

## **Criteria per la valutazione delle deviazioni dai principi di buona pratica di laboratorio**

Alberto MANTOVANI

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

**Riassunto.** - La verifica della applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio (BPL) richiede l'integrazione delle diverse osservazioni in una valutazione complessiva dell'adeguatezza del Centro di saggio. Vengono esaminate alcune tipologie di deviazioni cui andrebbe attribuito un particolare rilievo in quanto esse possono compromettere l'attendibilità dei dati. Esempi di ciò sono: a) deviazioni, anche se come tali poco appariscenti, che indicano una inadeguata comprensione dei principi di BPL (ad esempio, insufficiente attenzione all'aggiornamento del personale); b) inadeguata applicazione dei principi di BPL a procedure e/o strutture di base (ad esempio, interfacce sporco-pulito nello stabulario); c) insufficienze riguardanti specifici tipi di studi. L'elaborazione di nuove linee guida implica la definizione di nuovi requisiti di qualità e punti critici, come nel caso dello sviluppo di saggi per l'identificazione di effetti endocrini che comporta la necessità di strutture e personale adeguati per l'esame dei parametri seminologici od ormonali.

*Parole chiave:* tossicologia, effetti endocrini, qualità, ispezione.

**Summary** (*Criteria to evaluate the deviations from the principles of good laboratory practice*). - The assessment of compliance with the principles of good laboratory practice (GLP) requires that different observations be integrated in a comprehensive assessment of the adequacy of the test facility inspected. The major types of deviations are examined in detail, since they might jeopardize the scientific quality of data. These are: a) deviations, even though seemingly minor ones, which could signal an inadequate understanding of the GLP principles (e.g., insufficient attention to personnel training); b) inadequate application of the GLP principles to basic procedures and/or structures (e.g., clean-dirty interfaces in the laboratory animal unit); c) inadequacies concerning specific study types. The elaboration of new guidelines leads to the definition of new quality requirements and critical points. One such case is the development of tests to identify endocrine effects which in turn triggers the need of structures and personnel adequate to examine seminological or hormonal parameters.

*Key words:* toxicology, endocrine effects, quality, guidelines.

### **Introduzione**

Le linee guida per la conduzione delle ispezioni per la verifica della conformità ai principi di buona pratica di laboratorio (BPL) [1] danno, giustamente, molto rilievo alla raccolta di osservazioni sulle strutture, procedure ed attività del Centro di saggio (CdS). Tale raccolta deve essere, ovviamente, accurata, dettagliata e completa. Essa deve seguire l'intero processo di produzione di uno studio e valutare le attrezzature ed i locali utilizzati, le attività in corso e, attraverso le audizioni degli studi, quelle già effettuate. Inoltre, l'esame delle attività contribuisce ad effettuare, più in generale, l'analisi delle strutture operative del CdS direttamente o indirettamente coinvolte nella applicazione dei principi di BPL, con particolare riguardo all'unità di assicurazione della qualità (UAQ). La UAQ,

testimone e garante dell'applicazione dei principi di BPL, è normalmente l'interlocutore principale del Gruppo ispettivo (GI); tuttavia, caso per caso, il GI potrà avere interazioni di fondamentale importanza con altre figure del CdS, ad esempio con i direttori di studio, a seconda degli specifici compiti e responsabilità.

Per quanto dettagliato ed impegnativo, l'esame di strutture, procedure ed attività rappresenta una parte del compito del GI e, più in generale, della verifica della conformità ai principi di BPL. Infatti, una volta raccolte le osservazioni, e pur tenendo conto delle specifiche caratteristiche del CdS (quali il numero e la tipologia dei saggi effettuati, le sue dimensioni, ecc.) occorre:

- a) "pesare" la gravità delle specifiche deviazioni rilevate;
- b) integrare le diverse osservazioni in una valutazione complessiva della capacità del CdS di operare in accordo ai principi di BPL.

È quindi necessario che il GI utilizzi dei criteri di giudizio necessariamente flessibili, ma al tempo stesso in grado di porre in rilievo con adeguata severità quelle deviazioni che rischiano di inficiare nella sostanza la qualità del dato sperimentale.

L'esperienza ispettiva mostra che, in qualche caso, si osservano ancora deviazioni grossolane quali, ad esempio, il mancato controllo dell'accesso all'archivio, o rilevanti discrepanze fra dati grezzi e rapporti finali (variazioni inspiegabili riguardanti la purezza o l'identità della sostanza in esame, il numero o la mortalità di animali impiegati in un saggio, ecc.). È chiaro che queste deviazioni vengono facilmente identificate da una visita ispettiva effettuata correttamente; è altrettanto evidente che la valutazione dell'adeguatezza del CdS non potrà che essere severa, in quanto tali deviazioni indicano come i principi basilari della BPL vengano ignorati o trascurati. Tuttavia, nelle gran maggioranza dei casi, le deviazioni osservate hanno un carattere diverso, più sottile: questo, però, non implica che tali deviazioni non possano avere un impatto significativo sulla effettiva applicazione dei principi di BPL. In questo lavoro si vuole fornire un contributo al miglioramento dei criteri di valutazione nell'ambito della BPL. A tale scopo vengono esaminate alcune tipologie di deviazioni cui dovrebbe venire attribuito un particolare rilievo a prescindere dalle specifiche caratteristiche dei CdS.

#### **Indicatori di una insufficiente attenzione nei confronti dei principi di BPL**

Si tratta di una tipologia di deviazioni particolarmente importante, che possono venire osservate in un contesto di corretta applicazione formale dei principi di BPL. Inoltre, si tratta sovente di deviazioni poco appariscenti come tali. Esse tuttavia assumono rilievo in quanto indicatori di una insufficiente comprensione dei principi di BPL e/o, più in particolare, di una insufficiente attenzione da parte della UAQ. Alcuni esempi possibili sono:

a) i *curricula* del personale indicano una scarsa preoccupazione per la formazione e l'aggiornamento. Il GI dovrà porre attenzione a questo punto fondamentale per l'effettiva applicazione dei principi di BPL ed in particolare alla formazione degli operatori non laureati. Un personale tecnico di laboratorio ben addestrato e coinvolto nella promozione della qualità è un elemento portante della BPL. Un possibile indicatore in tal senso è la partecipazione a corsi (sia interni che esterni) ed a convegni. Tuttavia, l'attenzione per la formazione non deve limitarsi ai soli operatori di laboratorio. All'interno del personale di segreteria sono ben identificabili alcune funzioni con compiti importanti nelle attività in regime di BPL. Esempi di questo tipo sono gli operatori che partecipano alla gestione dell'archivio o alla ricezione dei campioni. Sarà quindi importante verificare che

queste figure abbiano ricevuto una preparazione adeguata sulla BPL, in modo da essere informate circa le proprie responsabilità e partecipare attivamente ai loro compiti;

b) la ricezione dei campioni è un punto importante per l'attività dei CdS che operano per conto terzi. Un indicatore utile può essere il tipo di etichettatura effettuato sui campioni in arrivo: essa dovrà essere fatta su moduli uniformi, essere completa, leggibile e comprensibile e dovrà contenere informazioni quali il contenuto, il numero di partita, la data di arrivo e le eventuali precauzioni per la manipolazione;

c) l'esame delle procedure operative standard (POS) è uno degli elementi chiave delle visite ispettive. Oltre ad essere importanti di per se stesse, le POS possono essere validi indicatori della efficienza della UAQ e/o dell'effettivo coinvolgimento del personale del CdS nella BPL. Segnali importanti di problemi in tale senso possono essere la presenza consistente di POS non aggiornate (quindi probabilmente sostituite da procedure "verbali") e/o con aggiunte e correzioni a mano. Anche in questo caso, oltre a fare rilievi specifici, il GI dovrà porre particolare attenzione ad eventuali problemi nella gestione della qualità da parte del direttore del CdS e/o nell'attività della UAQ;

d) operare sistemi informatici in accordo ai principi di BPL è un aspetto relativamente nuovo, su cui è possibile riscontrare problemi. Oltre a connotazioni più evidenti di efficacia ed efficienza nella gestione dei dati, il GI dovrà valutare accuratamente se vi sia una sufficiente attenzione verso gli aspetti di sicurezza e confidenzialità dei dati nei sistemi informatici utilizzati. Tra i possibili indicatori in tale ambito si possono citare: 1) la quantità e la periodicità delle ispezioni della UAQ; 2) l'esistenza e la qualità delle POS relativamente alla autorizzazione di cambiamenti nei piani di studio, alla registrazione delle modifiche effettuate, al *back-up*, alla archiviazione e recupero dei documenti, ecc.; 3) le garanzie sul rispetto della confidenzialità dei dati contenute nel contratto di fornitura di servizi da parte di terzi in merito alla gestione del sistema.

#### **Inadeguata applicazione dei principi di BPL a procedure di base**

Un CdS può mostrare un livello tecnico di tutto rispetto nella programmazione ed esecuzione delle attività sperimentali, ma nonostante ciò presentare inadeguatezze nell'applicazione dei principi di BPL a procedure e/o strutture di base. Il GI dovrà prestare particolare attenzione a tali deviazioni in quanto, pur non avendo un impatto diretto sugli studi, esse possono compromettere la qualità di interi settori di attività del CdS. Due semplici esempi possono aiutare a chiarire l'importanza di una corretta comprensione ed applicazione dei principi di BPL oltre le attività propriamente sperimentali:

a) nell'ispezionare le procedure di pulizia e lavaggio della vetreria, il GI dovrà verificarne la reale comprensione ed applicabilità da parte degli addetti, tenendo conto che sovente a tali mansioni sono assegnati operatori non specializzati, con mansioni ausiliarie. Va inoltre verificata, tramite ad esempio la presenza e la qualità di apposite POS, l'esistenza di una adeguata attenzione a specifici problemi, quali quelli di decontaminazione, che potrebbero avere un impatto significativo, ad esempio, sulla qualità di saggi chimico-fisici e di residui;

b) negli ultimi decenni vi è stato sicuramente un grande miglioramento nella gestione degli stabulari, sia dal punto di vista del benessere animale che da quello della qualità ed uniformità degli animali come garanzia e presupposto della qualità dei risultati sperimentali *in vivo*, che, infine, da quello della preparazione degli operatori. La promozione del benessere animale e della qualità delle attività sperimentali richiedono una continua attenzione a punti critici quali la adeguatezza delle strutture e procedure adottate per separare lo stabulario dall'ambiente esterno e per mantenere la pulizia e la distinzione fra area sporca ed area pulita all'interno dello stabulario.

A tale proposito, il GI potrà esaminare indicatori quali l'effettiva tenuta di interfacce critiche, come le porte che danno verso l'esterno ed il locale per il lavaggio delle gabbie, dove vengono a contatto diretto l'area sporca e l'area pulita dello stabulario; all'interno dello stabulario per la presenza, ad esempio, di disomogeneità ed angoli vivi che rendono difficile una perfetta pulizia. Va infine ricordato che, come per il lavaggio della vetreria, alla pulizia dello stabulario possono venire addetti operatori a bassa qualificazione: va quindi verificata la effettiva comprensione ed applicabilità delle POS loro destinate.

### **Insufficienze riguardanti specifici tipi di studi**

È infine possibile che un CdS operi nel suo complesso ad un livello sufficientemente adeguato e che tuttavia presenti delle gravi insufficienze riguardo specifici tipi di studi. La presenza di esperti nel GI è di estrema utilità per rilevare adeguatamente tali carenze; esse possono compromettere irrimediabilmente l'attendibilità dei dati sperimentali e, generalmente, derivano dall'ignorare gli sviluppi e gli aggiornamenti delle linee guida internazionali, quali quelle elaborate in sede OECD [2]. Il GI dovrà prestare particolare attenzione a quelle tipologie di studi che richiedono competenze specialistiche e/o attrezzature specifiche. Ad esempio, nell'ambito della tossicologia *in vivo* va sottolineato che:

a) gli studi di tossicità prenatale (linea guida OECD 414) comportano un esame dettagliato delle anomalie scheletriche e dei tessuti molli di ogni singolo feto.

Pertanto, è necessario avere a disposizione un congruo numero di operatori che abbiano seguito un addestramento adeguato [2];

b) gli studi di tossicità inalatoria (linee guida OECD 403, 412, 413) [2] richiedono un costante controllo dei parametri di esposizione (flusso dinamico, misura delle particelle, concentrazione reale della sostanza di saggio). Ne consegue che, oltre all'addestramento degli operatori, è necessaria la disponibilità di un'attrezzatura adeguatamente calibrata e funzionante.

### **Nuovi studi, nuovi punti critici: l'esempio della identificazione degli effetti endocrini**

L'emergere di nuovi problemi nella valutazione di sicurezza delle sostanze chimiche porta alla elaborazione di nuove tipologie di studi e linee guida in risposta alle modificate esigenze regolatorie. L'aggiornamento in tale senso è importante sia per i ricercatori dei CdS che per gli ispettori: infatti, i nuovi saggi possono avere requisiti specifici dal punto di vista della applicabilità dei principi di BPL, che occorrerà preventivamente identificare. Tra i numerosi, possibili esempi di sviluppi in corso in campo tossicologico qui viene illustrato quello dello studio di effetti endocrini, per l'attualità e la rilevanza sanitaria ed ambientale del problema.

Gli *endocrine disruptors* (ED) sono un insieme eterogeneo di sostanze (contaminanti alogenati persistenti come le diossine, svariati pesticidi, biocidi e composti industriali) caratterizzate dalla capacità (identificata prevalentemente su sistemi sperimentali) di interferire con il funzionamento del sistema endocrino ed, in particolare, con gli steroidi sessuali e con la tiroide [4]. Le agenzie internazionali stanno segnalando con crescente attenzione le ricadute sanitarie delle esposizioni agli ED, specialmente riguardo alla riproduzione e allo sviluppo pre- e postnatale riconosciuti come le fasi biologiche più vulnerabili [5, 6]. Un problema importante per la valutazione del rischio è la eterogeneità degli ED dal punto di vista dei meccanismi di azione e quindi della identificazione di un ampio spettro di possibili effetti, soprattutto a lungo termine (ad esempio, disturbi della fertilità nell'organismo adulto in seguito a trattamenti nelle fasi intrauterina e/o neonatale). Per contro, gli attuali saggi tossicologici non assicurano un'adeguata identificazione degli svariati e molteplici effetti degli ED. L'approntamento di adeguate strategie di studio, in primo luogo per la *hazard identification* viene affrontato a livello OECD nel *Joint NCA/RAAB Working group on endocrine disruptors testing and assessment* con i seguenti obiettivi [7]:

1) identificazione di specifiche attività endocrine, per mirare successivi studi a lungo termine. Ciò include tanto la validazione di nuovi saggi (*uterotrophic test* per gli effetti estrogenici ed antiestrogenici, *Hershberger test* per gli effetti androgenici ed antiandrogenici) [8, 9], quanto la revisione del protocollo dello studio sul ratto a 28 giorni (linea guida OECD 407) [10];

2) la revisione del protocollo dello studio a due generazioni (linea guida OECD 416) [3]. Opportunamente aggiornato ed integrato, questo protocollo rappresenterà lo strumento migliore per lo studio degli effetti di ED sullo sviluppo pre- e postnatale fino alla maturità sessuale.

L'elaborazione, prevista per l'imminente futuro, di linee guida per saggi che dovranno essere applicati su larga scala richiederà attenzione a punti critici per la qualità specifici per questi tipi di prove. L'elenco che segue è un riassunto, certo non completo, di tali potenziali punti critici:

- necessità di caratterizzare in maniera adeguata i ceppi di animali utilizzati dal punto di vista dei parametri dello sviluppo e delle funzionalità endocrine e riproduttive. Ove possibile, sarà di estrema utilità la messa a punto di serie di dati storici per i ceppi utilizzati dai singoli CdS;

- opportunità, data la delicatezza di alcuni parametri (fertilità, ciclo estrale, sviluppo comportamentale e riproduttivo), di un elevato livello di attenzione verso tutti quei fattori ambientali (luce, rumore, alimentazione, manipolazione) che nello stabulario possono essere fonte di disagio per gli animali e possono pertanto alterare i risultati sperimentali;

- indispensabilità, in particolare, di un controllo della composizione della dieta, soprattutto riguardo al contenuto di fitoestrogeni ed altri composti naturali ad azione ormonale od antiormonale. Pertanto, i CdS dovranno richiedere certificati alle ditte produttrici di mangimi e, ove necessario, dovranno essere in grado di eseguire tali controlli in proprio;

- rilevazione, come richiesto dalla revisione delle linee guida 407 e 416, di svariati parametri aggiuntivi, specifici per gli effetti endocrini. Esempi a questo proposito sono la misurazione di livelli plasmatici ormonali e dei parametri seminologici (concentrazione, motilità, morfologia degli spermatozoi). Tali parametri, oltre ad un addestramento *ad hoc* degli operatori, richiedono la presenza di valide POS e la disponibilità da parte del CdS di attrezzature calibrate ed in piena efficienza;

- possibilità, come richiesto da taluni protocolli di somministrazione parenterale ad animali immaturi (*uterotrophic test*) o pretrattamenti chirurgici (*Hershberger test* su animali adulti castrati) [8, 9]. Sarà indispensabile che il CdS organizzi queste manipolazioni sperimentali in maniera tale da minimizzare le sofferenze per gli animali e da garantire la precisione dei risultati sperimentali. Anche in questo caso sarà fondamentale curare sia l'addestramento degli operatori che la disponibilità di strutture adeguate.

## Conclusioni

La valutazione delle singole deviazioni e, ancor di più, l'integrazione delle singole deviazioni in una valutazione complessiva delle prestazioni del CdS sono sicuramente una delle attività più importanti della pratica ispettiva per la verifica dell'applicazione dei principi di BPL. Tuttavia, questa è anche una delle attività meno facilmente codificabili in una linea guida. L'impostazione migliore appare essere quella di una valutazione caso per caso, nè può essere escluso il rischio di arbitrarietà ed incongruenze che tale comportamento implica. Per tali motivi, la valutazione caso per caso deve essere guidata da specifici criteri. Va infatti dato particolare rilievo a quelle deviazioni che potrebbero segnalare un'attenzione sostanzialmente inadeguata alla qualità o che potrebbero inficiare la attendibilità scientifica dei dati. Infine, evidenziando deviazioni anche singolarmente non particolarmente importanti, ma tali da segnalare problemi di altra natura, il GI può esercitare una pressione positiva verso la promozione delle qualità da parte del CdS, pur nel più rigoroso rispetto dei rispettivi compiti. Infine, va ricordato che le scienze tossicologiche sono un *work in progress*, i cui sviluppi hanno necessariamente ricadute sulle strategie regolatorie. La elaborazione di linee guida per nuovi saggi comporta quindi la necessità di un costante aggiornamento culturale e tecnico da parte tanto dei ricercatori dei CdS quanto degli ispettori.

## Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato effettuato nell'ambito del progetto per la ricerca finalizzata (art.12, DL.vo 502/92) *Esposizione umana a xenobiotici con potenziale attività endocrina: valutazione del rischio per la riproduzione e per l'età evolutiva*.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 13 novembre 2001.

## BIBLIOGRAFIA

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring*. Paris: OECD. ([http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem\(98\)17](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem(98)17)).
2. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Testing guidelines. Section 4. Health effects*. Paris: OECD. (<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-14-no-no-6775-0,FF.html>).
3. Lamb JC, Brown SM. Chemical testing strategies for predicting health hazards to children. *Reprod Toxicol* 2000;14:83-94.
4. Neubert D. Vulnerability of the endocrine system to xenobiotic influence. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26:9-29.
5. Mantovani A, Stazi AV, Maranghi F, Macrì C, Ricciardi C. Problems in testing and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere* 1999;39:1293-300.

6. Pryor JL, Hughes C, Foster W, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect* 2000;108(suppl. 3):491-503.
7. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Endocrine disrupter testing and assessment programme*. Paris: OECD. (<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-14-no-24-6685-0,FF.html>).
8. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspect* 2001;109:785-94.
9. Yamada T, Sunami O, Kunimatsu T, Kamita Y, Okuno Y, Seki T, Nakatsuka I, Matsuo M. Dissection and weighing of accessory sex glands after formalin fixation, and a 5-day assay using young mature rats are reliable and feasible in the Hershberger assay. *Toxicology* 2001;162:103-19.
10. Andrews P, Freyberger A, Hartmann E, Eiben R, Loof I, Schmidt U, Temerowski M, Becka M. Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide. *Arch Toxicol* 2001;75:65-73.