SPECIFICHE E CHIARIMENTI A SUPPORTO DELLA CLASSIFICAZIONE DEL RISCHIO PER CELLULE ANIMALI

(SIA LINEE CELLULARI CHE CELLULE PRIMARIE)

Campo normativo di riferimento

L'utilizzo degli agenti biologici in laboratorio è normato nel TITOLO X - ESPOSIZIONE AD AGENTI BIOLOGICI (D.Lgs. 09 aprile 2008 n. 81), che disciplina tutte le attività lavorative nelle quali vi è rischio di esposizione ad agenti biologici, incluse le cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie).

Per quanto concerne microrganismi geneticamente modificati (sia che si applichi l'impiego confinato o l'emissione deliberata nell'ambiente), restano ferme le disposizioni particolari di recepimento delle norme comunitarie (Direttiva 2009/41/CE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati, e DECRETO LEGISLATIVO 12 aprile 2001, n. 206 Attuazione della direttiva 98/81/CE).

Per tanto, si specifica che le cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie) che non sono intenzionalmente infettate da agenti patogeni o che non sono geneticamente modificate, esulano dall'ambito di applicazione delle disposizioni normative dei MOGM, ma devono essere eseguite nel rispetto della normativa vigente per gli agenti Biologici e loro rispettiva classificazione di rischio biologico.

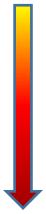
Raccomandazioni generali sulla biosicurezza nell'utilizzo di cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie)

Dal punto di vista della patogenicità per l'uomo, più è stretta la relazione genetica delle cellule coltivate con l'uomo, maggiore è il rischio per gli operatori.

Le cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie) richiedono condizioni di crescita molto stringenti e risultano particolarmente sensibili alla deidratazione e all'irradiazione da ultravioletti, pertanto la capacità di sopravvivenza e di riproduzione nell'ambiente sono praticamente nulle ad eccezione di un inoculo accidentale in un organismo compatibile.

Il rischio per l'operatore derivante da un inoculo accidentale, dipende, quindi, dalla specie di provenienza delle cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie) e dalle proprietà intrinseche della linea; in ogni caso, è estremamente difficile che, in soggetti sani, cellule non appartenenti allo stesso individuo, quindi non istocompatibili, possano sopravvivere e replicarsi, ad eccezione (forse) di alcune tipi di cellule tumorali.

*Proprietà intrinseche delle cellule e rischio correlato (il rischio aumenta procedendo in tabella dall'alto verso il basso) (*PAUWELS K., *2006).*



Fonte (specie di origine)	Tipo cellulare o tessuto	Tipo di coltura
Cellule di uccelli o invertebrati	Cellule epiteliali e fibroblasti	Linee cellulari ben caratterizzate
Cellule di mammifero (non primati)	Mucosa intestinale	Linee cellulari continue
Cellule di primati non umani	Endotelio	Cellule primarie
Cellule umane	Cellule neuronali Cellule ematopoietiche	

Tabella 1: Proprietà intrinseche delle cellule e rischio correlato, in cui si vede come il ***rischio aumenta procedendo nella tabella dall'alto verso il basso****. (Pauwels K., 2006)*

Nella valutazione del rischio, è importante, inoltre, menzionare che ogni linea cellulare in coltura originata da un organismo primate o meno, ed esposta a reagenti di origine animale (es. FBS, citochine, tripsina, ecc) può essere potenzialmente infetta da agenti patogeni contaminanti accidentali. Per tanto, la classe di rischio biologico deve tener conto se la cellula animale (sia linee cellulari che cellule primarie) stessa:

- è stata ben caratterizzata o proveniente da sorgenti cellulari controllate, come animali non infetti da specifici agenti patogeni, nel caso di colture di cellule primarie. Se non sono disponibili linee cellulari libere da patogeni e/o ben caratterizzate, i test per il rilevamento di probabili agenti contaminanti devono risultare negativi;
- è coltivata mediante l'uso di fonti di media esenti da qualsiasi forma di contaminazione batterica, virale o fungina (terreni "sterili", da verificare, in caso di dubbi, con prove di sterilità);
- è coltivata mediante l'uso di adeguate misure di contenimento per ridurre il rischio di contaminazione durante le operazioni di prelievo del campione o la successiva manipolazione delle cellule (aggiunta o sostituzione di terreno di coltura, centrifugazione, lavaggio).

Se è noto che le cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie) ospitano un agente e un virus eziologico infettivo, le misure di contenimento devono coincidere con quelle previste per l'agente eziologico in questione.

Raccomandazioni sulla biosicurezza e misure di contenimento per le cellule animali geneticamente modificate (MOGM)

Nella **valutazione dei rischi** per la salute e l'ambiente, per l'impiego confinato di un **MOGM,** è necessario prendere in considerazione sia la classificazione del rischio della cellula ricevente che quella dell'organismo donatore così come da direttiva vigente.

Nel caso di impiego confinato di **cellule animali (sia linee cellulari che cellule primarie) geneticamente modificate**, qualora a seguito della valutazione del rischio del MOGM si ritenga che la modificazione introdotta non abbia cambiato la classe di rischio della cellula ricevente, la classe di rischio finale del MOGM dipenderà dalla classe di rischio della linea cellulare utilizzata.

Un esempio di quanto su menzionato, è rappresentato da una cellula ricevente di classe di rischio 1 che è infettata con un vettore virale non replicativo di classe 2, il cui impiego confinato dovrà essere effettuato in classe 2. Dopo l'infezione nella cellula ricevente, il vettore non è più in grado di replicare, per tanto la classe di rischio del MOGM è classe 1.

Se invece la cellula ricevente è una producer di vettore, che ha una classificazione di rischio 2, dopo essere stata infettata con il vettore virale non replicativo di classe 2, il MOGM conserva la classificazione di classe 2.

Sulla base di queste premesse, qualora la modificazione genetica non modifichi la classe di rischio e la natura, tipo ed entità delle operazioni non ne aumentino il rischio, la Commissione suggerisce quanto segue:

Tipologia cellule	**Origine umana o primate**	**Caratterizzate e/o certificate****	**Libere da patogeni o agenti infettanti**	**Classe di rischio**	**Livello di contenimento**
Linea cellulare (stabile o continua	No	Sì/No	Sì	1	1
		Sì/No	No	Classe Patogeno	Classe Patogeno
	Sì	Sì	Sì	1*	2
		Sì	No	Classe Patogeno	Classe Patogeno
		No	Sì	2	2
		No	No	Classe Patogeno	Classe Patogeno
Colture primarie	No	Sì/No	Sì	1	1
		Sì/No	No	Classe Patogeno	Patogeno
	Sì	Sì/No	Sì	2	2
		Sì/No	No	Classe Patogeno	Classe Patogeno

**Salvo diversa indicazione della certificazione.*

*** <u>Caratterizzate</u>: Le linee cellulari/Colture cellulari ben caratterizzate presentano i rischi più bassi rispetto alle colture primarie o linee cellulari meno caratterizzate poiché l'origine, la fonte e l'idoneità sono ben note e ben definite.*

<u>Certificate</u>: Quando le cellule o i tessuti utilizzati in laboratorio provengono da una fonte certificata, come una banca cellulare nota commerciale, certificata e riconosciuta a livello internazionale (ad esempio, la DSMZ tedesca o l'ATCC americana), la documentazione fornita a corredo delle cellule (Product Sheet, riportante le informazioni generali sull'origine delle cellule, sulle condizioni di coltura, il livello di biosicurezza richiesto per la manipolazione, il cariotipo, il tempo di duplicazione e l'espressione antigenica; Material Safety Data Sheet, riportante informazioni sulla sicurezza nell'utilizzo di tali cellule; il certificato di analisi, riportante i risultati dei controlli di qualità effettuati sulle cellule, inclusi test microbiologici) fornisce elementi sufficienti ai fini della valutazione del rischio.

Inoltre, nella valutazione del rischio è necessario tener conto del tipo di manipolazione che si intende effettuare.

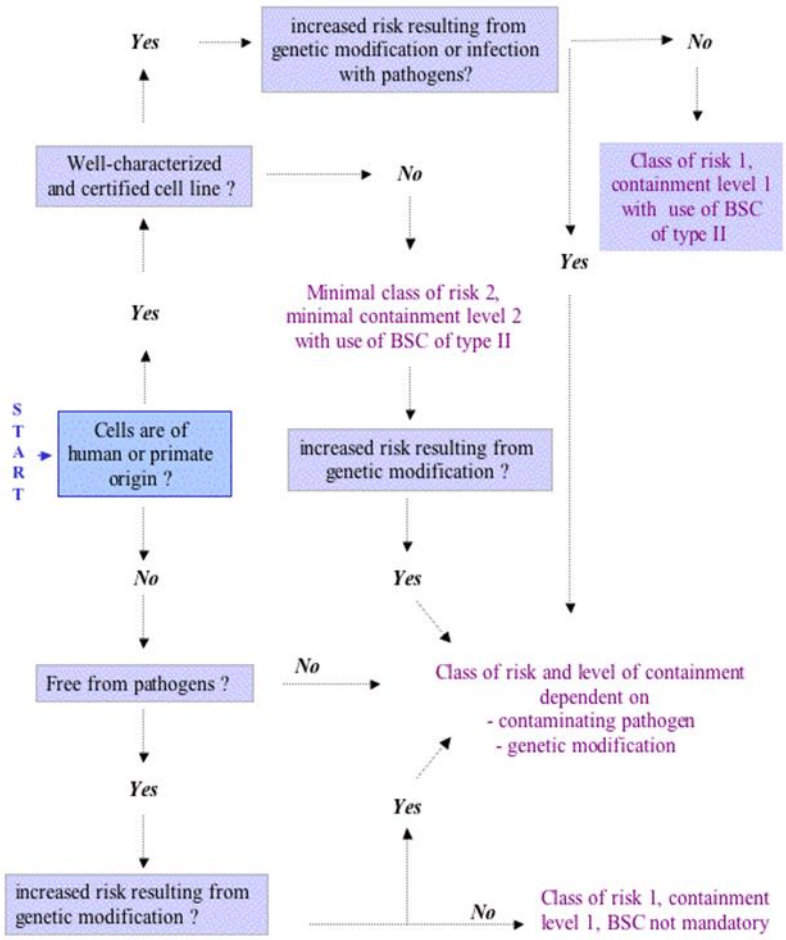


Figura 1: BSC tipo II = cappa di biosicurezza di tipo 2. Contrariamente a una cappa di biosicurezza di classe I, che protegge solo l'operatore e l'ambiente, l'uso di una cappa di biosicurezza di classe II mira a proteggere l'operatore, l'ambiente e la coltura cellulare, e soprattutto è importante per prevenire la contaminazione delle colture cellulari. In considerazione di ciò, le colture cellulari animali non dovrebbero mai essere manipolate in una cappa di biosicurezza con flusso d'aria laminare orizzontale, ovvero di classe I.

https://www.biosafety.be/content/contained-use-animal-cell-cultures-risk-assessment-and-biosafety-recommendations

Conclusioni

L'assegnazione di requisiti di contenimento adeguati non può essere generalizzata per un numero così alto di linee cellulari, ma varia a seconda dei casi e deve basarsi su un'accurata valutazione del rischio (secondo l'Allegato III del Dlgs 206/01), comprendente anche le considerazioni sulle proprietà intrinseche delle cellule (es. le proprietà ricombinanti), la potenziale contaminazione con agenti patogeni e il tipo di manipolazione. Gli agenti contaminanti accidentali costituiscono probabilmente il principale pericolo associato alla manipolazione delle colture cellulari poiché sono spesso difficili da rilevare e quindi meno verificabili.