatment-related deaths can be influenced by the choice of the sighting study starting dose. The probability of a more stringent classification is increased when a starting dose below the TD<sub>50</sub> is used and the probability of a less stringent classification is increased when a higher dose is used. The total number of animals used will be increased if a starting dose considerably lower or higher than the TD<sub>50</sub> is used, and the number of deaths can be markedly increased by the choice of a high starting dose when testing very toxic substances. For optimal performance of the revised FDP in terms of classification and animal welfare it is necessary for the investigator to carefully select the sighting study starting dose as a dose likely to cause toxicity, which requires access to all available background information on the test substance and structurally related substances.

## Conclusion

The revised FDP allows substances to be classified for acute oral toxicity according to either GHS or the EU classification scheme, generally in the same, or a more stringent, hazard class as that allocated on the basis of the LD<sub>50</sub> value. The revised FDP is expected to normally use between 5 and 6 animals, which is more than 50% fewer than the original procedure.

## References

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidelines for the testing of chemical substances. No. 420 Acute oral toxicity - fixed dose method*. Paris: OECD; 1992.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidelines for the testing of chemical substances. No. 401 Acute oral toxicity*. Paris: OECD; 1987.
3. British Toxicology Society. Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Hum Exp Toxicol* 1984;3:85-92.
4. Van den Heuvel MJ, Dayan AD, Shillaker R. Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Hum Toxicol* 1987;6:279-91.
5. Van den Heuvel MJ, Clark DG, Fielder RJ, Koundakjian PP, Oliver GJA, Pelling D, Tomlinson NJ, Walker AP. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. *Food Chem Toxicol* 1990;28:469-82.
6. Harvey P, Evans P. A regulatory assessment of the use of the fixed dose procedure in the notification of new industrial chemicals. *Hum Exp Toxicol* 1998;17:529.
7. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances and mixtures*. Paris: OECD; 2001. (ENV/JM/MONO(2001)6). Document available at: <http://www.oecd.org/ehs>; last visited 6/2/2003.
9. Whitehead A, Curnow RN. Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Food Chem Toxicol* 1992;30:313-24.
10. Stallard N, Whitehead A. Reducing animal numbers in the fixed-dose procedure. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:315-23.

# ORAL ACUTE TOXIC CLASS METHOD: OECD TEST GUIDELINE 423

Eva Schlede

*Federal Institute for Health Protection and Veterinary Medicine (BgVV), Berlin, Germany*

The oral Acute Toxic Class Method (ATC Method) (1) was developed as an alternative to the LD<sub>50</sub> Test [Test Guideline (TG) 401 of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2); and B.1 of the European Union]. The principle of the method was worked out in 1986 and was evaluated on a biometric basis with the use of the probit analysis.

The ATC Method is a stepwise procedure with three animals of one sex per step and with fixed starting doses. Absence or presence of mortality of the animals dosed at one step will determine the next step, i.e.:

- No further testing is needed.
- Dosing of three additional animals with the same dose.
- Dosing of three additional animals at the next higher or the next lower dose level.

There is no sighting study. The animals used for the first step can be considered as being used for a sighting study.

The ATC Method allows for the allocation of substances to all classification systems currently in use. The method was not designed to determine a point estimate of LD<sub>50</sub>, a confidence limit or a dose effect curve. However, these criteria can be calculated by the maximum likelihood method providing that there are at least two or three doses with mortality rates not equal to 0% or 100%. There is only a low dependence on the starting dose with respect to classification results, especially for slopes of greater than 1. The minimal distance factor between two neighbouring classes has to be 4 for slopes of at least 1 for a high rate of correct classification. Up to 70% fewer animals are being used than with the LD<sub>50</sub> Test for the assessment of acute oral toxicity (3-8).

The validity of the biometric model was tested with animal experiments. First, a national validation study with 6 participants (9,10), followed by an international validation study with 9 participants from 5 countries (10,11) were conducted. Substances to be tested were selected from the literature, since animal welfare regulations in Germany prohibit the use of animals when the data can be obtained in the literature. These substances covered all ranges of acute oral toxicity, Aldicarb being the most toxic (LD<sub>50</sub>: 1 mg/kg b.w.) and Ethyleneglycol being the least toxic (LD<sub>50</sub>: >5000 mg/kg b.w.). In the national study 30 substances (9) and in the international study 20 out of these 30 substances (11) were tested. In both studies the starting doses were 25, 200 or 2000 mg/kg b.w. but in the international study additional doses such as 5 mg and 5000 mg/kg b.w. were also tested. Though biometric modeling of the ATC Method had already demonstrated that with all still currently used classification systems a reliable classification can be obtained at least at that time there was a need to verify the biometric data with animal experiments.

Altogether 359 tests were conducted and 3942 rats were used (28.6% died and 1.7% were killed in a moribund status). A summary of the classification results is shown in Table 1. For the national study the data were obtained for the classification system of the EU while in the international study the data were evaluated for the 11 classification systems that are still currently used (9, 11). The results obtained in both studies are almost identical and also showing a very good agreement with the biometric evaluations.

**Table 1. Classification results with the Oral ATC Method**

Classification result	National study	International study	
	%	%	<i>biometric evaluations (%)</i>
Correct	87.0	77.5	84.3
More toxic	9.0	13.8	13.6
Less toxic	5.0	8.7	2.2
Identical inter-laboratory results	87.6	87.9	

The oral ATC Method (1) was adopted in March 1996 by OECD as an official Test Guideline (TG 423) and in also the EU in the same year (B.1 tris).

In addition to the validation of the ATC Method clinical signs of all animals used were evaluated for clinical signs related to a moribund status or death and the frequency of clinical signs observed among the laboratories. Clinical signs related to a moribund status or death are i.e. all forms of convulsions and ventral position. Large variations in the observation of clinical signs among the laboratories were reported. Though the onset, duration and severity of clinical signs is time dependant and varies for each animal, the experience of the investigator also plays a crucial role in identifying the survival or the moribund status of animals (12-14).

At the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of OECD in November 1998 an agreement was reached on a globally harmonized classification system (GHS) for several toxicological endpoints, including acute oral toxicity. As a result of this agreement the oral ATC Method was revised to use the cut-off values of the GHS (5, 50, 300, 2000, 5000 mg/kg b.w.) as starting doses (8). However, testing at a dose of 5000 mg/kg b.w. is restricted to specific regulatory needs and it was decided not to include the 5000 mg dose as a starting dose in the test procedures. Test results obtained with a dose of 2000 mg/kg b.w. should be used, when possible, to extrapolate to the range of >2000-5000 mg/kg b.w. While in the present version of TG 423 three female and three male rats are tested per step alternatively, it was agreed to use only three female rats at each step. A literature survey had demonstrated that female rats tend to be slightly more sensitive than male rats. The revised version of TG 423 is in the process of being adopted by OECD in 2002. Based on animal welfare considerations a decision was made not to run additional animal studies to verify the biometric evaluations.

An example of the revised test procedure with a starting dose of 2000 mg/kg b.w. is shown in Figure 1. It demonstrates that also the revised oral ATC Method can be used for the classification of all still currently used classification systems. In the revised TG 423 the lower part will be shown in a summarized form, and in the Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing the table shown here is published (3).

Since the adoption of the oral ATC Method by OECD in March 1996 until December 2000 more than 200 tests were submitted for the notification of new chemicals in Germany (Table 2). Until August 2001 50 test reports were submitted.

Table 3 shows a comparison of the use of the oral ATC Method and the LD<sub>50</sub> Test for the year 2000 for the notification procedure of new chemicals in Germany (during this year test reports on the other alternatives were not submitted). This direct comparison shows unequivocally the drastic reduction in the number of animals used and the number of animals that died with the ATC Method.

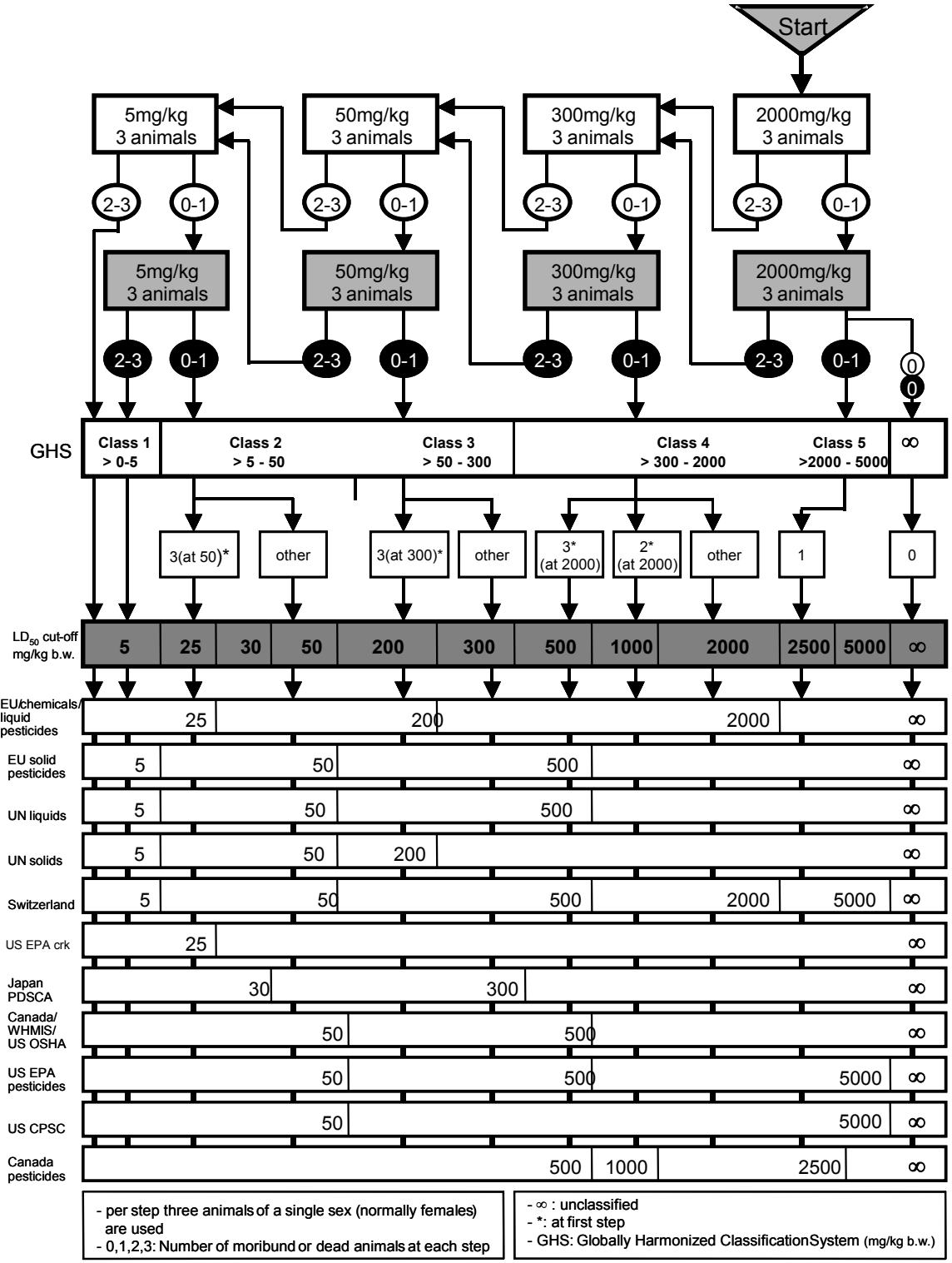


Figure 1. TG 423: classification according to currently existing schemes to cover the transition period until full implementation of the GHS



**Table 2. Oral ATC Method: Reports submitted for the notification of new chemicals in Germany (March 1996-December 2000)**

Test	Number of tests	Mean number of animals per test	Mean number of dead/moribund animals per test
All ATC Tests	205	7.4	0.8
ATC Limit Tests	140	6.0	0.04
ATC Tests*	65	10.6	2.4

\* one ATC Test with 3 doses per test

**Table 3. Reports submitted for the notification of new chemicals in Germany (January 2000-December 2000)**

Test	Number of tests	Mean number of animals per test	Mean number of dead/moribund animals per test
<b>ATC Method (TG 423)</b>			
All ATC Tests	60	6.6	0.5
ATC Limit Tests	48	6	0.06
ATC Tests	12	9	2.3
	<b>Number of tests</b>	<b>Mean number of animals per test</b>	<b>Mean number of dead animals per test</b>
<b>LD<sub>50</sub> Test (TG 401):</b>			
All LD <sub>50</sub> Tests	67	16.1	3.25
LD <sub>50</sub> Limit Tests	47	10	0.19
LD <sub>50</sub> Tests	20	30.3	10.45

So far, until August 2001, in Germany the number of ATC test reports is higher than the number of test reports with the LD<sub>50</sub> Test (50 versus 25), demonstrating for the first time a clear preference for an alternative method in acute oral toxicity testing. At present, in 5 member countries of the EU 53 test reports with the oral ATC Method have been accepted, and in 5 countries there are test laboratories from industry and/or contract laboratories which employ the oral ATC Method for regulatory purposes.

The oral ATC Method (TG 423) together with the Fixed Dose Procedure (TG 420) and the Up-and-Down Procedure (TG 425) will replace the LD<sub>50</sub> Test (TG 401). The process of deletion of the LD<sub>50</sub> test is in the final stages at OECD. In the EU this method has already been deleted by Commission Directive 2001/59/EEC of August 6, 2001.

At present, for the inhalation and dermal acute toxicity testing no alternatives to the respective dermal LD<sub>50</sub> Test (TG 402) and inhalation LC<sub>50</sub> Test (TG 403) are available. The principle of the oral ATC Method can be adapted for these two routes of exposure (15-17). A draft of the inhalation ATC Method had been already submitted to OECD in June 1998, but due to the then ongoing discussions on the GHS no further activities were initiated. We have developed the test procedures and conducted biometric evaluations for the dermal and inhalation ATC Methods with the use of the GHS, and drafts of these methods will be submitted to OECD

in the near future. The aim for the development of these ATC Methods is also to delete TG 402 and TG 403 (8).

## References

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *TG 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. Paris: OECD; 1996.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development. *TG 401: Acute Oral Toxicity*. Paris: OECD; 1987.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development. *No. 24 Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing*. Paris: OECD; 2001.
4. Diener W, Siccha L, Mischke U, Kayser D, Schlede E. The biometric evaluation of the acute-toxic-class method (oral). *Arch Toxicol* 1994;68:599-610.
5. Diener W, Mischke U, Kayser D, Schlede E. The biometric evaluation of the OECD modified version of the acute toxic class method (oral). *Arch Toxicol* 1995;69:729-34.
6. Diener W, Schlede E. Letter to the editor: FDP and ATC method: a mathematical comparison. *Hum Exp Toxicol* 1996;15:855-6.
7. Diener W, Schlede E. Brief an den Herausgeber: Maximum Likelihood Prinzip und ATC Methode (1996). *ALTEX* 1996;13:238-9.
8. Diener W, Schlede E. Acute toxic class methods: alternatives to LD/LC50 tests. *ALTEX* 1999;16:129-34.
9. Schlede E, Mischke U, Roll R, Kayser D. A national validation study of the acute-toxic-class method: an alternative to the LD<sub>50</sub> test. *Arch Toxicol* 1992;66:455-70.
10. Schlede E, Gerner I. Safety assessment of cosmetics and the use of alternatives: a perspective from Germany. In: Lisansky S, Macmillan R, Dupuis J (Ed.). *Alternatives to animal testing. Proceedings of an International Scientific Conference organised by the European Cosmetic Industry*. Brussels (Belgium), 1995. Newbury, Berkshire: cpl Press; 1995. p. 149-56.
11. Schlede E, Mischke U, Diener W, Kayser D. The international validation study of the acute toxic class method (oral). *Arch Toxicol* 1995;69:659-70.
12. Organisation for Economic Co-operation and Development. *No. 19 Guidance Document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Paris: OECD; 2000.
13. Tichias K, Fentem J, Basketter D, Botham P, Brooker P, Bruner L, Evans P, Fairhurst S, Fassold E, Fielder R, Gerberick F, Harvey P, Koeter H, Parsons P, Schlede E, Shannon D, Spielmann H. Progress in toxicological testing: reduction and refinement issues. recommendations from a joint UK Government/ECVAM meeting. *Altern Lab Anim* 1998;26:619-27.
14. Schlede E, Gerner I, Diener W. The use of humane endpoints in acute oral toxicity testing. In: Balls M, van Zeller A-M, Halder ME (Ed.). *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation*. Elsevier Science B.V.; 2000. p. 907-14.
15. Diener W, Kayser D, Schlede E. The inhalation acute toxic class method: test procedures and biometric evaluations. *Arch Toxicol* 1997;71:537-549.
16. Diener W, Kayser D, Schlede E. The dermal acute toxic class method: test procedures and biometric evaluations. *Arch Toxicol* 1998;72:751-62.
17. Diener W. Biometric evaluation of the ATC method for the determination of the acute dermal toxicity of chemicals. *Biometrical J* 1998;40:979-91.

# AN OVERVIEW OF UP-AND-DOWN PROCEDURE

Deborah McCall

*Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA*

It is a privilege to participate in this workshop and I hope more such workshops occur in our countries. Some background on myself – I am a Branch Chief in Office of Pesticide Programs (OPP) of Environmental Protection Agency (EPA) with a staff of 17 who evaluate physical chemical properties and acute toxicity of conventional pesticides. My talk consists of four parts: history, how US uses acute tests, what the 1996 Test Guideline (TG) looked like and finally how we redesigned it. The time lines listed below have occurred over the last 2.5 years in the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD):

- March 1999: 1<sup>st</sup> OECD Expert consultation (Washington DC);
- August 2000: 2<sup>nd</sup> OECD Expert consultation (Paris);
- November 2001: Adoption of 3 alternative test methods by OECD;
- Total TG 401 Phase-out (Adoption + 1 year).

As you will see, the guideline has undergone substantial change during that time some of which Herman Koeter has already covered in his talk.

The steps the American Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) has undertaken in the validation of the guideline during peer review process are:

- 1999/2000: EPA proposes changes (1996) UDP guideline;
- July 2000: 1<sup>st</sup> ICCVAM review of TG 425;
- July 2001: EPA developed UDP software;
- August 2001: 2<sup>nd</sup> ICCVAM review of TG 425;
- Oct/Nov 2001: ICCVAM report;
- February 2002: EPA/ICCVAM/ILSI workshop on acute toxicity (Washington DC).

The reasons “why we changed” the UDP during this peer review process and how the US uses the acute toxicity information are:

- hazard classification (EPA, DOT, CPSC);
- precautionary label language (EPA, CPSC, DOT, OSHA);
- child resistant packaging (EPA, CPSC);
- reentry intervals (EPA);
- worker training in chemical use (EPA, DOT, OSHA);
- protective clothing (EPA, CPSC, DOT, OSHA);
- environmental risk assessment for non-target organisms/endangered species (EPA);
- restricted use of pesticides (EPA);
- Poison Control Center.

The US needs of the UDP test are:

- point estimate ( $LD_{50}$ );
- confidence interval for point estimate;
- applicability to substances with wide range of dose-response slopes;
- toxic signs for the substance;
- variable population susceptibility to toxic substances.

The UDP ASTM method (1985) (OECD adopted method) envisaged that:

- all doses determined in advance, based on a dosing factor of 1.3 (0.12 on log scale);
- steep slope assumed, LD<sub>50</sub> CI based on it;
- next dose depends on 48 hour survival;
- stop at four animals after first outcome/reversal;
- single sex was used, but 5 additional animals of other sex used to confirm result;
- limit test: 10 animals;
- performance enhanced by range-finding test.

The most important part of this method is that all doses were predetermined based on the dosing factor of 1.3 in the 1985 version of UDP. This overview of the original test method will help you understand how drastically the guideline changed in the last two years. OPP spent time doing computer simulations on how well the UDP would classify compounds. What we discovered was that the old design had a large probability of under classification, mainly due to the statistics of the 1985 version, based on an assumed steep slope. Next OPP started another round of computer simulations using different statistical methods to refine the guideline so that UDP would not under classify.

Our computer simulations tested 1985 UDP study design and proved that:

- most toxic substances (LD<sub>50</sub> = 1.5 and 50) performed well;
- less toxic substances (LD<sub>50</sub> = 1500) UDP tended to be correct, but would under-classify as slope decreased;
- if starting dose was not close to true LD<sub>50</sub> point estimate, strongly biased toward initial dose or leads to use of many animals.

By far the most interesting finding was the guideline had a strong bias toward the initial dose which could lead to the use of many animals. So OPP set on a 6 month course to redesign the guideline. The results of the redesign of TG 425 were:

- point estimate is calculated;
- confidence interval calculated with software;
- method has small bias toward starting dose; it is essential to start below estimated LD<sub>50</sub>;
- if no estimate of actual LD<sub>50</sub> available; start dosing at 175 mg/kg;
- if no estimate of actual slope of the dose response curve, use dose progression factor of 3.2 (0.5 in log<sub>10</sub> scale) between doses;
- main test has adopted a stopping rule to limit animal use;
- 7-15 animals.
- do *not* use with substances that cause delayed death (five days or more).

OPP acknowledged that the investigator would have some knowledge of the chemical substance either with physical chemical data or SAR information, so that all existing data would be used in estimating the starting dose. A sidebar note here is that one of the computer simulation group's greatest finding was that different statistical packages calculated the LD<sub>50</sub> differently, which affected how many animals were to be used on test. So EPA started to work on a single computer application package which would accompany the guideline. The OPP group discovered that if no information existed on the chemical then the program should use the default starting dose of 175 mg/kg with a dose progression factor of 3.2. This dose progression should be used throughout the test. If some information exists on the slope, then you can modify the dose progression factor in the computer program before the start the test. The computer software automatically adapts the stopping rules, which limit unnecessary animal use. Most substances use approximately 8-12 animals per test.

The limit dose can be adapted to use either 2000 mg/kg or 5000 mg/kg as the dose. As stated earlier some OECD Member Countries may use 5000 mg/kg as the limit dose with the US being one of them. If after dosing the first animal dies, the limit test is stopped and go to the main test. There is a slight difference between the two limit doses, but in both cases the maximum number of animals used is 5. The difference is that three animals may give you adequate classification. Synthetically:

- *TG 425 Limit Test (2000 mg/kg)*
  - dose 1<sup>st</sup> animal at estimated dose – if it dies conduct the Main Test;
  - if animal lives - dose 2<sup>nd</sup> & 3<sup>rd</sup> animal concurrently and 4<sup>th</sup> & 5<sup>th</sup> sequentially;
  - if 3 animals die run the Main Test;
  - if 3 animals survive, LD<sub>50</sub> > limit dose tested;
  - maximum of 5 animals required.
- *TG 425 Limit Test (5000 mg/kg)*
  - dose 1<sup>st</sup> animal at estimated dose – if it dies conduct the Main Test;
  - if 2 animals survive, LD<sub>50</sub> > limit dose tested;
  - if 1 or 2 animals die, then dose 2 more animals, one at a time;
  - maximum of 5 animals required.

A disadvantage of UDP when performing the Main Test is:

- animals dosed one at a time;
- mean weight ranges of animals within  $\pm 20\%$ ;
- animals between 8-12 weeks of age;
- follow OECD Humane Practices for moribund animals;
- females tested.

Maintaining mean weight range throughout the test period may be difficult, particularly if the test is extended. Also, please follow the OECD Human Practice guidance document (1) when conducting any of the acute oral tests. ICCVAM stated in their draft report that either sex may be used unless it is known that males may be the more sensitive sex. OPP has some data which has shown that females may be more sensitive.

Another important part of the redesign of the TG 425 Main Test is that the first animal is dosed a step below the best estimation of the LD<sub>50</sub>. Again the default starting dose is 175 mg/kg with a dose progression factor of 3.2. Unless experience indicates otherwise, observe for 48 hours before next dose. Another item is the preferred use of constant concentration of the dose. If constant volume is used this should be indicated in the report.

The TG 425 software program which the OPP has developed incorporates stopping rules which provide a more uniform use of the test guidelines:

- *Use in Lab*
  - calculates dose progression;
  - implement stopping rules.
- *Use for calculations*
  - point estimate of LD<sub>50</sub>;
  - confidence Interval around point estimate.
- *Availability in future*
  - EPA website [www.epa.gov/pesticides](http://www.epa.gov/pesticides);
  - OECD website linked to EPA's.

Usually a point estimate is calculated; however, in certain instances a range of exposure will be produced. The computer program will calculate an LD<sub>50</sub> and the confidence limits around that point estimate. It is OPP's hope that in the near future the software program will be on the EPA website.

In summary, TG 425 endpoints are:

- point estimate (LD<sub>50</sub>) is calculated;
- confidence interval around point estimate;
- clinical observations of 14 days;
- test duration: 14 to 43 days;
- does *not* provide information about the slope of the dose-response curve.

The draft ICCVAM document listed three disadvantages of UDP:

- a) increased length of the UDP study over TG 401;
- b) increased cost of UDP over TG 401;
- c) increased complexity of the protocol.

On the last point, I believe the software will be a great tool and once the researcher is familiar with it the guideline will not seem as complex. As discussed earlier this will be the only test guideline that will calculate a point estimate of the LD<sub>50</sub> with confidence intervals of the three alternative acute oral test guidelines.

## Reference

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidance document on recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Paris: OECD; 2000. (ENV/JM/MONO(2000)7).

## Acronyms present in this paper

ASTM	American Society for Testing and Materials
CPSC	Consumer Product Safety Commission
DOT	Department of Transportation – US
EPA	Environmental Protection Agency – US
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods – US
ILSI	International Life Sciences Institute
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OPP	Office of Pesticide Programs – US EPA
OSHA	Occupational Safety and Hazards Administration – US
SAR	Structure Activity Relationships
UDP	Up-and-Down Procedure

# ATTIVITÀ DELL'UNITÀ DI MONITORAGGIO DELLA BPL

Giuseppe Battaglino

*Direzione Generale della Prevenzione, Ministero della Salute, Roma*

Il settore chimico ha subito negli ultimi decenni un continuo sviluppo sia culturale che tecnologico grazie alle nuove acquisizioni della chimica, della fisica e soprattutto dell'elettronica. In tutti i settori si sono avvertiti notevoli benefici ed il progresso scientifico è stato determinante, in molti casi, per l'impostazione delle strategie imprenditoriali volte alla conquista di nuovi mercati, in alcuni casi, alla riconversione industriale.

Il fatto culturale predominante di questi anni è stato, comunque, l'aver preso coscienza del concetto di qualità come elemento essenziale per l'affidabilità di un prodotto e, come logica conseguenza, per un maggior profitto.

Naturalmente, uno dei meccanismi per garantire la qualità è rappresentato da un miglioramento nei controlli, sia in termini di maggiori risorse messe a disposizione che di intensificazione degli stessi, condotti sia autonomamente dalle aziende interessate o come verifica da parte delle Autorità competenti.

Il settore farmaceutico, per quanto riguarda il controllo della qualità dei prodotti, è stato un antesignano ed ha spianato la strada a molti altri settori, tra i quali quello delle sostanze chimiche in senso lato. La valutazione della *safety* di una sostanza, infatti, è oggi una delle tappe fondamentali per poterne, successivamente, valutare gli eventuali impieghi che non presentino dei rischi per la salute dell'uomo o per l'ambiente.

In questo ambito si inserisce la Buona Pratica di Laboratorio (BPL) che, in quanto codice di comportamento generale, si può applicare a qualsiasi tipo di sperimentazione o di controllo. La BPL rappresenta l'inserimento di regole che riguardano l'ispezione e la verifica delle procedure organizzative delle condizioni alle quali sono programmate, svolte, registrate e comunicate le ricerche di laboratorio per le prove non cliniche effettuate ai fini previsti dalle regolamentazioni vigenti e volte a valutare gli effetti sull'uomo, sull'animale, sull'ambiente di tutti i prodotti chimici, inclusi i cosmetici, i prodotti per l'industria, i prodotti medicinali, gli additivi alimentari ed i coadiuvanti tecnologici, gli additivi per la mangimistica, gli antiparassitari, i solventi e gli aromatizzanti impiegati nell'industria alimentare, i costituenti di materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti. Tali regole, tuttavia, non entrano nel merito della scientificità dei tests adottati, non si propongono, cioè, di stabilire tra due o più prove, ad esempio tossicologiche, quale sia la più appropriata o maggiormente significativa.

La BPL quindi, sia da un punto di vista culturale che sostanziale, fornisce dei documenti volti a stabilire una serie di dettagli operativi sul "come" condurre un esperimento e sul "quando" sia necessario eseguire un test.

La direttiva quadro in materia di BPL è rappresentata dalla Direttiva 88/320/CEE del 7 giugno 1988, la cui importanza deriva dal fatto che, in primo luogo, comprende tutti i prodotti chimici (farmaci compresi) in un'unica normativa, in secondo luogo prevede il ricorso alla CEE qualora uno Stato Membro abbia motivo di ritenere che il laboratorio di un altro Stato Membro non operi in conformità con la BPL.

La direttiva era completata da un allegato relativo agli orientamenti per il rispetto delle procedure di controllo della BPL che è stato successivamente aggiornato con la Direttiva 90/18/CEE del 18 dicembre 1989.

L'art. 2 della direttiva stabilisce che gli Stati Membri verifichino, attraverso ispezioni e audits, la conformità alla BPL da parte dei laboratori situati nel territorio di loro competenza e,

qualora i risultati siano soddisfacenti, rilascino una dichiarazione di conformità alla BPL per il laboratorio e/o per le prove da questo effettuate.

Elemento di particolare importanza sancito dalla direttiva è che il risultato dell'ispezione è vincolante anche per gli Stati Membri, fatto salvo il caso in cui non emergano, per uno Stato Membro, motivi sufficienti per ritenere che un laboratorio situato in un altro Stato Membro abbia svolto prove non conformi alla BPL. In questo caso è possibile chiedere ulteriori informazioni ed ottenere che venga eseguita una verifica della ricerca, eventualmente associata ad una nuova ispezione. In caso di disaccordo degli Stati Membri, questi ne informano immediatamente gli altri Stati Membri e la Commissione, la quale esamina il problema nell'ambito del Comitato previsto dalla Direttiva 67/548/CEE, chiedendo eventualmente il parere di esperti facenti capo alle Autorità designate dagli Stati Membri. Nel caso in cui uno Stato Membro ritenga che un laboratorio situato nel proprio territorio, nonostante la sua asserzione, non rispetti la BPL, ne informa immediatamente la Commissione che, a sua volta, informa gli altri Stati Membri.

È previsto, inoltre, che ogni singolo Stato Membro, invii alla Commissione CEE ogni anno, entro il 31 marzo, una relazione che sia esplicativa dell'applicazione della BPL nel proprio territorio.

Da ricordare ancora la Decisione del Consiglio CEE del 29 luglio 1989 (89/569/CEE) concernente l'accettazione da parte della CEE della decisione/raccomandazione OCSE relativa ai principi della BPL.

Vorrei sottolineare che tra i vari settori soggetti alla BPL, vi è anche il settore cosmetico, ed infatti il DL.vo n. 126 del 24 aprile 1997, all'articolo 10, comma 4, prevede che la valutazione della sicurezza del prodotto per la salute umana, va effettuata in conformità a quanto previsto dal DL.vo 120/1992.

In Italia la verifica dell'applicazione della BPL è affidata al Ministero della Salute e, in particolare, all'Ufficio X della Direzione Generale della Prevenzione, dove ha sede l'Unità di monitoraggio per la BPL, istituita con Decreto del Ministro della Sanità del 10 agosto 1997. Secondo l'art. 1 del DM:

“Presso il Dipartimento della Prevenzione – Ufficio X – è istituita, nell'ambito della dotazione organica esistente e delle ordinarie risorse di bilancio, l'Unità di monitoraggio della Buona Pratica di Laboratorio che, per l'espletamento dei propri compiti si avvale della Commissione di coordinamento dei propri Uffici.”

L'art. 2 quindi stabilisce i compiti dell'unità di monitoraggio:

“L'Unità di monitoraggio:

- provvede alla ricezione delle documentazioni e delle comunicazioni trasmesse da parte dei Centri di saggio;
- predispone la documentazione relativa ai Centri di saggio da sottoporre ad esame della Commissione di coordinamento dei propri uffici;
- dà attuazione alle disposizioni previste dall'art. 9 del DL.vo 120/92;
- agisce quale punto di contatto con le Autorità dell'Unione Europea competenti per l'attuazione delle prescrizioni in materia di BPL.”

La composizione della Commissione di coordinamento degli Uffici, di cui al secondo punto dell'art. 2, secondo il DM 30 ottobre 2000, è la seguente:

- *Ministero della Salute*
  - 1 rappresentante della Direzione Generale della Prevenzione;
  - 1 rappresentante della Direzione Generale della Valutazione dei Medicinali e la Farmacosorveglianza;



- 2 rappresentanti della Direzione Generale della Sanità Pubblica Veterinaria, degli Alimenti e della Nutrizione;
- *Istituto Superiore di Sanità*
  - 1 rappresentante del Laboratorio degli Alimenti;
  - 1 rappresentante del Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia;
  - 1 rappresentante del Laboratorio di Tossicologia Applicata;
  - 1 rappresentante del Laboratorio di Chimica del Farmaco;
  - 1 rappresentante del Laboratorio di Farmacologia;
  - 1 rappresentante del Laboratorio di Medicina Veterinaria.

L'Unità di monitoraggio opera sulla base delle disposizioni che derivano dal DL.vo 27 gennaio 1992, n. 120, di attuazione delle Direttive 88/320/CEE e 90/18/CEE, e che in un numero limitato di articoli definisce il campo di applicazione della BPL, gli adempimenti cui devono ottemperare i Centri di saggio, la verifica di conformità di questi ultimi con la relativa certificazione, la riservatezza dei dati e i rapporti con la Unione Europea.

Il decreto stabilisce, all'art. 4, che la conformità dei Centri di saggio ai principi della BPL deve essere verificata mediante ispezione dei Centri medesimi e revisione di specifici studi, e all'art. 8, che il controllo di tutti i Centri di saggio, mediante un'ispezione generale o una revisione di uno studio in corso o terminato, sia effettuato almeno ogni due anni, fatte salve speciali ispezioni o revisioni di studi da condursi dietro specifiche richieste anche di altri Stati Membri o della Commissione UE.

Il decreto comprende anche tre allegati, di cui il primo riguarda la definizione dei termini, il secondo i principi della BPL ed il terzo gli orientamenti per lo svolgimento di ispezioni ai laboratori e revisioni di studi.

Le linee guida per la conduzione di una verifica ispettiva sono:

- Definizione dei termini.
- Considerazioni generali sulle ispezioni.
- Procedure ispettive:
  - preparazione dell'ispezione;
  - avviso dell'ispezione;
  - riunione di apertura;
  - programma di garanzia della qualità;
  - ispezione al Centro di saggio;
  - esame della documentazione;
  - revisione di studi.
- Riunione conclusiva.
- Verbale dell'ispezione.

A titolo di esempio, alcune fra la "deviazioni maggiori" indicative che il Centro di saggio non opera in regime di BPL, mostrando carenze relative ai punti descritti nell'Allegato II del DL.vo 120/1992, sono:

- *Personale dell'Unità di Assicurazione Qualità*
  - Assenza Curriculum Vitae dei responsabili.
  - Non individuazione delle funzioni (direttive e non).
  - Sovrapposizione di funzioni incompatibili.
  - Assenza del mansionario relativamente alle attività BLP.
  - Assenza di piani di formazione del personale.

- *Ambiente*
  - Ambienti non idonei per la corretta conduzione degli studi (affidabilità dei dati).
  - Ambienti non idonei per la corretta gestione dei dati (riservatezza, archiviazione).
  - Mancanza di separazione delle diverse attività.
  - Carenza di sistemi di segnalazione di eventuali anomalie di funzionamento di impianti e/o apparecchiature.
- *Procedure e metodi*
  - Assenza di procedure operative standard, ad esempio per la gestione di:
    - archiviazione della documentazione;
    - campioni (ricezione/codificazione/conservazione/trasmissione);
    - gestione dei materiali di laboratorio (ricezione/conservazione/circolazione/smaltimento);
    - apparecchiature di prova e di misura (registrazione/manutenzione/taratura);
    - sistema di saggio.
  - Assenza di metodi di analisi.
  - Assenza di documentazione relativa al controllo di qualità interno.
- *Studi*
  - Sovrapposizione di studi in regime di BPL con altri studi nelle stesse aree del laboratorio.
- *Dati e rapporti finali*
  - Alterazione dati grezzi tali da non consentire l'identificazione degli stessi.
  - Assenza di firma e data sui rapporti.
- *Verifiche ispettive interne*
  - Assenza di pianificazione e registrazione delle verifiche ispettive interne.

Per l'attuazione del disposto del DL.vo in questione sono stati, successivamente, emanati alcuni decreti ministeriali, e precisamente:

- a) Decreto del Ministro della Sanità del 7 gennaio 1993, riguardante i nominativi degli ispettori per le ispezioni ai Centri di saggio e le revisioni degli studi, secondo quanto previsto dall'art. 4, comma 2, del DL.vo, rinnovato con DM novembre 1996. La lista degli ispettori è stata anch'essa aggiornata con DM 25 febbraio 1997 e successivamente modificata con DM 12 marzo 1998;
- b) Decreto del Ministro della Sanità del 7 gennaio 1993, riguardante le tariffe e modalità relative alle prestazioni fornite dal Ministero della Sanità per le verifiche dei Centri di saggio e relative certificazioni, secondo quanto previsto dall'art. 11 del DL.vo;
- c) Decreto del Ministro della Sanità del 3 aprile 1992, riguardante l'istituzione di una Commissione di coordinamento tra i propri Uffici, secondo quanto previsto dall'art. 7 del DL.vo, rinnovato con DM 16 ottobre 1996, modificato con DM 27 novembre 1996 per tenere conto del riordino del Ministero della Sanità e successivamente modificato con DM 10 agosto 1997;
- d) Decreto del Ministro della Sanità del 5 agosto 1999, recante disposizioni relative all'ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio in recepimento delle Direttive 1999/11/CE e 1999/12/CE.

L'art. 1 di quest'ultimo decreto specifica i compiti della Commissione che discendono dall'art. 7 del DL.vo 120/1992 e consistono in:

1. assistere gli Uffici ministeriali competenti per l'applicazione della BPL;
2. formare e tenere aggiornato l'elenco generale dei Centri di saggio ispezionati (art. 9, comma 1, del DL.vo);
3. curare l'elaborazione e l'attuazione del programma di ispezioni inteso ad accertare che i Centri di saggio applichino i principi della BPL e possano garantire una buona qualità dei dati ottenuti (art. 8 del DL.vo);
4. curare gli atti relativi alla predisposizione della lista nazionale degli ispettori (art. 4, comma 2, del DL.vo);
5. predisporre la relazione annuale, da trasmettere entro il 31 marzo di ogni anno alla Commissione UE, relativa all'applicazione della BPL in Italia (art. 9, comma 1, del DL.vo).

# PROGRAMMA DI VISITE CONGIUNTE DELL'OCSE PER LA BPL E ADOZIONE DELLE LINEE GUIDA

Sergio Caroli

*Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Premessa

I principi di Buona Pratica di Laboratorio (BPL) messi a punto dall'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico, nella dizione inglese OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) alla fine degli anni '70 costituivano un primo, concreto tentativo per documentare in modo oggettivo il livello di credibilità dell'informazione sperimentale ottenuta nell'ambito di studi non clinici sulla sicurezza delle sostanze chimiche per l'uomo e per l'ambiente, per quanto riguardasse la corretta e responsabile conduzione degli studi stessi presso i Centri di Saggio (CdS) e la coerente valutazione dei loro esiti. I principi di BPL possono essere oggi considerati come un insieme internazionalmente riconosciuto di regole in grado di assicurare la validità dei dati sperimentali. Infatti, inizialmente concepiti per la sola applicazione a prove chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche, essi sono andati gradualmente espandendosi a settori scientifici sempre più ampi e diversificati (1). La mera codifica di questi principi, d'altro canto, non poteva da sola essere sufficiente per portare al mutuo riconoscimento dei dati prodotti dai CdS. A tale scopo (e per rafforzare reciprocamente la fiducia delle Autorità che vigilano sulla produzione e commercializzazione delle sostanze chimiche) è infatti fondamentale che vi sia il massimo grado di armonizzazione delle procedure sviluppate per verificare il livello di conformità ai principi di BPL, nonché delle modalità con cui vengono condotte le ispezioni ai CdS e le audizioni degli studi da questi effettuati.

I principali atti del Consiglio dell'OCSE che disciplinano questa materia per quanto concerne il mutuo riconoscimento, le attività ispettive e l'estensione del sistema BPL ai paesi non membri dell'OECD sono i seguenti:

1. *OECD Council Decision on the Mutual Acceptance of Data* [C(81)30/Final] (con le Linee Guida per i saggi sulle sostanze chimiche);
2. *OECD Council Decision - Recommendation on Compliance with Principles of GLP* [C(89)87(Final)];
3. *OECD Council Decision concerning the Adherence of Non-member Countries to the Council Acts related to the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals* [C(81)30(Final) and C(89)87(Final)] [C(97)114(Final)].

Un ulteriore significativo passo avanti nel processo di armonizzazione è stato recentemente compiuto con la programmazione di una serie di Visite Congiunte Reciproche (VCR) che l'OCSE ha predisposto per il periodo 1998-2001 al fine di ottenere informazioni dirette sulla gestione del sistema di verifica della conformità ai principi di BPL in ciascun Paese aderente all'iniziativa.

Gli aspetti specifici di questo programma e gli esiti finora desumibili dal suo completamento sono dettagliati nelle sezioni che seguono.

## Struttura del programma dell'OCSE per le VCR

L'accettazione reciproca dei dati prescritta dagli atti del Consiglio dell'OCSE presuppone che esista una fiducia completa circa il rigore e l'affidabilità del sistema ispettivo vigente in ciascun Paese. Ciò può essere conseguito nel modo migliore tramite visite sul posto eseguite da squadre di osservatori, esperti ed imparziali. Nell'arco di tempo tra il 1998 ed il 2001 l'OCSE ha attuato un programma di VCR, peraltro modellato su di una analoga iniziativa intrapresa dalla Commissione Europea alcuni anni prima. Sono state così visitate 33 Autorità nazionali responsabili della verifica del grado di adesione ai principi di BPL da parte dei CdS. I gruppi di osservatori erano di norma formati da esponenti di Autorità di verifica di altri tre paesi membri, ad uno dei quali venivano assegnate le funzioni di coordinamento. Lo schema delle visite è stato approntato in modo che si conseguisse un'ampia distribuzione geografica dei componenti la terna di visitatori ed al tempo stesso si tenesse conto delle preferenze espresse da uno specifico Paese per visitarne un altro.

Tutti i costi relativi all'effettuazione delle VCR sono stati coperti da ciascun Paese per la propria parte di spettanza (spese di viaggio e soggiorno a carico dei visitatori e spese di organizzazione locale a carico degli ospitanti). Per una conduzione coerente ed esauriente delle VCR, il Gruppo di lavoro dell'OCSE per la BPL aveva predisposto una serie di criteri cui le squadre di osservatori dovevano attenersi. L'organizzazione generale del programma di VCR è riassunta nelle Tabelle 1, 2 e 3.

**Tabella 1. Visite congiunte reciproche effettuate nel 1998\***

Paese visitato	Autorità nazionale di verifica visitata	Composizione Gruppo visitatori	Data
Danimarca	Agenzia del Farmaco	Belgio, Ungheria, USA (FDA)	30 marzo-4 aprile
Francia	Cofrac	Belgio, Giappone (MAFF), USA (EPA)	14-18 dicembre
Germania	Agenzia del Farmaco	Austria, Giappone (MOL), Svezia	29 giugno-3 luglio
Giappone	MOL	Australia, Olanda, Svezia	28 settembre-2 ottobre
Giappone	H&W, Farmaci	Australia, Olanda, USA (FDA)	5-9 ottobre
Norvegia	autorità unica	Germania, Grecia, Repubblica Slovacca	15-19 giugno
Repubblica Ceca	Agenzia del Farmaco	Canada, Francia, Olanda	2-6 novembre
Repubblica Ceca	Prodotti Chimici Industriali	Canada, Olanda	9-13 novembre
Repubblica Slovacca	Agenzia del Farmaco	Repubblica Ceca, Portogallo, Svizzera	1-25 settembre
USA	FDA	Finlandia, Irlanda, Giappone (H&W e MAFF, Agenzia Veterinaria), Norvegia**	14-19 settembre

\* Il primo Paese del gruppo di visitatori è il coordinatore. Qualora vi sia più di una Autorità di verifica della BPL per i Paesi citati, viene specificato tra parentesi di quale organismo si tratti.

\*\* Paese non formalmente membro del gruppo di visitatori, ma osservatore volontario

**Tabella 2. Visite congiunte reciproche effettuate nel 1999\***

Paese visitato	Autorità nazionale di verifica visitata	Composizione Gruppo visitatori	Data
Austria	autorità unica	Irlanda, Danimarca (Danak), USA (EPA)	6-10 settembre
Belgio	autorità unica	USA (FDA), Ungheria, Giappone (H&W e MITI, Prodotti Chimici Industriali)	1-5 marzo
Finlandia		Francia (Agenzia Veterinaria), Belgio, Repubblica Slovacca	31 maggio-4 giugno
Francia	Agenzia del Farmaco	Giappone (H&W, Farmaci), Italia, USA (FDA)	11-15 ottobre
Grecia	autorità unica	Francia (Agenzia del Farmaco), Repubblica Ceca, Germania	21-24 settembre
Irlanda	autorità unica	Giappone (H&W e MITI, Prodotti Chimici Industriali), Austria, Portogalo (IPQ)	4-8 ottobre
Italia	autorità unica	Regno Unito, Danimarca (Agenzia del Farmaco), Giappone (MAFF)	7-11 giugno
Ungheria	autorità unica	Germania, Danimarca (Danak), Svizzera, Norvegia**	11-15 ottobre
USA	EPA	Giappone (MOL), Australia, Svezia	14-18 giugno

\* Il primo Paese del gruppo di visitatori è il coordinatore. Qualora vi sia più di una Autorità di verifica della BPL per i Paesi citati, viene specificato tra parentesi di quale organismo si tratti.

\*\* Paese non formalmente membro del gruppo di visitatori, ma osservatore volontario

**Tabella 3. Visite congiunte reciproche effettuate nel 2000-2001\***

Paese visitato	Autorità nazionale di verifica visitata	Composizione Gruppo visitatori	Data
Australia	autorità unica	Svizzera, Canada, Corea	27-30 novembre 2000
Canada	autorità unica	Regno Unito, Finlandia, Australia	15-19 maggio 2000
Corea	autorità unica	Giappone (H&W e MITI, Prodotti Chimici Industriali), Belgio, Ungheria	19-23 giugno 2000
Danimarca	Danak	Austria, Repubblica Ceca	2-6 ottobre 2000
Francia	Agenzia Veterinaria	Grecia, Austria, Giappone (MAFF)	19-23 febbraio 2001
Giappone	MAFF	USA (EPA), Francia (Agenzia Veterinaria), Nuova Zelanda	13-17 marzo 2000
Giappone	MITI e H&W, Prodotti Chimici Industriali	Nuova Zelanda, Danimarca (Danak), Repubblica Ceca (Prodotti Chimici Industriali)	18-22 settembre 2000
Nuova Zelanda	autorità unica	Svizzera, Canada, Corea	20-24 novembre 2000
Olanda	autorità unica	Danimarca, Canada, Sud Africa	11-15 settembre 2000
Portogallo	autorità unica	Grecia, Regno Unito, Svizzera	3-7 luglio 2000
Regno Unito	autorità unica	Repubblica Slovacca, Giappone (MOL), Finlandia	2-6 ottobre 2000
Spagna	autorità unica	Olanda, Giappone (H&W), Francia	22-26 gennaio 2001
Svezia	Swedac	Ungheria, Italia, Portogallo	6-10 marzo 2000
Svizzera	autorità unica	Svezia, Irlanda, Norvegia	14-18 agosto 2000

\* Il primo Paese del gruppo di visitatori è il coordinatore. Qualora vi sia più di una Autorità di verifica della BPL per i Paesi citati, viene specificato tra parentesi di quale organismo si tratti.

La struttura di massima di una VCR tiene conto di tutte le indicazioni riportate nelle monografie OCSE di rilievo in questo contesto (2, 3). La sequenza delle varie fasi della visita è la seguente:

- *Giorno 1*  
*Presentazione del sistema nazionale per la BPL da parte del Paese ospitante*
  - Gestione del programma ispettivo, inclusi i rapporti con l'Autorità Regolatoria/Ricevente.
  - Mantenimento della confidenzialità dell'informazione commercialmente rilevante.
  - Numerosità del personale operante nel programma, sua qualificazione e suo addestramento.
  - Elementi principali del programma di verifica della conformità ai principi di BPL, compresi i rapporti ispettivi.
  - Azioni successive alle ispezioni ai CdS ed alle audizioni degli studi.
  - Procedure di ricorso.
  
- *Giorni 2-5*  
*Osservazione delle modalità ispettive*
  - Procedure ispettive.
  - Riunione d'apertura.
  - Organizzazione del CdS.
  - Infrastrutture.
  - Strumentazione, materiali, reattivi e campioni.
  - Sistemi di saggio.
  - Sostanze e sistemi di riferimento.
  - Procedure operative standard.
  - Esecuzione degli studi.
  - Rapporti.
  - Conservazione dei documenti.
  - Riunione di chiusura.
  - Preparazione del rapporto ispettivo.
  - Esame degli esiti della VCR e dibattito con l'Autorità di verifica del Paese ospitante.

Lo svolgimento di ogni VCR è stato ispirato dalla più grande flessibilità per quel che riguarda la lingua da impiegare per la migliore comprensione reciproca. Molto spesso a questo fine si è fatto ricorso all'Inglese, ma in alcuni casi è stato necessario servirsi di interpreti. Il rapporto redatto dalla squadra di visitatori al termine della VCR, a sua volta, segue uno schema prestabilito, i cui punti essenziali sono :

- *Gestione*  
(Autorità di monitoraggio e quadro normativo, documentazione scritta del programma, informazioni statistiche sul programma).
- *Confidenzialità.*
- *Personale ed addestramento*  
(numero degli ispettori, qualifiche necessarie ed addestramento, indipendenza, identificazione durante l'ispezione).
- *Programma di verifica*  
(finalità ed estensione, registrazione del CdS, categorie di ispezioni e di audizioni degli studi, accesso ai CdS, procedure per le ispezioni e le audizioni degli studi).

- *Azioni necessarie alla ispezioni ed alle audizioni degli studi.*
- *Procedure di appello.*
- *Esiti inerenti alla conduzione della ispezione osservata*  
(preispezioni, riunione di apertura, organizzazione del personale del CdS, programma di assicurazione della qualità, infrastrutture, sistemi biologici e relativi cura, alloggio e contenimento, strumentazione, materiali, reattivi, campioni, sistemi di saggio, sostanze di saggio e di riferimento, procedure operative standard, riunione di chiusura).
- *Esiti inerenti alla conduzione delle audizioni degli studi*  
(esecuzione dello studio, rapporto sui risultati dello studio, conservazione e mantenimento dei documenti e dei materiali, riunione di chiusura).

A valle della VCR e dopo il rientro della squadra di osservatori vanno espletate ulteriori azioni, consistenti essenzialmente nelle fasi seguenti: i) preparazione del rapporto da parte della squadra ispettiva dell'OCSE e suo invio all'Autorità Nazionale visitata (entro tre mesi dalla conclusione della VCR); ii) inserimento nel rapporto dei commenti dell'Autorità Nazionale visitata. Preparazione del rapporto definitivo e suo invio al Segretariato dell'OCSE per la BPL (entro cinque mesi dalla conclusione della VCR); iii) esame dei rapporti pervenuti da parte dell'apposito sottogruppo; iv) valutazione degli esiti complessivi da parte del Gruppo di Lavoro dell'OCSE per la BPL; v) formulazione di suggerimenti e raccomandazioni da parte dell'OCSE a tutti i paesi aderenti al programma di VCR per il conseguimento di una migliore armonizzazione dei programmi nazionali. Va sottolineato che quest'azione in nessun modo costituisce un giudizio formale sul grado di conformità dei programmi nazionali con le Decisioni del Consiglio dell'OCSE sulla BPL.

## Conclusioni

La valutazione complessiva degli esiti del programma pilota dell'OCSE per le VCR è ancora in corso di espletamento e si presuppone che possa essere disponibile solo alla fine dell'anno 2002. Per il momento, comunque, è possibile asserire che i maggiori punti critici hanno riguardato le Autorità nazionali visitate, l'operato degli ispettori del Paese ospitante e le modalità di conduzione delle VCR da parte delle squadre di osservatori, che possono essere così sintetizzati:

- *Aspetti critici riguardanti le Autorità Nazionali durante una VCR*
  - Collegamento tra Autorità nazionali di verifica ed Autorità nazionali riceventi.
  - Modalità d'archiviazione.
  - Indipendenza dell'Unità per l'Assicurazione di Qualità nei piccoli CdS.
  - Numero e qualificazione degli ispettori in relazione alla dimensione dei programmi di verifica.
  - Indicazioni su come l'Unità di Assicurazione di Qualità debba condurre le proprie azioni.
- *Aspetti critici riguardanti i Gruppi ispettivi durante una VCR*
  - Esperienza nel campo della verifica del grado di conformità dei principi di BPL da parte dei componenti la squadra di osservatori.
  - Risorse economiche adeguate.
  - Armonizzazione delle modalità di conduzione delle audizioni degli studi.



- Riscontro delle azioni correttive adottate dai CdS a seguito delle osservazioni formulate in precedenti ispezioni.
- *Aspetti critici riguardanti le Squadre di visitatori durante una VCR*
  - Non uniformità dei rapporti preparati dalle Squadre di visitatori.
  - Criteri più precisi per la scelta del CdS la cui ispezione va osservata e per le modalità di esame della conduzione delle audizioni degli studi.
  - Vicinanza del CdS in relazione al luogo dove si tengono gli incontri iniziali e finali della Squadra di visitatori con l’Autorità nazionale di verifica.
  - Insufficienza dei cinque giorni stabiliti per la visita.

A conclusione del processo di valutazione sarà possibile decidere se il programma di VCR dovrà: i) continuare in modo permanente con le stesse modalità della fase pilota; ii) continuare in modo permanente con modifiche sostanziali rispetto alla fase pilota; iii) cessare completamente. Nei primi due casi, è comunque auspicabile che sia prevista un’azione concertata più direttamente con la Commissione Europea. Non irrilevante, a questo fine, sarà certamente accertare se e in quale misura il programma di VCR abbia apportato significativi miglioramenti nello scambio di dati sulle sostanze chimiche tra i paesi membri dell’OCSE con un abbattimento consistente dei costi affrontati nella gestione di questa materia tale da riassorbire quelli inerenti al programma VCR stesso.

## **Bibliografia**

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)*. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 1, ENV/MC/CHEM(98)17. Paris: OECD; 1998.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Revised guidance of the conduct of laboratory inspections and study audits*. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 3 (revised), OCDE/GD(95)67. Paris: OECD; 1995.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidance for the preparation of GLP inspection reports*. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 9, OCDE/GD(95)114, Paris: OECD; 1995.

# LINEE GUIDA DELL'OCSE NEL SISTEMA DI ARMONIZZAZIONE DELLA CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE

Paola Di Prospero Fanghella, Roberto Binetti  
*Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La produzione e l'uso delle sostanze chimiche sono fondamentali per lo sviluppo economico di tutti i Paesi, ma possono comportare rischi per la salute e per l'ambiente quando non sono attuati in modo responsabile. L'obiettivo principale della classificazione di pericolo e dei sistemi d'informazione è quello di proteggere la salute umana e l'ambiente. Il primo passo consiste nell'individuare i pericoli specifici connessi all'uso dei prodotti chimici e quindi la scelta dei mezzi di informazione idonei e in forma facilmente comprensibile dagli utilizzatori.

La situazione attuale prevede regolamentazioni diverse fra i vari Paesi dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico), per esempio fra Europa e Stati Uniti, e anche norme specifiche di settore (Trasporto, Industria, Ambiente, Salute, Agricoltura, Consumatori, Ambiente di lavoro).

L'Armonizzazione si propone di raggiungere alcuni obiettivi fondamentali:

- Migliorare la protezione dell'uomo e dell'ambiente con un sistema internazionale per la comunicazione dei pericoli.
- Fornire un quadro di riferimento ai Paesi privi di un sistema esistente.
- Ridurre la necessità di sperimentazione e valutazione dei prodotti chimici.
- Facilitare gli scambi commerciali a livelli internazionali per i prodotti per i quali i pericoli sono stati valutati internazionalmente.

Il sistema di armonizzazione globale (*Global Harmonised System*, GHS) prevede quindi un uso integrato della classificazione di pericolo per il trasporto e per l'immissione in commercio, mentre nell'attuale sistema EU il trasporto e la commercializzazione seguono flussi diversi di legislazione. Nel 1992 la *UN Conference on Environment and Development* (UNCED) identificò l'armonizzazione della classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche come uno dei sei programmi d'azione.

Ritenendo raggiungibile l'armonizzazione della classificazione, ma non altrettanto realizzabile l'armonizzazione dell'etichettatura in tutti i settori, si richiedeva la compatibilità dei sistemi di informazione a partire dall'etichettatura fino alle schede informative di sicurezza.

UNCED identificò l'*International Program on Chemical Safety* (IPCS) come il nucleo per la cooperazione internazionale in questo settore. All'interno dell'IPCS fu istituito un *Coordinating Group for the Harmonisation of Chemical Classification System* (CG/HCCS) per la promozione e la supervisione del lavoro necessario per sviluppare il GHS. Il primo obiettivo in tal senso era lo sviluppo di un sistema di classificazione armonizzato mediante la definizione dei vari punti che destano preoccupazione. L'*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) è stata identificata come riferimento per il lavoro relativo ai pericoli per la salute umana e l'ambiente e l'*International Labour Office* (ILO) come riferimento per la comunicazione del pericolo, mentre l'*UN Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods* (UNCEDTG) insieme con l'ILO per i pericoli di tipo fisico. L'integrazione di questi sistemi si traduce nel *Global Harmonised Classification and Labelling System*.

Nel 1994 venne formalmente istituito il gruppo per l'armonizzazione della classificazione ed etichettatura (*Advisory Group on Harmonisation of Classification and Labelling - AG-HCL*) in ambito OCSE.

Questo gruppo ha basato il lavoro su una serie di principi generali:

- a) Mantenimento dello stesso livello di protezione dei lavoratori, consumatori, pubblico in generale e ambiente.
- b) Classificazione solo in base alle proprietà intrinseche di sostanze e miscele naturali e sintetiche.
- c) Armonizzazione per stabilire una base comune da cui selezionare gli elementi rilevanti comuni a diversi settori (trasporto, consumatori, lavoratori, ambiente).
- d) Armonizzazione sia dei criteri di classificazione, sia degli strumenti di comunicazione del pericolo (etichettatura e SDS).
- e) Tutti i sistemi esistenti saranno soggetti a variazioni quindi dovranno essere adottate misure transitorie quando si adotterà il nuovo sistema.
- f) Si deve assicurare il coinvolgimento delle organizzazioni internazionali dei lavoratori, consumatori e di altre organizzazioni rilevanti.
- g) La comunicazione del pericolo deve essere di facile comprensione da parte dei destinatari (lavoratori, consumatori, pubblico).
- h) I dati provenienti da saggi già effettuati per la classificazione dei prodotti secondo sistemi attuali dovrebbero essere accettati per riclassificare i prodotti secondo il sistema GHS.
- i) Il nuovo sistema GHS può richiedere la modifica dei metodi di saggio esistenti.
- j) La salute dei lavoratori e del pubblico in generale deve essere salvaguardata anche proteggendo il segreto commerciale, adottando la confidenzialità come previsto dalle Autorità Competenti.

Nell'agosto 2001 è stato pubblicato il documento finale elaborato dall'OCSE che descrive i principi sui quali si basa il sistema di classificazione di pericolosità per la salute umana e per l'ambiente da applicare alle sostanze chimiche e alle loro miscele: *Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures* (le tabelle di seguito presentate sono riprese da questo documento dell'OCSE, che ne ha autorizzato la riproduzione) (1). Si parla di miscele e non più di preparati intendendo coprire così qualsiasi miscela intenzionale o di processo di più sostanze chimiche.

Si auspica che entro il 2005 gli Stati Membri lo introducano nei rispettivi ordinamenti nazionali.

Questo sistema intende essere un denominatore comune dal quale ogni altro sistema potrà selezionare gli elementi rilevanti di interesse comuni ai diversi settori (trasporto, consumatori, lavoratori, ambiente). L'armonizzazione per ora si ferma all'identificazione dell'*hazard* sia per quanto riguarda i criteri di classificazione, sia per gli strumenti di comunicazione del pericolo, cioè etichettatura e schede di sicurezza che dovranno risultare di facile comprensione da parte dei destinatari, siano essi lavoratori o consumatori. Poiché comunque per tutti i sistemi esistenti si prevedono variazioni, saranno adottate misure transitorie al momento dell'adozione del GHS.

Uno dei principi basilari del GHS è l'intento di mantenere lo stesso livello di protezione per i lavoratori, per i consumatori, per il pubblico in generale e per l'ambiente.

La conseguenza più immediata della modifica dei criteri sarà la necessità di modificare anche i metodi di saggio esistenti tenendo conto della tendenza a favorire l'adozione dei metodi *in vitro* piuttosto che *in vivo*. Si ribadisce però il principio dell'accettazione dei dati provenienti da saggi già effettuati ai fini della classificazione secondo sistemi attuali per classificare nuovamente i prodotti secondo il sistema GHS.

## Tossicità acuta

Per la tossicità acuta sono previste cinque categorie basate su valori di DL<sub>50</sub> sperimentali o approssimate (ATE: Acute Toxicity Estimate) per le tre vie di somministrazione (Tabella 1) (1).

**Tabella 1. Tossicità acuta orale, cutanea, inalatoria secondo il GHS**

Acute toxicity	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5
Oral (mg/kg)	5	50	300	2000	5000 (or equivalent doses for other routes)
Dermal (mg/kg)	50	200	1000	2000	
Inhalation <sup>(1)</sup>					<i>Criteria:</i>
gas (ppm)	100	500	2500	5000	• Indication of significant effect in human
vapour (mg/l) <sup>(2,3)</sup>	0.5	2.0	10	20	• Any mortality at Category 4
dust/mists (mg/l/4hrs) <sup>(4)</sup>	0.05	0.5	1.0	5	• Significant clinical signs at Category 4
					• Indications from other studies

- Inhalation cut-off values are based on 4 hour testing exposures. Conversion of existing inhalation toxicity data which has been generated according to 1 hour exposures should be by dividing by a factor of 2 for gases and vapours and 4 for dusts and mists.
- Saturated vapour concentration may be used as an additional element to provide for specific health and safety.
- For some chemicals the test atmosphere will not just be a vapour but will consist of a mixture of liquid and vapour phases. For other chemicals the test atmosphere may consist of a vapour which is near the gaseous phase. In these latter cases, classification should be based on ppm as follows: Category 1 (100 ppm), Category 2 (500 ppm), Category 3 (2500 ppm), Category 4 (5000 ppm).
- The values of dust and mists should be reviewed to adapt to any future changes to OECD Test Guidelines with respect to technical limitation in generating, maintaining and measuring dust and mist concentrations in respirable form.

La Tabella 2 mostra la classificazione in base alla tossicità acuta secondo la Direttiva CEE 67/548/CEE (2).

**Tabella 2. Tossicità acuta, orale, cutanea, inalatoria secondo la Direttiva 67/548/EEC**

Classificazione in base a DL <sub>50</sub> /CL <sub>50</sub>				
Categoria	DL <sub>50</sub> (mg/kg)		CL <sub>50</sub> (mg/litro/4 ore)	
	orale	cutanea	inalatoria	
			aerosol o particelle	gas e vapori
Molto tossico	≤25	≤50	≤0,25	≤ 0,5
Tossico	25 ÷ 200	50 ÷ 400	0,25 ÷ 1	0,5 ÷ 2
Nocivo	200 ÷ 2000	400 ÷ 2000	1 ÷ 5	2 ÷ 20

Metodo a dose fissa, via orale, ratto		
Categoria	Dose discriminante (mg/kg)	Sopravvivenza
Molto tossico	5	< 100%
Tossico	5	100% (tossicità evidente)
Nocivo	50	100% (tossicità evidente)
	500	< 100%

Rispetto al limite massimo di 2000 mg/kg per la classificazione secondo gli attuali criteri UE, è stato aggiunto un limite di 5000mg/kg per la tossicità acuta orale o dosi equivalenti per le altre vie. Questo limite identifica la Categoria 5 di pericolo che è stata ritenuta necessaria per sostanze dotate di bassa tossicità che però in alcune circostanze possono rappresentare un pericolo per le fasce più sensibili di popolazione, ad esempio i bambini. In nome dell'*animal welfare* l'assegnazione a questa classe di pericolo non richiede che venga effettuato necessariamente o ripetuto il saggio limite a 5000 mg/kg, ma possono essere comunque utilizzati i dati ottenuti dal saggio a 2000 mg/kg: dalle osservazioni sugli animali effettuate in occasione di tale test si potrà prevedere in quale intervallo dovrebbe essere la DL<sub>50</sub>. Se poi a 2000 mg/kg oltre all'assenza di decessi, ci fosse anche la totale assenza di sintomi allora si potrà escludere anche l'applicazione della Categoria 5 di tossicità. Per la tossicità inalatoria l'unità di misura sarà ppm per i gas e mg/l per gli aerosol, nebbie e vapori.

## Corrosione/irritazione cutanea, irritazione oculare, sensibilizzazione

La Tabella 3 illustra i nuovi criteri per la corrosione e l'irritazione (1). È stato perseguito l'obiettivo di definire tali criteri nell'intervallo di sensibilità dei sistemi esistenti e di suddividere gli effetti in categorie tali da soddisfare le diverse esigenze delle varie Autorità regolatorie.

**Tabella 3. Corrosione/irritazione cutanea, irritazione oculare, sensibilizzazione**

<b>Dermal irritation/corrosion</b>	<b>CATEGORY 1</b> Destruction of dermal tissue: visible necrosis in at least one animal			<b>CATEGORY 2</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Reversible adverse effects in dermal tissue</li> <li>■ Mean Draize score in 2 of 3 animals: 2.3 ≤ erythema/-eschar/edema &lt; 4.0, or</li> <li>■ Persistent inflammation</li> </ul>	<b>CATEGORY 3</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Reversible adverse effects in dermal tissue</li> <li>■ Mean Draize score in 2 of 3 animals: 1.5 ≤ erythema/-eschar/edema &lt; 2.3</li> </ul>
	<b>Subcategory 1A</b> Exposure ≤3 minutes Observation ≤1 hour	<b>Subcategory 1B</b> Exposure ≤1 hour Observation ≤14 days	<b>Subcategory 1C</b> Exposure ≤4 hours Observation ≤14 days		
<b>Eye irritation/corrosion</b>	<b>CATEGORY 1</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Irreversible damage to cornea, iris, conjunctiva 21 days after exposure in at least one animal</li> <li>■ Mean Draize score in 2 of 3 animals: cornea opacity ≥ 3, iritis &gt; 1.5</li> </ul>			<b>CATEGORY 2</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Reversible adverse effects on cornea, iris, conjunctiva</li> <li>■ Mean Draize score in 2 of 3 animals: corneal opacity ≥ 1; iritis ≥ 1; redness ≥ 2, chemosis ≥ 2</li> </ul>	
				<b>Subcategory 2A</b> Reversible in 21 days	<b>Subcategory 2B</b> Reversible in 7 days
<b>Respiratory sensitisation</b>	<b>CATEGORY 1</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Evidence of specific respiratory hypersensitivity, or</li> <li>■ Positive results from animal tests</li> </ul>				
<b>Dermal sensitisation</b>	<b>CATEGORY 1</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Evidence in humans of sensitisation by skin contact, or</li> <li>■ Positive results from animal tests</li> </ul>				

Il sistema armonizzato comprende una guida per l'uso di elementi da considerare prima di intraprendere saggi su animali da laboratorio. In particolare:

- esperienza pratica sull'uomo;
- osservazioni durante studi di tossicità acuta o ripetuta su animali;
- SAR;
- pH estremi  $\leq 2$  e  $\geq 11,5$  (prevedibili effetti significativi sulla cute).

Elevata tossicità per via cutanea, osservazioni in prossimità della dose limite = nessun test addizionale (il test di corrosione richiederebbe una quantità di sostanza superiore alla dose tossica provocando il decesso dell'animale).

I criteri per la classificazione per l'irritazione e la corrosione secondo i principi riportati dalla Direttiva 67/548/ECC sono:

- Criteri di corrosione

Distribuzione dell'intero spessore del tessuto cutaneo:

- altamente corrosivo: dopo contatto di 3 minuti max.
- corrosivo: dopo contatto di 4 ore max.

- Criteri di irritazione

- *Cutanea*

Deve persistere per almeno 24 ore dopo esposizione max di 4 ore con i seguenti *scores*:

- eritema  $\geq 2$
- escara:  $\geq 2$
- edema:  $\geq 2$

- *Oculare*

Deve verificarsi entro 72 ore dopo l'esposizione e persistere per almeno 24 ore con i seguenti *scores*:

- opacità cornea:  $\geq 2$
- lesioni iride:  $\geq 1$
- arrossamento congiuntiva:  $\geq 2,5$
- edema congiuntiva (chemosi):  $\geq 2$

- *Grave irritazione oculare*

Deve verificarsi entro 72 ore dopo l'esposizione e persistere per almeno 24 ore con i seguenti *scores*:

- opacità cornea:  $\geq 3$
- lesioni iride:  $\geq 1,5$

## Mutagenesi, cancerogenesi, tossicità riproduttiva

La Tabella 4 illustra i nuovi criteri armonizzati secondo il GHS (1) secondo cui per la classificazione come cancerogeni, mutageni e tossici per la riproduzione ci saranno solo due categorie dove la 1 raggruppa le attuali categorie 1 e 2 dell'UE, e la 2 corrisponde all'attuale categoria 3. Per la tossicità riproduttiva la categoria 1 è divisa in due categorie a e b (effetti noti o effetti presunti sulla capacità riproduttiva o sullo sviluppo); è inoltre prevista un'altra categoria per gli effetti sulla lattazione (o attraverso la lattazione), corrispondente all'attuale frase R 64.

**Tabella 4. Mutagenesi, cancerogenesi, tossicità riproduttiva**

<b>Germ cell mutagenicity</b>	<b>CATEGORY 1</b> Known to produce heritable mutations in human germ cells		<b>CATEGORY 2</b>	
	<b>Subcategory 1A</b> Positive evidence from epidemiological studies	<b>Subcategory 1B</b> Positive results in: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>in vivo</i> heritable germ cell tests in mammals</li> <li>■ human germ cell tests</li> <li>■ <i>in vivo</i> somatic mutagenicity tests, combined with some evidence of germ cell mutagenicity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ May induce heritable mutations in human germ cells</li> <li>■ Positive evidence from tests in mammals and somatic cell tests</li> <li>■ <i>In vivo</i> somatic genotoxicity supported by <i>in vitro</i> mutagenicity</li> </ul>	
<b>Carcinogenicity</b>	<b>CATEGORY 1</b> Known or presumed carcinogen		<b>CATEGORY 2</b>	
	<b>Subcategory 1A</b> Known human carcinogen based on human evidence	<b>Subcategory 1B</b> Presumed human carcinogen based on demonstrated animal carcinogenicity	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Suspected carcinogen</li> <li>■ Limited evidence of human or animal carcinogenicity</li> </ul>	
<b>Reproductive toxicity</b>	<b>CATEGORY 1</b> Known or presumed human reproductive or developmental toxicant		<b>CATEGORY 2</b> Suspected human reproductive toxicant	<b>ADDITIONAL CATEGORY</b> Effects on or via lactation
	<b>Category 1A</b> Known	<b>Category 1B</b> Presumed		

## Pericolosità per l'ambiente

La Tabella 5 riporta i criteri di classificazione per l'ambiente in base agli effetti sugli organismi acquatici (1).

**Tabella 5. Tossicità acuta per gli organismi acquatici**

<b>Aquatic toxicity</b>	<b>Acute</b>			
	<b>CATEGORY 1</b> acute toxicity ≤1.00 mg/l	<b>CATEGORY 2</b> acute toxicity > 1.00 but ≤ 10.0 mg/l	<b>CATEGORY 3</b> acute toxicity > 10.0 but ≤ 100 mg/l	
	<b>Chronic</b>			
	<b>CATEGORY 1</b> acute toxicity ≤1.00 mg/l and lack of rapid degradability and low Kow ≥4 unless BCF < 500	<b>CATEGORY 2</b> acute toxicity >100 but ≤10.0 mg/l and lack of rapid degradability and low Kow ≥4 unless BCF <500 and unless chronic toxicity >1 mg/l	<b>CATEGORY 3</b> acute toxicity >10.0 but ≤100 mg/l and lack of rapid degradability and low Kow ≥4 unless BCF <500 and unless chronic toxicity >1 mg/l	<b>CATEGORY 4</b> acute toxicity >100 mg/l and lack of rapid degradability and low Kow ≥4 unless BCF <500 and unless chronic toxicity >1 mg/l

Per l'ecotossicità si introduce la tossicità cronica come parametro separato rispetto alla tossicità acuta. Attualmente il sistema UE prevede, come indicatori di possibili effetti a lungo termine, l'uso della persistenza e del bioaccumulo abbinati alle frasi di rischio R50 (Altamente tossico per gli organismi acquatici), R51 (Tossico per gli organismi acquatici) e R52 (Nocivo per gli organismi acquatici). Si potrà quindi distinguere nel GHS fra effetti acuti e cronici, mentre il limite del coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Kow), che è un indice di bioaccumulo, passa da 3 a 4 e il fattore di bioconcentrazione (BCF) da 100 a 500.

## Classificazione delle miscele per gli effetti acuti letali

Per brevità si descriverà qui di seguito solo il sistema adottato per gli effetti acuti letali, fermo restando che per tutti gli altri *endpoint* sono stati definiti criteri basati sull'adozione di limiti percentuali.

La classificazione delle miscele per gli effetti acuti letali si basa sull'uso di una D(C)L<sub>50</sub> di riferimento per il preparato. Laddove esiste il dato sperimentale sul preparato, tale valore è utilizzato direttamente per classificare il preparato come se si trattasse di una sostanza. Se il test sul preparato non è disponibile occorre stimare la D(C)L<sub>50</sub> del preparato in base alle D(C)L<sub>50</sub> dei componenti della miscela.

Quando sono presenti componenti per i quali non sono disponibili dati di tossicità acuta e la somma di questi è inferiore al 10 %, essi vengono ignorati ai fini del calcolo. In caso contrario, cioè se tale valore supera il 10%, si effettua il calcolo non riferito a 100, ma al valore reale.

La TG OECD 401 per la determinazione della DL<sub>50</sub> è stata eliminata, ma esistono altri metodi e il documento riporta una tabella che permette di ricavare il valore della DL<sub>50</sub> presunta dalla categoria di appartenenza. Infatti il metodo a dose fissa, ad esempio, non porta alla determinazione della DL<sub>50</sub>, ma individua una categoria di appartenenza.

Ai fini della classificazione devono essere presi in considerazione i componenti rilevanti presenti in concentrazione superiore a 1% a meno che non ci sia motivo per ritenere che un componente presente a concentrazioni inferiori sia rilevante ai fini della classificazione della miscela, ad esempio cancerogeni di categoria 1.

Qualora non fossero disponibili valori sperimentali di DL<sub>50</sub> oppure di CL<sub>50</sub> si effettua una stima della tossicità acuta (ATE) utilizzando i valori di conversione riportati nella Tabella 6 (1) sia se è disponibile il risultato di un range test sia se è nota solo la classificazione del componente. La classificazione delle miscele in base alla tossicità acuta si effettua per gradi e la Figura 1 illustra l'approccio da seguire nei vari casi. Quando si dispone di dati sperimentali sulla miscela tal quale si classifica direttamente la miscela. Quando invece si dispone di dati riferiti a miscele simili, sufficienti per classificare, si applicano i cosiddetti "principi ponte" sostitutivi.

## Diluizione

In caso di diluizione con una sostanza di minore o pari classificazione rispetto al componente meno tossico e se non si prevede influenza sulla tossicità degli altri componenti, la nuova miscela si classifica come quella iniziale.

In caso di diluizione con acqua o altro materiale non tossico si procede al calcolo della DL<sub>50</sub> dai dati sulla miscela iniziale. Ad esempio se la DL<sub>50</sub> = 1000 mg/kg e si effettua una diluizione al 50% la DL<sub>50</sub> risultante è pari a 2000 mg/kg.



**Tabella 6. Conversione da categoria di appartenenza e valori di riferimento per il calcolo dell'ATE della miscela**

	<b>Classification or experimentally obtained acute toxicity range estimate (see Note 1)</b>	<b>Conversion value (Note 2)</b>
Oral (mg/kg)	0 < Category 1 ≤ 5	0.5
	5 < Category 2 ≤ 50	5
	50 < Category 3 ≤ 300	100
	300 < Category 4 ≤ 2000	500
	2000 < Category 5 ≤ 5000	2500
Dermal (mg/kg)	0 < Category 1 ≤ 50	5
	50 < Category 2 ≤ 200	50
	200 < Category 3 ≤ 1000	300
	1000 < Category 4 ≤ 2000	1100
	2000 < Category 5 ≤ 5000	2500
Gases (ppm)	0 < Category 1 ≤ 100	10
	100 < Category 2 ≤ 500	100
	500 < Category 3 ≤ 2500	700
	2500 < Category 4 ≤ 5000	3000
	Category 5	
Vapours (mg/l)	0 < Category 1 ≤ 0.5	0.05
	0.5 < Category 2 ≤ 2.0	0.5
	2.0 < Category 3 ≤ 10.0	3
	10.0 < Category 4 ≤ 20.0	11
	Category 5	
Dust/Mist (mg/l)	0 < Category 1 ≤ 0.05	0.005
	0.05 < Category 2 ≤ 0.5	0.05
	0.5 < Category 3 ≤ 1.0	0.5
	1.0 < Category 4 ≤ 5.0	1.5
	Category 5	

Note 1: Category 5 is for mixtures which are of relatively low acute toxicity but which under certain circumstances may pose a hazard to vulnerable populations. These mixtures are anticipated to have an oral or dermal LD<sub>50</sub> value in the range of 2000-5000 mg/kg or equivalent dose for other routes of exposure. In light of animal welfare considerations, testing in animals in Category 5 ranges is discouraged and should only be considered when there is a strong likelihood that results of such testing would have a direct relevance for protecting human health.

Note 2: These values are designed to be used in the calculation of the ATE for a mixture based on its components and do not represent test results. The values are conservatively set at the lower end of the range of Categories 1 and 2, and at a point approximately 1/10<sup>th</sup> from the lower end of the range for Categories 3-5.

### Tiered approach to classification of mixtures for acute toxicity

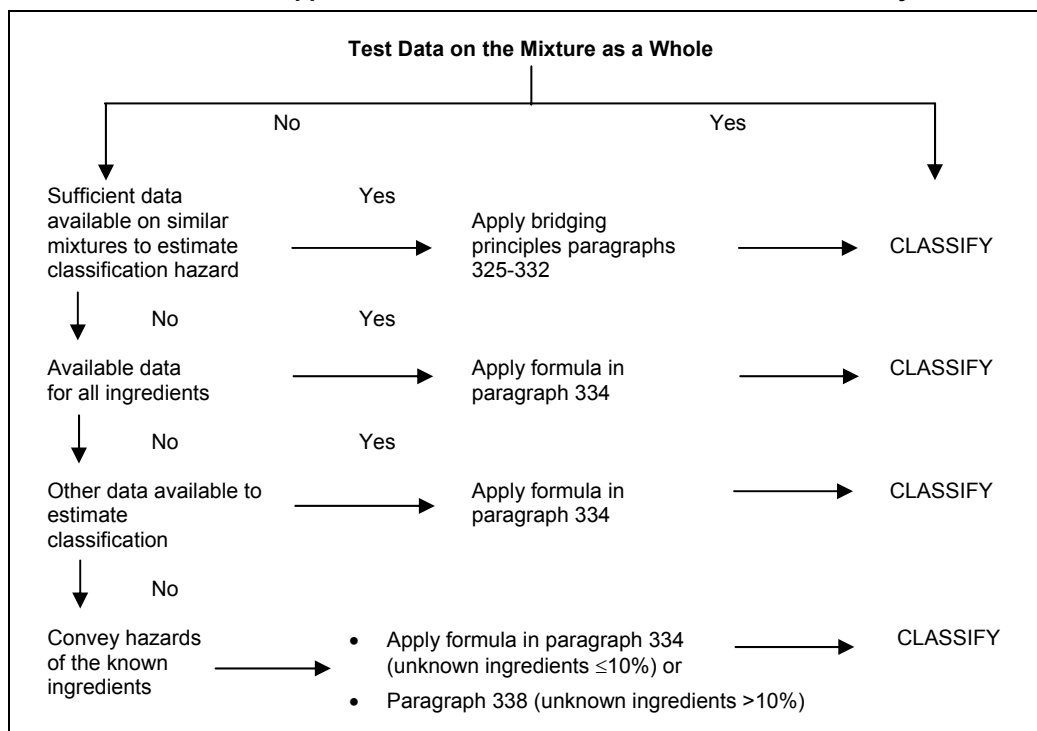


Figura 1. Classificazione di miscele e preparati

### Lotto di produzione

Quando si hanno diversi lotti di produzione si adotta la stessa classificazione quando non si hanno variazioni significative della tossicità.

### Miscele altamente tossiche

Se aumenta la concentrazione degli ingredienti altamente tossici della miscela, la miscela si classifica allo stesso modo senza saggi ulteriori.

Nei casi in cui non si disponga di dati sulla miscela tal quale, si distingue tra due sistemi, quello da applicare quando si hanno dati per tutti i componenti della miscela e quello da applicare quando non si dispone di dati per tutti i componenti, come riportato nel già citato documento dell'OCSE (1):

#### CLASSIFICATION OF MIXTURES BASED ON INGREDIENTS OF THE MIXTURE (ADDITIVITY FORMULA)

##### Data available for all ingredients

333. In order to ensure that classification of the mixture is accurate, and that the calculation need only be performed once for all systems, sectors, and categories, the Acute Toxicity Estimate (ATE) of ingredients should be considered as follows:

- Include ingredients with a known acute toxicity, which fall into any of the GHS acute toxicity categories.
- Ignore ingredients that are presumed not acutely toxic (e.g.: water, sugar).
- Ignore ingredients if the oral limit test does not show acute toxicity at 2,000 mg/kg/body weight.

Ingredients that fall within the scope of this paragraph are considered to be ingredients with a known Acute Toxicity Estimate (ATE).

334. The ATE of the mixture is determined by calculation from the ATE values for all relevant ingredients according to the following formula below for Oral, Dermal, or Inhalation Toxicity:

$$\frac{100}{ATE_{\text{mix}}} = \sum_{\eta} \frac{C_i}{ATE_i}$$

where:

$C_i$  = concentration of ingredient i

$\eta$  = ingredients and i is running from 1 to  $\eta$

$ATE_i$  = Acute Toxicity Estimate of ingredient i

#### **Data are not available for one or more ingredients of the mixture**

335. Where an ATE is not available for an individual ingredient of the mixture, but available information such as listed below can provide a derived conversion value, the formula in paragraph 334 may be applied.

This may include evaluation of:

- Extrapolation between oral, dermal, and inhalation acute toxicity estimates<sup>1</sup>. Such an evaluation could require appropriate pharmacodynamic and pharmacokinetic data.
- Evidence from human exposure that indicates toxic effects but does not provide lethal dose data.
- Evidence from any other toxicity tests/assays available on the substances that indicates toxic acute effects but does not necessarily provide lethal dose data. or
- Data from closely analogous substances using structure/activity relationships.

336. This approach generally requires substantial supplemental technical information, and a highly trained and experienced expert, to reliably estimate acute toxicity. If such information is not available, proceed to the provisions of paragraph 337.

---

<sup>1</sup> For ingredients with acute toxicity estimates available for other than the most appropriate exposure route, values may be extrapolated from the available exposure route to the most relevant route. Dermal and inhalatory route data are not always required for ingredients. However, in case data requirements for specific ingredients include acute toxicity estimates for the dermal and inhalatory route, the values to be used in the formula need to be from the required exposure route.

337. In the event that an ingredient without any useable information at all is used in a mixture at a concentration of 1% or greater, it is concluded that the mixture cannot be attributed a definitive acute toxicity estimate. In this situation the mixture should be classified based in the known ingredients only, with the additional statement the x percent of the mixture consists of ingredient(s) of unknown toxicity.

338. If the total concentration of the ingredient(s) with unknown acute toxicity is  $\leq 10\%$  then the formula presented in paragraph 334 should be used. If the total concentration of the ingredient(s) with unknown toxicity is  $> 10\%$ , the formula presented in paragraph 334 should be corrected to adjust for the total percentage of the unknown ingredient(s) as follows:

$$\frac{100 - (\sum C_{\text{unknown if } > 10\%})}{ATE_{\text{mix}}} = \sum_{\eta} \frac{C_i}{ATE_i}$$

## Conclusioni

Sono stati illustrati per sommi capi alcuni principi basilari del sistema di armonizzazione della classificazione delle sostanze chimiche e delle miscele, ma il GHS va bene al di là della classificazione e della conseguente etichettatura ed è parte integrante della strategia per la politica futura in materia di sostanze chimiche, il cosiddetto “Libro Bianco” (2).

L’armonizzazione permetterà di ridurre al minimo i saggi e renderà possibile la reciproca accettazione dei risultati della sperimentazione animale effettuata nei vari Paesi.

I saggi dovranno essere effettuati usando metodologie armonizzate a livello mondiale e saranno promossi l’uso e lo sviluppo di metodi per i quali non occorre ricorrere ad animali da esperimento.

## Bibliografia

1. Organisation for Economic and Co-operation Development. *Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures*. Paris: OECD; 2001. (OECD Series on Testing and Assessment Number 33). (ENV/JM/MONO(2001)6).
2. Council Directive 67/548/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* P 196, 16/08/1967, p. 0001-0098.
3. *White paper on a future chemicals policy*. Brussels: Commission of the European Communities; 2001. (COM(2001)88 final).

# PROCEDURE DI AGGIORNAMENTO DELLE LINEE GUIDA DELL'OCSE NEI CENTRI DI SAGGIO

Maria Mercede Brunetti  
*Research Toxicology Centre S.p.A., Pomezia (Roma)*

## Introduzione

Per un Centro di Saggio è fondamentale essere aggiornato in merito alle linee guida, questo diventa vitale per un Centro di Saggio che opera conto terzi, ovvero una Organizzazione di Ricerca a Contratto (CRO). Il ruolo della CRO si è modificato nel corso degli anni parallelamente e come conseguenza dell'aumentato ricorso all'*outsourcing* da parte dell'industria per quanto riguarda lo sviluppo di nuovi prodotti.

Alla CRO vista come fornitore, le aziende committenti hanno richiesto servizi sempre maggiori sia in termini di attività delegate sia in termini di qualità. Alla CRO si richiede:

- aggiornamento continuo e conseguente adeguamento allo stato dell'arte delle conoscenze tecnico-scientifiche e regolatorie;
- adeguata esperienza rispetto alle attività delegate;
- alti standard di qualità, paragonabili a quelli esistenti all'interno dell'azienda stessa;
- riduzione dei tempi, oltre che dei costi nell'ottica di una ottimizzazione del processo di sviluppo di nuovi prodotti.

Di qui la nuova visione, da parte di tante aziende, della CRO come partner piuttosto che come semplice fornitore di servizi. Peraltro, rapporti più stretti implicano sempre risposte più rapide e quindi contribuiscono a facilitare la richiesta riduzione dei tempi oltre che a rendere costruttiva la collaborazione. In quest'ottica anche la reciproca trasparenza è diventata un fattore chiave di successo per stabilire un efficiente ed efficace rapporto tra partner e, insieme alla flessibilità, permette alla CRO di soddisfare al meglio le sempre più svariate esigenze e richieste dei clienti.

Il cliente ultimo dell'azienda, l'ente regolatorio cui sarà inoltrato il dossier registrativo, diventa quindi un cliente indiretto anche per la CRO cui l'azienda ha delegato una o più attività nell'ambito del processo di sviluppo di un nuovo prodotto.

L'aspetto Qualità intesa come prodotto idoneo allo scopo va quindi oltre la mera conformità alle norme di Buona Pratica vigenti per includere anche la qualità scientifica, ovvero l'aderenza alle linee guida correnti cui fa riferimento l'ente regolatorio di pertinenza. Si può parlare di dati di qualità solo ove questi siano stati prodotti in base ad una linea guida adeguata e corrente, applicata in regime di Buona Pratica di Laboratorio (BPL).

## Difficoltà

Il processo di aggiornamento in merito alle molteplici linee guida non è facile come può sembrare e presenta sicuramente delle difficoltà legate a vari fattori.

Le difficoltà, almeno per quanto riguarda il *Research Toxicology Centre* (RTC), dipendono fondamentalmente da quattro fattori. Un primo fattore riguarda le tipologie di servizi offerti: più ampio è lo spettro di servizi offerti, maggiori diventano le informazioni da reperire per garantire

un aggiornamento adeguato. Una CRO che offre servizi molto diversificati in termini di campo di attività che spaziano dalla ricerca pre-clinica a quella clinica e alla produzione, oltre a consulenze in vari settori, come l'RTC, sicuramente si troverà a dover reperire più documenti e a seguire più processi di aggiornamento rispetto ad una CRO che opera esclusivamente in campo pre-clinico, magari limitatamente a poche tipologie di test, quali ad esempio test di tipo analitico.

Un secondo fattore di difficoltà è legato all'ampio spettro di tipologie di prodotti nel cui processo di sviluppo una CRO è coinvolta, ad esempio: farmaci, pesticidi, cosmetici, biocidi e così via. Infatti le normative e le linee guida possono variare per le diverse tipologie di prodotti in relazione ai diversi enti regolatori di pertinenza, anche nell'ambito di uno stesso Paese.

Un terzo fattore di difficoltà è rappresentato dal parco clienti della CRO. Svolgere attività per clienti che hanno lo scopo di registrare il proprio prodotto solo in ambito nazionale è sempre più una rarità; la maggior parte dei clienti richiede alla CRO un aggiornamento continuo in merito alle richieste regolatorie di svariati Paesi e organizzazioni sia nazionali, sia sovranazionali quali l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) e la Conferenza Internazionale di Armonizzazione (*International Conference on Harmonisation*, ICH).

Tale attitudine è avvalorata, nel caso dell'RTC, dal rivolgersi ad una clientela internazionale, con una percentuale piuttosto rilevante, almeno il 50%, di clienti non italiani.

Un ulteriore fattore di difficoltà è rappresentato dalla diversità di tipologia dei documenti da reperire ovvero normative e linee guida di carattere scientifico insieme a documenti dello stesso tipo, ma inerenti a problematiche diverse, ugualmente fondamentali per una corretta ed adeguata gestione della CRO. Per una CRO infatti è fondamentale essere sempre in linea rispetto allo stato dell'arte anche in altri campi quali la qualità, la sicurezza, l'etica, basti pensare alle problematiche connesse alla sperimentazione animale.

## Fonti informative esterne

A prima vista può sembrare che mantenersi aggiornati rispetto alle linee guida, anche limitatamente a quelle dell'OCSE, sia un processo semplice e che sostanzialmente si riduca allo scegliere tra le due seguenti opzioni:

- stipulare un abbonamento cartaceo;
- stipulare un abbonamento on-line.

In realtà lo scenario è molto più complesso, affidarsi semplicemente in una delle due opzioni su menzionate significherebbe, infatti, venire a conoscenza di una nuova linea guida solo al momento in cui questa viene emessa come documento draft o finale. Al contrario, per un centro di saggio è fondamentale essere parte attiva, in termini di partecipazione diretta al processo di definizione di una nuova linea guida e/o al flusso di informazioni connesse, dalla fase di proposta a quella di emissione di un documento finale, un processo che può anche durare svariati anni.

Di qui l'importanza di utilizzare al meglio le fonti informative disponibili e di strutturare all'interno un sistema che ne consenta la corretta utilizzazione garantendo l'aggiornamento richiesto.

Le fonti informative esterne includono sicuramente:

- riviste scientifiche;
- convegni, intendendo la partecipazione diretta e/o il reperimento dei relativi atti congressuali;

- associazioni scientifiche, intendendo sia l'iscrizione che la partecipazione diretta alle attività delle associazioni; questo facilita il reperimento delle informazioni anche per via indiretta, consentendo lo stabilirsi di contatti con colleghi di altre aziende oltre che un confronto sempre fruttuoso;
- passa parola, tra colleghi, inter e intra aziendale, che resta sempre un sistema valido e che attualmente si traduce spesso in un passa file visto che le informazioni e i documenti sono ormai per la maggior parte scambiati per via elettronica;
- sponsor, una fonte informativa molto importante, specialmente ove sussista un rapporto di partnership;
- banche dati, oltre alle fonti a stampa (libri, riviste e altri documenti) sono fondamentali le informazioni disponibili in formato elettronico come le base dati, on-line o su CD ROM;
- Internet, una fonte informativa ormai indispensabile, che ha rivoluzionato il sistema di reperimento delle informazioni.

Gli utenti hanno bisogno di un numero di informazioni sempre maggiore e sempre più diversificate; è importante garantire, quindi, oltre alle fonti informative tradizionali, anche l'accesso virtuale alle informazioni reperibili via internet (1, 2).

Internet ha rivoluzionato il sistema informativo anche se rimane problematico districarsi nella giungla di siti e informazioni disponibili in rete: siti di Autorità regolatorie, siti di società scientifiche e professionali, e così via. Basti pensare che, ad oggi, esistono almeno 150 milioni di siti, per un totale di oltre due miliardi di pagine web e oltre 14 miliardi di *link* (3); con motori di ricerca che, pur utilizzando sempre operatori booleani (*and/or*), sono guidati nel loro funzionamento da algoritmi e formule matematiche con una attitudine qualitativa oltre che quantitativa. Setacciare la rete, indicizzare le pagine e recuperare le informazioni nella giungla informativa di internet non è facile; si considera, peraltro, che il numero di pagine non indicizzate sia almeno 500 volte superiore al numero di pagine indicizzate (3), il che comporta la difficile accessibilità di una parte delle informazioni.

Altro aspetto problematico è la qualità dell'informazione disponibile e reperita. Tra i siti qualificati, che garantiscono informazione di qualità, vi sono sicuramente i siti dei vari enti regolatori che, peraltro, consentono anche l'accesso gratuito ai documenti resi disponibili.

## Fonti informative interne

Lo sfruttamento di fonti esterne e la necessità di ridistribuire le informazioni all'interno comportano una scelta organizzativa e strutturale in merito a come garantire un processo di aggiornamento continuo, efficiente ed efficace.

Due sono le possibili vie: aggiornamento centralizzato e aggiornamento decentralizzato. La RTC ha scelto una modalità decentralizzata rispetto alle fonti informative esterne e una modalità centralizzata rispetto alle fonti informative interne e alla ridistribuzione delle informazioni. Alcune funzioni aziendali hanno il compito definito di provvedere all'aggiornamento rispetto alle fonti informative esterne di loro pertinenza. Tali funzioni includono tutti i capi dipartimento, sia dei dipartimenti operativi (es. tossicologia genetica, tossicologia generale, patologia) che dei servizi (es. assicurazione della qualità, servizi informatici). Per i dipartimenti più complessi, quali ad esempio la tossicologia generale, i capi dipartimento sono supportati in tale attività dagli esperti di settore (es. tossicologia acuta, tossicologia della riproduzione). Oltre alle funzioni menzionate, ciascun dipendente, direttore di studio o personale tecnico, è tenuto a riportare all'interno eventuali informazioni ottenute tramite contatti esterni, incluso la

partecipazione a convegni e seminari. In tal modo tutti partecipano, anche se con carattere sporadico, al processo di aggiornamento rispetto alle fonti informative esterne.

Il flusso di informazioni interne ed esterne all'azienda viene correlato tramite sistemi di comunicazione elettronica. Questo facilita l'accesso alle informazioni reperite da parte di tutti gli utenti aziendali, assicura l'ampliamento delle risorse aziendali e facilita la gestione delle informazioni in quanto la disponibilità di documenti in formato elettronico ne permette una immediata redistribuzione e fruizione.

Strutturare un sistema che consenta la redistribuzione delle informazioni significa strutturare una biblioteca virtuale interna, un processo che sarà necessariamente diverso da azienda ad azienda (4). La biblioteca virtuale dell'RTC include sia fonti informative a stampa, sia fonti informative di natura informatica.

Le fonti informative a stampa includono:

– *Biblioteca cartacea*

È stata conservata la biblioteca cartacea pre-esistente, che ormai viene aggiornata quasi esclusivamente con libri. Tale biblioteca è stata comunque integrata con un indice elettronico in rete che permette, tramite chiavi di ricerca diversificate, il rapido reperimento dei documenti disponibili.

– *Gazzette Ufficiali (GU)*

La raccolta delle gazzette ufficiali continua ad esistere, integrata però da un abbonamento al giornale elettronico IPSOTEL, che fornisce recensioni in merito alle normative italiane ed europee, facilitandone quindi la consultazione.

– *Riviste di carattere scientifico e regolatorio*

Le riviste, in passato di natura prettamente cartacea, sono state sostituite, per l'80% circa, da riviste online. Anche in questo caso si garantisce un accesso immediato alle informazioni, mentre in passato la circolarizzazione del documento cartaceo prorogava tale accesso a una gran parte degli utenti.

Le fonti informative di natura informatica includono:

– *Biblioteca elettronica*

È costituita dalla raccolta in un'area specifica (GLINE), disponibile in rete, di tutti i documenti reperiti in formato elettronico via internet o altre fonti. Tale biblioteca è integrata da documenti disponibili in locale su CD rom. Su tale supporto sono disponibili ad esempio le Farmacopee Ufficiali (italiana, europea e statunitense), le informazioni relative alle sostanze pericolose notificate in ambito europeo (*International Uniform Chemical Information Database*, IUCLID) e le informazioni riguardanti le normative europee relative alle sostanze pericolose (Ellis). I CD rom sono provvisti di motore di ricerca propri che facilitano il reperimento delle informazioni.

– *Banche dati esterne*

L'accesso alle banche dati esterne è ormai una necessità ed è garantita da due diversi sistemi, DIALOG e STN, entrambi consentono l'accesso a circa 2000 banche dati (Medline, Toxline, ecc.). Le banche dati accessibili tramite i due sistemi sono le stesse, ma una ricerca condotta per l'una o l'altra via può condurre ad esiti diversi, in relazione al diverso funzionamento dei motori di ricerca utilizzati, di qui l'importanza di dotarsi di più vie di accesso.

– *Condivisione siti di interesse*

Questo si realizza in RTC tramite una pagina web specifica, ove vengono centralizzati e resi disponibili i *link* rispetto ai siti di interesse segnalati dagli utenti.



Se da un lato l'utilizzo di internet è dispendioso in termini di tempo e può comportare il rischio di dispersione dell'utente, dall'altro la possibilità di utilizzare motori e chiavi di ricerca anche all'interno della biblioteca virtuale aziendale consente, a valle, un recupero, almeno parziale, dei tempi spesi a monte.

Il correlare per via informatica le informazioni esterne ed interne tramite sistemi di comunicazione elettronica implica necessariamente problematiche in merito alla sicurezza e alla confidenzialità delle informazioni, aspetti che vanno adeguatamente considerati.

Due sono i problemi fondamentali associati alla comunicazione per via elettronica:

- Evitare accessi indesiderati dal mondo esterno al proprio sistema interno da parte dei cosiddetti *haker* o pirati informatici;
- Evitare di importare dall'esterno virus che potrebbero infettare il sistema interno creando seri danni al suo funzionamento, incluso la perdita di dati e informazioni importanti.

Molti sono i sistemi di difesa disponibili e adattabili. In caso di sistemi di comunicazione via Intranet, la creazione di Firewall e la trasmissione di dati previamente criptati sono due misure di sicurezza ormai standard.

Per quanto riguarda i virus, la situazione è in continuo divenire, con l'immissione in rete di virus sempre più nuovi e sempre più difficili da individuare. È indispensabile quindi non solo dotarsi di un programma anti-virus, ma anche aggiornarlo di continuo, un processo che è parallelo al continuo aggiornamento dei virus circolanti.

## **Partecipazione diretta al processo di aggiornamento: un esempio**

Un esempio di partecipazione diretta al processo di aggiornamento rispetto alle linee guida OCSE, che mette in luce come sia indispensabile partecipare al processo di aggiornamento, attivamente o reperendo le informazioni connesse, a partire da quando la linea guida viene proposta e non solo quando la linea guida diventa disponibile come documento draft o finale è quello qui descritto, relativo alle linee guida della tossicologia genetica.

Partecipare al processo di sviluppo in questo campo comporta necessariamente la partecipazione, a titolo personale (aziendale) o dietro invito come esperto, a convegni internazionali, in alternativa si possono reperire in letteratura le informazioni emerse in sede di convegno.

Altro aspetto importante è la partecipazione ai circuiti interlaboratorio di convalida delle linee guida. La RTC ha partecipato varie volte a tali esercizi, cito qui solo gli ultimi due relativi ai seguenti test: Mutazione in cellule TK+/- di Linfoma nel topo e Micronucleo *in vitro*. La partecipazione alla convalida è un'esperienza molto importante per un centro di saggio in quanto rappresenta una conferma della qualità dei dati prodotti, facilita internamente la messa a punto del test e quindi permette di essere pronti a rispondere alle richieste del mercato in merito ai nuovi test disponendo di una metodica validata prima dell'emissione della relativa linea guida.

Il primo workshop internazionale sulla standardizzazione dei test di tossicologia genetica si è svolto, nel febbraio del 1993, a Melbourne, nell'ambito del VI Convegno Internazionale di Mutagenesi Ambientale (5).

Scopo del workshop era promuovere la standardizzazione e arrivare ad un'armonizzazione delle metodologie utilizzate, attraverso il coinvolgimento e il consenso del mondo scientifico, sia industriale sia accademico e regolatorio. Tale esigenza nasceva soprattutto dalla

constatazione che vari paesi avevano emesso linee guida differenti, quindi i protocolli sperimentali utilizzati erano diversi e questo comportava la necessità di ripetizione degli studi in base al Paese dove si intendeva registrare un nuovo prodotto. Questo comportava da un lato perdita di tempo e risorse da parte dell'industria, dall'altro rendeva problematica la valutazione dei dati da parte dell'ente regolatorio, che si trovava a dover valutare dati generati tramite protocolli sperimentali non noti e che potevano anche utilizzare metodiche non sempre condivise.

Il rationale alla base del workshop di Melbourne era arrivare ad un confronto effettivo di dati rappresentativi del contesto internazionale, alla condivisione delle esperienze reciproche nel generare e valutare dati di tossicologia genetica derivanti da protocolli sperimentali diversi.

Il workshop era articolato in sei gruppi di lavoro e una sessione plenaria. Le sei categorie di test analizzate e discusse nell'ambito dei gruppi di lavoro e l'argomento affrontato in sessione plenaria sono:

– *Gruppi di lavoro*

1. Test su batteri
2. Mutazione genica in cellule di mammifero
3. Aberrazioni cromosomiche *in vitro*
4. Micronucleo e aberrazioni cromosomiche *in vivo*
5. Sintesi non programmata del DNA
6. Test su cellule germinali

– *Sessione plenaria*

Controlli negativi, utilizzo di controlli non trattati e di controlli trattati con solvente.

Le categorie di test erano state selezionate in base all'esistenza di almeno due linee guida differenti o all'esistenza di una linea guida in procinto di essere adottata dall'ente regolatorio.

Il workshop ha portato ad una migliore conoscenza della reale performance dei test, alla rimozione di resistenze esistenti a livello del mondo sia scientifico sia regolatorio, all'accettazione che nessun singolo test può individuare qualsiasi tipo di attività genotossica, alla volontà di accettare più di un metodo come valido e quindi di accettare compromessi nell'ottica dell'armonizzazione.

I risultati sono raccolti in un documento di consenso (5), gli aspetti per i quali non si è raggiunto il consenso sono stati riportati come decisioni di maggioranza precisando i vantaggi e svantaggi delle metodiche valutate.

Il documento è stato trasmesso al segretariato OCSE e al gruppo di esperti della ICH per essere considerato ai fini della formalizzazione delle nuove linee guida. Queste sono state emesse dall'OCSE nel 1997, quattro anni dopo.

A seguito del workshop di Melbourne, nel marzo 1999, in occasione del 30° convegno annuale della società di mutagenesi ambientale statunitense, si è svolto a Washington DC, un secondo workshop (6). Scopo di questo secondo incontro era:

- valutare i nuovi dati emersi onde arrivare ad un consenso sui temi rimasti aperti a Melbourne;
- discutere i nuovi test in fase di accettazione da parte degli enti regolatori onde assicurarne un'adozione armonizzata.

Gli argomenti trattati nel corso del workshop, organizzato in gruppi di lavoro, sessione plenaria e workshop addizionale, articolato in modo simile al precedente, sono:

– *Gruppi di lavoro*

1. Micronucleo *in vitro*
2. Mutazione in cellule TK+/- di Linfoma di topo

3. Test di genotossità fotochimica
  4. Test delle comete
  5. Micronucleo *in vivo*
  6. Test di mutazione in modelli transgenici
- *Sessione plenaria*  
Citotossicità nel test di aberrazioni cromosomiche *in vitro*
  - *Workshop addizionale*  
Determinazione degli addotti al DNA

Anche in questo caso il documento prodotto (6) è stato trasmesso al segretariato dell'OCSE e al gruppo di esperti della ICH. Ad oggi le relative linee guida non sono state ancora formalizzate.

Il processo di armonizzazione è in continuo divenire e la lentezza del processo di emissione delle linee guida può rappresentare un ostacolo per il mondo regolatorio, come dimostra la recente emissione da parte della Gran Bretagna, *Department of Health, Committee on Mutagenicity*, del seguente documento: *Guidelines on the strategy for testing of chemicals for mutagenicity* (7).

Tale documento modifica la strategia, rispetto allo schema registrativo, da seguire per la valutazione del potenziale genotossico di nuovi prodotti; introduce infatti un processo per step dove, per ciascun step, i test da utilizzare vengono selezionati in base ai risultati ottenuti nello step precedente.

Il documento peraltro fa riferimento a una serie di test che possono essere utilizzati a fini regolativi per i quali non sono ancora disponibili linee guida formalizzate, ma solo metodiche ben definite: test delle comete, *P-post labelling* test e test su modelli animali transgenici; viene citato anche un test per il quale non sempre sono disponibili metodi ben definiti: legame covalente al DNA. In RTC la maggior parte di tali test è già stata validata o è in fase di messa a punto.

Questo ci conferma nuovamente come, per assicurare un aggiornamento reale, sia necessario partecipare al processo di generazione di una linea guida a partire dalla fase di proposta, mentre si rivela troppo tardiva una conoscenza limitata a linee guida emesse come documenti draft o finali.

La fase di transizione, dalla proposta fino all'emissione di una linea guida definitiva, comporta spesso l'utilizzo della metodica anche prima che questa sia emessa in forma definitiva, non essere pronti ad applicarla comporta la mancata risposta alle richieste di mercato e questo per una CRO non è sicuramente auspicabile.

## Fase applicativa

Per quanto riguarda la fase applicativa, mi limiterò in questa sede a fornire qualche dato in merito all'utilizzo delle quattro linee guida OCSE attualmente disponibili per studi di tossicologia acuta e ad un accenno in merito alle modalità applicative di nuove linee guida.

Riguardo l'utilizzo delle quattro linee guida OCSE esistenti in merito alla tossicologia acuta, la 401 emessa in febbraio 1987, la 420 emessa in luglio 1992, la 423 emessa in marzo 1996 e la 425 emessa in settembre 1998, in RTC vengono utilizzate esclusivamente la 401, per il settore farmaco e la 423, per il settore chimico. Questo non deriva da una scelta aziendale dell'RTC, tutte e quattro le tipologie di studio rientrano infatti tra i servizi offerti, quanto da un orientamento preciso della clientela e quindi delle aziende di settore.

Il settore farmaceutico è ancora legato alla necessità della disponibilità di un valore di dose letale 50 (LD<sub>50</sub>) da utilizzare a fini regolativi e difficilmente abbandonerà tale scelta finché le norme in materia registrativa non saranno più chiare in merito. Al contrario le industrie del

settore chimico hanno abbandonato di buon grado la TG 401 per la TG 423, più rapida e meno dispendiosa, sia in termini etici che di costo.

Lo scenario è sicuramente destinato a cambiare in futuro in relazione alla prossima eliminazione della TG 401 e alla concomitante emissione della nuova versione delle altre tre linee guida.

La fase applicativa di nuove linee guida comporta sempre, da parte di un centro di saggio, una valutazione preliminare di fattibilità, svolta sia in base alle richieste di mercato che ai costi associati, legati principalmente alla disponibilità delle strutture e della strumentazione necessarie. Solo se si decide di procedere, sarà stilato un protocollo sperimentale, saranno emesse le relative procedure operative standard, sarà addestrato il personale di pertinenza e sarà definita la preparazione di una relazione standard.

In caso di studi *in vitro* o *ex vivo*, il processo sarà sostanzialmente lo stesso, ma si dovranno includere due step aggiuntivi, legati principalmente ai maggiori fattori di variabilità che si devono affrontare per studi di tale tipologia. Prima di stilare il protocollo sperimentale infatti si dovrà contemplare una fase di messa a punto del metodo e quindi una fase di convalida dello stesso.

## Conclusione

Vista la complessità e la vastità del processo di aggiornamento di un centro di saggio rispetto alle linee guida, è fondamentale la definizione di canali codificati di informazione tra i vari attori coinvolti nel processo di aggiornamento e utilizzo delle linee guida, ovvero: l'industria, la CRO e l'ente regolatorio. Il flusso informativo attuale risulta carente, specialmente nei confronti della CRO.

Va sottolineato che, nel corso del presente convegno, è emersa un'ampia apertura in merito da parte dei rappresentanti dell'ente regolatorio. Questo comporterà sicuramente un miglioramento del flusso informativo, con estremo vantaggio per tutte le parti coinvolte. Il che dimostra, ancora una volta, come occasioni di confronto tipo quella offerta da questo convegno sono sempre auspicabili e costituiscono una fonte di miglioramento, quindi vanno sempre apprezzate e stimolate.

## Bibliografia

1. Vercellesi L, Zorzi T, Bossi ML, Miranda GF. Internet e la trasformazione dei centri di documentazione: visione a breve termine. Prima parte. *Cronache Farmaceutiche* 1997;5:230-40.
2. Kempf K. Dalla Germania un esempio avanzato di sistema integrato. *Biblioteche Oggi* 1997;2:20-6.
3. *La Repubblica*, supplemento SMAU01. 18 ottobre 2001.
4. Cambini A, Leso ML, Vercellesi, L. Internet e la trasformazione dei centri di documentazione: visione a breve termine. Seconda parte. *Cronache Farmaceutiche* 1998;1:11-5.
5. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutat Res* 1994;312(3):195-322.
6. Proceedings of the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures. Washington DC, March 25-26, 1999. *Environ Mol Mutagen* 2000;35(3):159-260.
7. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. *Guidelines on the strategy for testing of chemicals for mutagenicity*. London: UK Department of Health; 2000.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:  
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le Attività Editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, dicembre 2002 (n. 4) 16° Suppl.*

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici  
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*