



I PROGETTI DEL SERVIZIO DI METROLOGIA AMBIENTALE DI ISPRA NELL'AMBITO DEL REGOLAMENTO REACH

S.Balzamo, D.Conti, E.Raso, MG.Simeone, V.Ubaldi, A.Paina, C.Martone, V.Bellaria, F.Cadoni, M.Buchetti, S.Gaudino
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale ISPRA, Roma

Il Regolamento REACH è volto a migliorare la conoscenza dei pericoli e dei rischi derivanti da prodotti chimici in modo da assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente, nonché la libera circolazione di sostanze nel mercato interno, rafforzando nel contempo la competitività e l'innovazione. Inoltre promuove lo sviluppo di metodi alternativi a quelli che richiedono l'utilizzo di animali vertebrati per la valutazione dei pericoli delle sostanze,

In particolare poi il Regolamento prevede che:

- i test e le analisi tossicologiche ed ecotossicologiche vengano eseguiti nel rispetto dei principi della Buona Pratica di Laboratorio (BPL), enunciati nella direttiva 2004/10/CE, o altre norme internazionali riconosciute equivalenti dalla Commissione o dall'Agenzia, e delle disposizioni della direttiva 86/609/CEE, ove applicabile (art. 13 comma 4),
- le informazioni da raccogliere in merito alla tossicità ed ecotossicità delle sostanze chimiche devono essere acquisite ricorrendo, ove possibile, a mezzi diversi dai test su animali vertebrati (art. 13) da considerarsi come ultima risorsa (art. 25).

In tale ambito nel 2010 il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA ha sviluppato tre progetti finalizzati all'implementazione del Regolamento REACH in Italia e di seguito brevemente illustrati.

1) Applicazione e armonizzazione di metodi in vitro per valutazioni ecotossicologiche delle sostanze chimiche, ai fini del Regolamento REACH: utilizzo della linea cellulare stabilizzata di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad).

Il progetto ha avuto come obiettivo la diffusione, presso i laboratori delle Agenzie Ambientali (ARPA/APPA), di metodi in vitro (linee cellulari stabilizzate di pesce) alternativi al saggio di tossicità acuta con pesci, da impiegare per lo screening preliminare di valutazione dell'ecotossicità di sostanze chimiche e/o campioni ambientali. A tale scopo è stata utilizzata la linea cellulare di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad).

Per l'esecuzione del progetto, il Servizio di Metrologia Ambientale ha promosso una collaborazione con i laboratori delle Agenzie ARPA Veneto, Toscana, Marche, Campania e Sicilia.

Il progetto, di durata triennale, ha previsto le seguenti attività:

- Elaborazione del protocollo operativo per la gestione della linea cellulare di pesce RTG-2 (Manuali e Linee Guida ISPRA 59/2010)
- Sperimentazione I - Valutazione della riproducibilità inter-laboratorio delle condizioni di coltura della linea cellulare utilizzata (curva di crescita, incertezza associata al tempo di raddoppiamento cellulare) attraverso uno studio collaborativo con i laboratori ARPA partecipanti al progetto (Resoconto analitico del progetto fino al 2012 inviato al Ministero Ambiente)
- Messa a punto del saggio di citotossicità basale MTT assay con la linea cellulare RTG-2 ed elaborazione del protocollo operativo con il tossico di riferimento cloruro di cadmio (CdCl₂)
- Sperimentazione II - Valutazione della riproducibilità inter-laboratorio del saggio MTT assay attraverso uno studio collaborativo con i laboratori ARPA partecipanti al progetto.
- Diffusione dei risultati del progetto mediante pubblicazioni (Rapporti e Linee guida in preparazione).

Il progetto si è chiuso a giugno 2013.

2) Regolamento REACH: implementazione dei metodi C1, C13, C14 e C15 (CE 440/2008) sui pesci, utilizzando la specie autoctona *Dicentrarchus labrax* (L.1758)

Il REACH, ai fini della registrazione delle sostanze e preparati, impone a tutti gli Stati Membri l'esecuzione di prove di tossicità e di bioaccumulo, con pesci in diverse fasi di sviluppo. I metodi di prova previsti dal REACH sono i seguenti:

C1 - Tossicità acuta con pesci (linea guida OCSE n. 203 "Fish, Acute Toxicity Test"); C13 - Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo (linea guida OCSE n. 305 "Bioconcentration: Flow-through Fish Test");

C14 - Test sulla crescita dei pesci giovani (linea guida OCSE n. 215 "Fish, Juvenile Growth Test");

C15 - Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino (Regolamento CE n. 440/2008) (linea guida OCSE n. 212 "Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages").

Per l'applicazione dei suddetti metodi di prova richiesti dal Regolamento REACH, allo scopo di disporre di una specie autoctona per il nostro Paese, il progetto era finalizzato all'inserimento della specie mediterranea *Dicentrarchus labrax* (D. Labrax) tra quelle idonee all'esecuzione dei saggi ecotossicologici con pesci. A tal fine sono state organizzate due strutture dedicate alla sperimentazione sui pesci (una presso ISPRA ed una presso ARPA Emilia Romagna Ferrara).

Il progetto ha previsto diverse fasi di sperimentazione in cui la specie di riferimento utilizzata è stata la trota iridea (*Onchorinchus mykiss*):

- saggi di valutazione della sensibilità in relazione alla salinità con *Dicentrarchus labrax*;
- saggi di tossicità a breve termine, con *Dicentrarchus labrax* e una specie di riferimento allo stadio di giovanili da eseguirsi secondo il metodo OECD n° 203, con 3 tossici di riferimento;
- saggi di crescita con *Dicentrarchus labrax* e la specie di riferimento, allo stadio di giovanili, da eseguirsi secondo il metodo OECD n° 215, con 3 tossici di riferimento.

In occasione dell'assemblea dei coordinatori nazionali del Programma Linee-Guida OCSE (WNT-25 - 2013) è stata approvata la proposta italiana di elaborazione di un Guidance Document (GD) sull'uso del branzino per l'esecuzione dei saggi di tossicità con i pesci. Il GD è in fase di elaborazione da parte del servizio AMB LAB di ISPRA.

3) Studio di fattibilità per l'applicazione della certificazione BPL - buone pratiche di laboratorio (Good Laboratory Practice) agli studi di tossicità condotti nei laboratori ISPRA e del sistema delle Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA)

Con il presente progetto il Servizio AMB-LAB di ISPRA ha inteso illustrare e approfondire gli elementi alla base dello schema di certificazione secondo la BPL, anche con l'obiettivo di un trasferimento di competenze ai laboratori della Rete delle Agenzie Ambientali. I risultati del progetto sono stati pubblicati in un rapporto in cui è presentato un modello operativo di sistema di gestione conforme alla BPL con la descrizione delle regole dei Principi e l'indicazione delle attività e della documentazione da predisporre. Il modello è stato sviluppato a partire dall'analisi della tipologia di studi che si intende certificare, del personale e delle strutture da coinvolgere ed include anche un esempio di applicazione al test di tossicità acuta con *Daphnia magna*. Inoltre poiché la scelta di dotarsi di un sistema di gestione della qualità conforme alla norma UNI EN ISO/IEC 17025:2005 è sempre più diffusa tra i laboratori del Sistema delle Agenzie, nel rapporto si presenta un confronto tra i requisiti di questa norma tecnica e quelli della BPL. Anche se il campo di applicazione e le finalità dei due sistemi di qualità sono diversi, nel caso si decida di adottarli entrambi è importante che la loro definizione e gestione non sia fonte di conflitti.