



PROCEDURE PER L'UTILIZZO DEI MOGM

Dott.ssa Lucrezia Guida

INDICE DEGLI ARGOMENTI

Normativa	2
D.L. 206/2001	2
Notifiche per l'uso dei MOGM	4
Autorizzazioni	5
Obblighi dell'utilizzatore	5
Modello di scheda di registrazione di MOGM di classe 1	6
Incombenze per l'applicazione del D.L. 206/2001	6
Valutazione del Rischio per l'impiego confinato di MOGM	7
Principi da seguire per la valutazione del rischio (All. III del D.Lgs. 206/2001)	7
Considerazioni sulla valutazione del rischio per i MOGM	9
Misure di contenimento	10
Laboratori per impiego di MOGM confinati di classe 1	10
Laboratori per impiego di MOGM confinati di classe 2	10
Misure di contenimento e altre misure di protezione (All. IV del D.Lgs. 206/2001)	11
Modulistica	17
Schemi riassuntivi	17
<u>Normativa</u>	

L'impiego confinato e l'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati sono oggetto di specifiche disposizioni legislative.

La normativa in materia di **impiego confinato** di microrganismi geneticamente modificati è stata aggiornata col **D.Lgs. 12 aprile 2001, n. 206**, "Attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati" (G.U. 1 giugno 2001, n. 126) e con le relative:

- 1) **norme applicative** contenute nel **D.M. 2 maggio 2001**, "Tariffe relative alle notifiche per l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati" (G.U. 5 giugno 2001, n. 128)
- 2) **note orientative** descritte nel **D.M. 25 settembre 2006**, "Note orientative per la valutazione del rischio di cui all'allegato III della direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato dei MOGM.
- 3) **note orientative** descritte nel **D.M. 13 gennaio 2006** "Note orientative ad integrazione dell'allegato II parte B del D.L. 206/2001 (G.U. 4 aprile 2006, n. 92).

D.Lgs. 12 aprile 2001, n. 206

Un microrganismo geneticamente modificato (MOGM) secondo il D.L. 206/01 è un microrganismo (entità microbiologica cellulare e non cellulare, capace di replicarsi o trasferire materiale genetico, compresi virus, viroidi, cellule animali e vegetali in coltura) il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura, per incrocio o ricombinazione naturale.

Sono considerate tecniche di modificazione genetica non naturali:

- Tecniche di ricombinazione di acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo diverso da un organismo, in un virus, in un plasmide batterico o in altro sistema vettore e il loro inserimento in un organismo ospite nel quale non si presentano in natura ma nel quale sono in grado di moltiplicarsi in maniera continuativa.
- Tecniche che ricorrono all'introduzione diretta in un microrganismo di materiale ereditabile preparato al di fuori dello stesso, comprese la microinoculazione, la macroinoculazione e la microincapsulazione.
- Tecniche di fusione cellulare o di ibridazione che producono cellule vive con nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile mediante la fusione di due o più cellule con metodi non presenti in natura.

Non sono considerate tecniche che hanno per effetto una modificazione genetica:

- fecondazione in vitro,
- traduzione, trasformazione, coniugazione
- induzione della poliploidia

Per creare un microrganismo geneticamente modificato tramite le tecniche di ricombinazione di acido nucleico è necessario:

- 1) un microrganismo donatore, dal quale viene prelevato un gene d'interesse (codificante la proteina che si vuole esprimere)
- 2) un microrganismo ricevente, in cui viene inserito il gene d'interesse che gli conferisce una nuova funzione, trasformandolo così in un MOGM.
- 3) un vettore, che permette il trasferimento del gene d'interesse dal donatore all'ospite.

I vettori sono elementi di DNA capaci di replicazione autonoma (plasmidi, virus, batteriofagi) nei quali si può facilmente inserire del DNA estraneo (detto inserto). L'inserto solitamente è costituito dal gene d'interesse e da un gene che conferisce un carattere fenotipico particolare alle cellule ospiti che infine esprimono la proteina desiderata (es.

resistenza agli antibiotici).

I vettori utilizzati nei laboratori di ricerca biotecnologica sono molteplici, qualsiasi elenco risulterebbe quindi incompleto per questo la normativa classifica i microrganismi geneticamente modificati in base all'impiego confinato previsto.

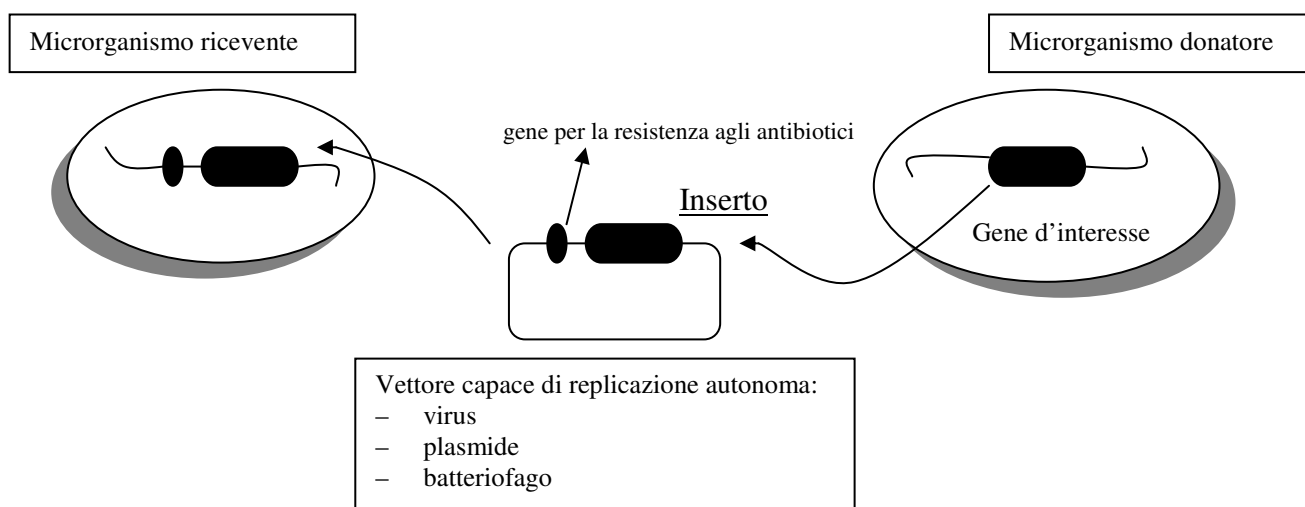


Figura 2. Rappresentazione schematica della tecnica di ricombinazione di acido nucleico. Il microrganismo ricevente diventa un MOGM con una nuova funzione fisiologica. Tale funzione gli viene conferita dal gene che viene prelevato dal microrganismo donatore e trasferito per mezzo di un vettore al microrganismo ricevente.

DEROGHE (Art.3)

Il D.Lgs 206/2001 non si applica:

- a) se la modificazione genetica è ottenuta con l'impiego di tecniche e metodologie indicate nell'allegato II parte a:
 1. Mutagenesi
 2. Fusione cellulare di specie procariotiche che scambiano materiale genetico mediante processi fisiologici noti
 3. Fusione cellulare di cellule di qualsiasi specie eucariota, compresa la produzione di ibridomi e la fusione di cellule vegetali autoclonaione
- b) agli impieghi di MOGM elencati nell'allegato II parte C e che soddisfano i criteri specificati nello stesso allegato (parte B) che sono stati individuati successivamente nel Decreto Ministeriale del 13 gennaio 2006. Tutti i MOGM inclusi nell'allegato II parte C sono pubblicati nella Gazzetta Ufficiale insieme alle caratteristiche identificative o alle pertinenti fonti di riferimento. Nel Decreto Ministeriale del 13 gennaio 2006 vengono riportati alcuni esempi di ceppi riceventi o parentali per la produzione di MOGM in grado di soddisfare i criteri per l'inclusione nell'allegato II parte C:
 - derivati di ceppi batterici resi sufficientemente inattivi quali *Escherichia coli* K12 e *Staphylococcus aureus* 83254, la cui crescita e sopravvivenza dipendono dall'aggiunta di nutrienti non presenti nelcorpo umano o nell'ambiente esterno al mezzo di coltura.
 - i sistemi di coltura di cellule e tessuti eucariotici (vegetali e animali, compresi i mammiferi) possono essere considerati come ospiti resi sufficientemente inattivi. Devono soddisfare ovviamente gli altri criteri indicati nel decreto (assenza di agenti avventizi nocivi o di vettori mobilizzabili)
 - organismi ospiti quali: batteri lattici, rizobatteri, termofili estremi, batteri o funghi produttori di antibiotici. Deve trattarsi di microrganismi le cui caratteristiche genetiche e molecolari sono ben note e documentate.

IMPIEGO CONFINATO

Per impiego confinato s'intende ogni attività nella quale i microrganismi vengono modificati geneticamente o vengono messi in coltura, conservati, utilizzati, trasportati, distrutti, smaltiti e per la quale vengono usate misure specifiche di contenimento al fine di limitare il contatto degli stessi con la popolazione o con l'ambiente.

Nell'impiego confinato dei MOGM devono essere adottate tutte le misure necessarie ad evitare effetti negativi sull'uomo e sull'ambiente (art.5,comma1). L' utilizzatore deve procedere alla valutazione dell'impiego confinato al fine di evitare i rischi per la salute umana e per l'ambiente che tale impiego potrebbe comportare (art.5,comma 2). Dopodiché l'utilizzatore assegna l'impiego confinato ad una delle 4 classi sottoelencate applicando il relativo livello di contenimento. Sono previste 4 classi d'impiego (in analogia con i gruppi di rischio 1-4 previsti dal D.L.626/94) definite sulla base del livello di contenimento necessaria a proteggere la salute umana e l'ambiente dai possibili rischi connessi all'uso di quel particolare microrganismo geneticamente modificato:

classe 1: impieghi confinati che presentano rischi nulli o trascurabili, ovvero operazioni per le quali un livello 1 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

classe 2: impieghi confinati a basso rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 2 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

classe 3: impieghi confinati che presentano un rischio moderato, ovvero operazioni per le quali un livello 3 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

classe 4: impieghi confinati ad alto rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 4 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

Notifiche da presentare per l'uso dei MOGM

Chiunque intenda manipolare microrganismi geneticamente modificati (per uso confinato) deve presentare al Ministero della Sanità due notifiche:

- 1) **notifica d'impianto**, che contiene informazioni relative all'impianto, ed è presentata dal titolare dell'impianto (datore di lavoro ai sensi del D.L.626/94 – Rettore per l'Università)
- 2) **notifica d'impiego**, che contiene indicazioni sul microrganismo ricevente, sull'ospite, sull' inserto e sul vettore. Tale notifica è presentata dall'utilizzatore (responsabile scientifico e gestionale dell'impianto) a cui compete la valutazione e la conseguente assegnazione dell'impiego confinato a una delle 4 classi, ed è vistata dal titolare dell'impianto.

In ordine di tempo, la prima notifica da presentare sarà quella relativa all'impianto, per la quale potrà essere utilizzato l'apposito modulo reperibile sul sito web del Ministero della Salute. La notifica dovrà essere firmata e presentata al Ministero della Sanità dal titolare dell'impianto. Essa contiene le informazioni relative all'impianto, come specificato nella parte A dell'allegato V al D. L. 206/01. Non contiene informazioni relative ai MOGM, che saranno contenute nelle notifiche di impiego, obbligatorie per impieghi di classe 2, 3 o 4. Solo per impieghi di classe 1, per i quali non è prevista ulteriore notifica, la notifica di impianto conterrà un riepilogo della valutazione di cui sopra, oltre ad informazioni sulla gestione dei rifiuti. Per tutti gli impieghi, inclusi quelli di classe 1, i documenti di valutazione completi saranno conservati presso l'impianto.

E' responsabilità del titolare dell'impianto informare il Ministero della sanità circa qualsiasi modifica delle informazioni contenute nella notifica di impianto, in modo che il relativo fascicolo esistente presso il Ministero risulti costantemente aggiornato. Fatti salvi gli aggiornamenti successivi, la notifica di impianto viene eseguita una sola volta, prima del primo impiego. Modifiche sostanziali dell'impianto richiederanno comunque la presentazione di una nuova notifica.

Per impianti destinati esclusivamente ad impieghi di classe 1 vige un regime di silenzio/assenso con un termine di 45 giorni, trascorsi i quali, in assenza di indicazioni contrarie, gli impieghi di classe 1 possono iniziare. Per gli impianti destinati ad impieghi di classi superiori è necessaria una esplicita autorizzazione scritta da parte del Ministero della sanità, con i termini indicati nell'art. 7. Tali termini decorrono dalla data di ricevimento, da parte del Ministero della sanità, della notifica di impianto completa di attestato di pagamento della relativa tariffa e si intendono sospesi durante i periodi in cui il Ministero è in attesa di ulteriori informazioni eventualmente richieste. Nel caso di impianti destinati ad impieghi di classe 4 è prevista (art. II, commi 6 e 7) una procedura che mette in grado la popolazione interessata di esprimere preventivamente il proprio parere in merito alla richiesta di autorizzazione all'impianto.

La notifica di impiego di un determinato MOGM (con indicazione del microrganismo ricevente o -ospite-, del tipo di inserto e dell'eventuale vettore utilizzato) viene presentata dall'utilizzatore, figura da identificarsi con il responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato. Si potrà trattare, ad esempio, del ricercatore che coordina l'attività di ricerca con il MOGM in questione (o analoga figura in campo industriale). E' a lui che compete la valutazione e la conseguente assegnazione dell'impiego confinato ad una delle 4 classi. La notifica, per l'inoltro della quale al Ministero della sanità si potrà utilizzare uno dei moduli reperibili sul sito web; dovrà essere vistata dal titolare dell'impianto, cui essa viene consegnata in copia, unitamente al documento di valutazione di cui sopra.

I moduli sono concepiti in modo da poter essere utilizzati per impieghi tra loro assai diversi, e non tutti i punti in essi contenuti si adatteranno ai singoli casi.

Nel caso di impieghi di laboratorio implicanti MOGM disegnati per terapia genica, nei formulari si dovrà indicare la linea di packaging utilizzata come ricevente, il vettore virale (o il plasmide), se utilizzato, ed il gene terapeutico inserito. Per gli impieghi clinici di tali MOGM è stato predisposto un modulo separato.

Autorizzazioni

Per quanto riguarda le autorizzazioni, solo per impieghi di classe 2 è previsto un regime di silenzio/assenso, con termine di 60 giorni. Se però sono già stati autorizzati presso lo stesso impianto impieghi di classe più elevata, gli impieghi di classe 2 possono iniziare subito dopo la notifica. Impieghi di classe 3 e 4 devono comunque attendere esplicita autorizzazione scritta, che il Ministero della sanità rilascerà entro 60 o 90 giorni, a seconda che presso l'impianto in cui si intende eseguirli siano già stati autorizzati o meno impieghi della stessa classe o di una classe superiore. Tutti i termini temporali decorrono dalla data di ricevimento, da parte del Ministero della sanità, della notifica di impiego completa di attestato di pagamento della relativa tariffa e si intendono sospesi durante i periodi in cui il Ministero è in attesa di ulteriori informazioni eventualmente richieste.

Obblighi dell'utilizzatore

Per tutta la durata dell'impiego confinato, è responsabilità dell'utilizzatore (art 6, comma 1, lettera a) assicurarsi che siano pienamente applicate le misure di contenimento e le altre misure di protezione specificate in allegato IV per la classe assegnata all'impiego confinato, nonché conservare i quaderni (o i file) in cui vengono registrate le operazioni eseguite (art. 6, comma 1, lettera b).

L'utilizzatore dovrà inoltre riesaminare periodicamente (annualmente per impieghi di classe 3 e 4, almeno ogni 3 anni per impieghi di classe 1 e 2) la valutazione della classe di impiego e redigere un documento di riesame che dovrà essere consegnato al titolare dell'impianto. Altrettanto avviene nelle occasioni indicate all'art. 6, comma 2. Per impieghi di classe 3 e 4, l'utilizzatore dovrà inviare al Ministero della sanità una relazione in proposito con cadenza annuale.

Come persona che segue il lavoro quotidiano e che è in grado di valutare le conseguenze di un eventuale rilascio accidentale di MOGM, al verificarsi di un incidente spetta all'utilizzatore informare immediatamente, per iscritto, il

Ministero della sanità (art. 16, comma 1). La comunicazione va estesa alle altre Autorità indicate nel medesimo comma nel caso in cui, in conseguenza dell'incidente, si verifichi un rilascio di MOGM al di fuori della zona utilizzata per l'impiego confinato.

Riassumendo:

Il notificante (titolare, per l'impianto e, utilizzatore, per l'impiego) deve valutare quali siano le misure di contenimento minime adeguate al caso, scegliendole tra quelle indicate nel decreto per i 4 progressivi livelli. In particolare:

Il titolare dell'impianto

- informa il ministero della Sanità su eventuali modifiche apportate all'impianto e, se sono sostanziali, deve provvedere a presentare una nuova notifica.

L'utilizzatore deve:

- Assicurarsi che per tutta la durata dell'impiego confinato siano impiegate le misure di contenimento e di protezione specifiche
- Conservare i quaderni (o i file) in cui sono registrate le operazioni eseguite
- Riesaminare periodicamente (annualmente per gli impieghi di classe 3 e 4, almeno ogni 3 anni per gli impieghi di classe 1 e 2) la valutazione della classe d'impiego
- Redigere un documento di riesame che dovrà essere consegnato al titolare dell'impianto
- Al verificarsi di un incidente, informare immediatamente per iscritto il Ministero della sanità .

Incombenze per l'applicazione del D.L. 206/2001 (uso confinato di microrganismi geneticamente modificati)

Articolo	Incombenza	Uso confinato
5	Valutazione del rischio per impiego confinato	Sempre
6 (comma 1a)	Misure di contenimento	Sempre
(comma 1b)	Registrazione delle operazioni eseguite	Sempre
(comma 2)	Riesame della valutazione del rischio	Classe 1-2 (ogni 3 anni) Classe 3-4 (annuale)
	Comunicazioni variazioni al Ministero	Sempre (immediato)
7	Notifica d'impianto al Ministero della Sanità	Sempre
9	Notifica d'impiego dei microrganismi geneticamente modificati al Ministero della Sanità	Classe 2 (a)
10	Notifica d'impiego dei microrganismi geneticamente modificati al Ministero della Sanità	Classe 3-4
16	Comunicazioni in caso d'incidente	Sempre (immediato)

N.B. I numeri si riferiscono alle classi di pericolosità dei microrganismi geneticamente modificati indicate nel D.L. 206/2001

- (a) per la classe 1 è previsto che nella notifica d'impianto venga anche effettuata una sintetica descrizione del tipo d'impiego che s'intende compiere, senza presentare ulteriore notifica.

Modello di scheda di registrazione di MOGM di classe 1

DATA		SIGLA MOGM		Pag. N°
RICEVENTE	Tipo di modificazione genetica apportata	Origine e caratteristiche del Materiale genetico clonato	MOGM ottenuto da altro laboratorio	
Nome scientifico del ceppo batterico	Delezione..... Inserzione..... Mutagenesi Mirata	Donatore nome scientifico genomico..... provenienza	Data Laboratorio.....	
Nome scientifico del ceppo virale	Altro.....	Materiale genetico di partenza DNA genomico CDNA cDNA da tessuto Altro		
Origine animale/vegetale	Tipo di vettore (sigla) di espressione si no	Ristretto con		
Marcatori	Riferimento bibliografico	Metodo di selezione del clone Lunghezza inserto		
Eventuali modificazioni genetiche precedenti	Siti d'inserzione	Siti di restrizione per il recupero dell'inserto Descrizione delle sequenze contenute nell'inserto		
Luogo di conservazione del MOGM.....		Fenotipo espresso dal MOGM		

Valutazione del Rischio per l'impiego confinato di MOGM

Gli esperimenti che coinvolgono la creazione o l'uso di MOGM dovrebbero essere condotti dopo aver effettuato una valutazione del rischio biologico. Le proprietà patogenetiche e i potenziali rischi associati con tali organismi possono essere insoliti e non ben caratterizzati. Dovrebbero essere valutate le proprietà dell'organismo donatore, la natura della sequenza del DNA che verrà trasferito, le proprietà dell'organismo ricevente e le caratteristiche dell'ambiente. Questi fattori dovrebbero aiutare a stabilire il livello di biosicurezza richiesto per la manipolazione sicura del MOGM risultante e identificare i sistemi di contenimento biologico e fisico che dovrebbero essere usati.

Nel D.L. 206/01 e note orientative del Decreto Ministeriale del 25/9/2001 e del Decreto Ministeriale del 13/1/2006 vengono delineate le linee guida per effettuare la suddetta valutazione del rischio che va argomentata per iscritto e conservata presso l'impianto.

Principi da seguire per la valutazione del rischio (Allegato III del D.Lgs. 206/2001)

A. Elementi di valutazione

1. Sono considerati effetti potenzialmente nocivi:

- le affezioni degli esseri umani, inclusi gli effetti tossici o allergici;
- le malattie degli animali o delle piante;
- gli effetti negativi dovuti all'impossibilita' di curare la malattia o di predisporre un'efficace profilassi;
- gli effetti negativi dovuti alla colonizzazione o alla diffusione nell'ambiente;
- gli effetti negativi dovuti al trasferimento per via naturale ad altri organismi del materiale genetico inserito.

2. La valutazione di cui all'articolo 5, comma 2, si deve basare sui seguenti elementi:

a) l'individuazione di tutti gli effetti potenzialmente nocivi dell'impiego confinato, in particolare quelli associati con:

- 1) il microrganismo ricevente;
- 2) il materiale genetico inserito (proveniente dall'organismo donatore);
- 3) il vettore;
- 4) il microrganismo donatore (qualora esso intervenga nell'operazione);
- 5) il MOGM che ne deriva;

b) le caratteristiche dell'impiego confinato;

c) la gravita' degli effetti potenzialmente nocivi;

d) la probabilita' che gli effetti potenzialmente nocivi si realizzino.

B. Procedura

1) La prima fase della procedura di valutazione deve consistere nell'individuare le proprieta' nocive del ricevente e, se del caso, del microrganismo donatore, le eventuali caratteristiche di pericolosita' associate al vettore o al materiale inserito, compresa ogni eventuale alterazione delle proprieta' proprie del ricevente.

2) In generale, devono essere considerati tali da poter rientrare nella classe 1 di cui all'articolo 5 soltanto i MOGM per i quali:

- e' altamente improbabile che il microrganismo ricevente o quello parentale provochino malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante (Si dovrebbe applicare solo agli animali ed alle piante presenti nell'ambiente potenzialmente esposto.);
- la natura del vettore e dell'inserito e' tale da non conferire al MOGM un fenotipo in grado di provocare malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante (1), o di avere effetti nocivi sull'ambiente;
- e' altamente improbabile che il MOGM provochi malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante (Si dovrebbe applicare solo agli animali ed alle piante presenti nell'ambiente potenzialmente esposto) o abbia effetti nocivi sull'ambiente.

3) Ai fini di rinvenire notizie utili alla procedura di valutazione, l'utilizzatore puo' fare riferimento a normative nazionali e comunitarie pertinenti, in particolare al decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626, e successive modificazioni, ovvero a normative internazionali purché rappresentino il risultato di nuove conoscenze scientifiche o del progresso tecnico nella specifica materia.

Tali normative riguardano principalmente i microrganismi naturali e si basa solitamente sulla capacita' dei microrganismi di provocare malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante e sulla gravita' e trasmissibilita' della malattia che essi sono in grado di provocare. Il decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626, e successive modificazioni, classifica i microrganismi, in quanto agenti biologici, in quattro gruppi di rischio in base ai loro effetti potenziali su un individuo adulto sano. Tali gruppi di rischio possono essere usati dall'utilizzatore come riferimento per

la classificazione delle attività di impiego confinato nelle quattro classi di rischio di cui all'articolo 5, comma 3. Lo stesso può anche prendere in considerazione gli schemi di classificazione che si riferiscono agli agenti patogeni per le piante e per gli animali. Le normative che prevedono schemi di classificazione forniscono solo un'indicazione provvisoria della classe di rischio dell'impiego confinato e delle relative misure di contenimento e di controllo.

4) La prima fase della procedura di valutazione del rischio, eseguita sulla base delle indicazioni di cui ai precedenti paragrafi 1, 2 e 3, dovrebbe consentire l'individuazione del livello di rischio associato al MOGM.

5) Al fine di selezionare le misure di contenimento e le altre misure di protezione, oltre al livello di rischio associato al MOGM, si devono tener presenti:

a) le caratteristiche dell'ambiente potenzialmente esposto ai MOGM (per esempio se in esso siano presenti bioti noti che possano subire effetti nocivi a causa dei microrganismi utilizzati nelle attività di impiego confinato);

b) le caratteristiche dell'impiego confinato (per esempio entità, natura);

c) qualsivoglia operazione particolare o atipica (per esempio inoculazione di MOGM negli animali, impiego di apparecchi potenzialmente generatori di aerosol).

6) Sulla base degli elementi indicati al paragrafo 5, può essere ridotto o incrementato il livello di rischio del MOGM associato all'impiego confinato che si intende effettuare.

7) La valutazione eseguita in conformità alle indicazioni contenute nei precedenti paragrafi deve consentire l'assegnazione dall'impiego confinato ad una delle 4 classi di cui all'articolo 5, comma 3.

Considerazioni sulla valutazione del rischio per i MOGM

Un esempio di sistema di espressione biologica è il plasmide pUC18. Usato comunemente come vettore di clonaggio in combinazione con il ceppo K12 di *Escherchia coli*, il plasmide pUc18 è stato completamente sequenziato. Tutti i geni richiesti per l'espressione in altri batteri sono stati eliminati dal suo plasmide precursore pBR322. L'*E.coli* K12 è un ceppo non patogeno che non può colonizzare in modo permanente l'intestino dell'uomo o dell'animale in buona salute. Esperimenti routinari di ingegneria genetica possono essere eseguiti col sicurezza nel sistema *E.coli* K12/pUC18 al livello 1 di biosicurezza, a meno che i prodotti di espressione del DNA esterno inserito non richiedano livelli di biosicurezza più elevati.

Vettore di espressione e biosicurezza

Livelli di biosicurezza più elevati possono essere richiesti quando:

- l'espressione delle sequenze di DNA derivate da organismi patogeni possono incrementare la virulenza del MOGM;
- le sequenze del DNA inserite non sono ben caratterizzate, ad esempio durante la manipolazione delle librerie del DNA genomico da microrganismi patogeni;
- i prodotti genici possiedono una potenziale attività farmacologica;
- i prodotti genici codificano per tossine.

Vettori virali, come ad esempio adenovirus, sono usati per il trasferimento genico nelle cellule. Vettori di questo tipo mancano di alcuni geni per la manipolazione del virus e vengono propagati in linee cellulari che completano tale difetto. Stock di questi vettori possono essere contaminati con virus ancora capaci di replicarsi generati da rari eventi di ricombinazione spontanea nelle linee cellulari di propagazione, o possono derivare da una insufficiente purificazione. Questi vettori dovrebbero, quindi essere manipolati allo stesso livello di sicurezza dell'adenovirus parentale dal quale derivano.

Animali transgenici. Gli animali che contengono materiale genetico estraneo (animali transgenici) dovrebbero essere manipolati entro livelli di contenimento appropriati alle caratteristiche dei prodotti genici del DNA estraneo. Animali

con delezioni mirate di specifici geni (animali "knock-out") non rappresentano generalmente un particolare rischio biologico.

Esempi di animali transgenici includono animali che esprimono recettori per virus normalmente incapaci d'infettare quella specie. Se tali animali sfuggissero dal laboratorio e trasmettessero il transgene alla popolazione selvaggia, potrebbe essere teoricamente generata una riserva selvaggia di quel particolare virus. Topi transgenici che esprimono il recettore del poliovirus umano generati in diversi laboratori risultano suscettibili all'infezione del poliovirus e la malattia risultante era clinicamente e istopatologicamente simile alla poliomielite umana. Però il modello del topo differisce da quello umano perché la replicazione nel tratto gastrointestinale dei poliovirus somministrati oralmente è insufficiente o non avveniva affatto. Pertanto è molto improbabile che il ritorno alla vita libera di un topo transgenico di questo tipo, possa dare origine ad una nuova riserva animale per il poliovirus. Questo esempio indica comunque per ogni nuova linea di animali transgenici, studi dettagliati dovrebbero essere effettuati al fine di determinare le vie attraverso le quali gli animali possono essere infettati, la quantità d'inoculo richiesta per l'infezione e come il virus viene diffuso dagli animali infettati. Ovviamente dovrebbero essere prese tutte le opportune misure per assicurare uno stretto contenimento dei topi transgenici.

Alcune delle caratteristiche da prendere in considerazione per la valutazione del rischio sono le seguenti:

rischi derivati dal gene inserito (organismo donatore) si hanno se tale gene possiede note proprietà biologiche o farmacologiche che possono produrre effetti dannosi come ad esempio geni per: tossine, citochine, ormoni, regolatori dell'espressione genica, fattori di virulenza, sequenza di geni oncogeni, resistenza agli antibiotici, allergeni.

rischi associati all'ospite ricevente: 1) suscettibilità dell'ospite, patogenicità del ceppo ospite, inclusa virulenza, infettività e produzione di tossine. 2) variazioni di specificità dell'ospite, 3) stato immune del ricevente, 4) conseguenze dell'esposizione.

rischi derivati dall'alterazione di caratteristiche patogeniche esistenti; molte modificazioni coinvolgono geni i cui prodotti non sono di per se dannosi, ma effetti avversi possono derivare come risultato di una alterazione di caratteristiche preesistenti non patogeniche o patogeniche. Modificazioni di un gene normale possono alterare la patogenicità. Nel tentativo d'identificare questi potenziali rischi, devono essere considerati i seguenti punti:

- 1) c'è un aumento dell'infettività o della patogenicità?
- 2) può qualche mutazione disabilitante all'interno dell'ospite essere annullata come risultato dell'inserzione di un gene estraneo?
- 3) il gene estraneo codifica per un determinante patogenico di un altro organismo?
- 4) se il gene estraneo include un determinante patogenico è prevedibile che questo gene possa contribuire alla patogenicità del MOGM?
- 5) è disponibile un trattamento?
- 6) Può la suscettibilità del MOGM agli antibiotici o ad altre forme di terapia essere influenzata come conseguenza della modificazione genetica?
- 7) è disponibile un sistema di eradicazione del MOGM?

MISURE DI CONTENIMENTO

Per i MOGM nel D.L.206/01 (allegato IV) vengono prescritte le misure di contenimento minime per il loro utilizzo che determinano la classe d'impiego confinato del MOGM. Precisamente:

- ◆ Laboratorio di classe 1 per impiego confinato di MOGM di classe 1, con rischio nullo o trascurabile
- ◆ Laboratorio di classe 2 per impiego confinato di MOGM di classe 2, con rischio basso

- ◆ Laboratorio di classe 3 per impiego confinato di MOGM di classe 3, con rischio moderato
- ◆ Laboratorio di classe 4 per impiego confinato di MOGM di classe 4, con rischio elevato

Qui di seguito vengono descritti in dettaglio solo i laboratori di classe 1 e 2 perché sono le due tipologie di laboratori presenti presso l'Università di Genova.

Laboratori per impiego di MOGM confinati di classe 1

Il primo livello non ha particolari esigenze, sia di progettazione che di contenimento del laboratorio

Deve avere:

- ◆ livello di contenimento etichettato con il segnale di rischio biologico
- ◆ Banconi lisci, facili da pulire, impermeabili ai liquidi e resistenti ad agenti chimici e ai disinfettanti.
- ◆ Attrezzature per il lavaggio delle mani
- ◆ Smaltimento dei materiali utilizzati nella manipolazione secondo le procedure d'inattivazione stabilite.

Laboratori per impiego di MOGM confinati di classe 2

Il lavoro microbiologico deve essere condotto in laboratori appropriati allo scopo e il livello di contenimento di ciascun laboratorio deve essere etichettato mediante affissione sulla porta del segnale di pericolo biologico. L'accesso è interdetto al personale non addetto all'utilizzo dei MOGM. Il personale addetto deve essere sottoposto ad una formazione specifica

Caratteristiche di progettazione degli spazi

- ◆ Muri, soffitti e pavimenti devono essere lisci, facili da pulire, impermeabili ai liquidi e resistenti ad agenti chimici e ai disinfettanti.
- ◆ Illuminazione adeguata, evitando riflessi e luce troppo forte.
- ◆ Superfici dei banconi unite ai muri con sostanze sigillanti, resistenti a sostanze chimiche e disinfettanti e impermeabili all'acqua.
- ◆ Presenza di lavabi dotati di acqua corrente.
- ◆ Le porte devono rispondere agli standard antincendio, chiudendosi da se' e avere pannelli di ispezione.
- ◆ Disponibilità di un autoclave nel laboratorio o nello stesso edificio.
- ◆ Un deposito sicuro per i MOGM.
- ◆ Misure specifiche per controllare la diffusione di aerosol.
- ◆ Controllo efficace di possibili vettori (roditori, insetti)
- ◆ Areazione possibilmente meccanica che assicuri un flusso d'aria entrante senza ricircolo. Se non esiste areazione meccanica, le finestre devono essere apribili.
- ◆ Sistemi di sicurezza che comprenderanno: sistema antincendio, impianto elettrico di emergenza, illuminazione di emergenza, docce di emergenza, presidi di pronto soccorso dotazione per il lavaggio degli occhi

MISURE DI CONTENIMENTO E ALTRE MISURE DI PROTEZIONE

(ALLEGATO IV del D.Lgs. 206/2001)

1. Le sottoelencate tabelle indicano i requisiti minimi e le misure necessarie, per ciascun livello di contenimento in attività di laboratorio (tabella I) e per altre attività (tabella II). Le tabelle Ib e Ic riportano aggiunte e modifiche, rispetto alla tabella Ia, rispettivamente per serre o camere di crescita (Ib) e per stabulari (Ic).

2. In casi particolari, può essere richiesta l'applicazione di opportune combinazioni di specifiche di pari livello, indicate dalla tabella Ia e dalla tabella II.

3. In alcuni casi gli utilizzatori, previo accordo dell'autorità competente, possono non applicare una specifica ad un particolare livello di contenimento o combinare specifiche di due livelli diversi.

Tabella I a

Misure di contenimento, di prevenzione e altre misure di protezione per le attività di laboratorio

Specifiche		Livelli di contenimento			
		1	2	3	4
1	Ambienti di laboratorio: isolamento(1)	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
2	Laboratorio: sigillabile in modo da consentire la fumigazione	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario

Attrezzature

3	Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire.	Necessario (bancone)	Necessario (bancone)	Necessario (bancone, arredo pavimento)	Necessario (bancone, arredo, pavimento, soffitto, pareti)
4	Accesso al laboratorio attraverso zona filtro (2)	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
5	Pressione negativa rispetto alla pressione nelle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Necessario ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario
6	L'aria immessa nel ed emessa dal laboratorio deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA) (3)	Non necessario	Non necessario	Necessario per aria emessa ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario per aria immessa ed emessa. Quando si impiegano virus che non sono trattenuti da filtri HEPA si renderanno necessari requisiti supplementari per l'aria emessa

7	Cappa/box di sicurezza microbiologica	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
8	Autoclave	Nel sito	Nell'edificio	Sul piano (4)	In laboratorio = a doppia entrata
9	Presenza di strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale	Necessari apparati di lavaggio	Necessario	Necessario	Necessario
10	Deposito sicuro per MOGM, nonché per attrezzatura e materiali di laboratorio contaminati	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

Modalità di funzionamento

11	Accesso limitato	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
12	Segnale di pericolo biologico sulla porta	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
13	Specifica formazione del personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
14	Misure specifiche per controllare la diffusione di aerosol	Non necessario	Necessario minimizzare	Necessario prevenire	Necessario prevenire
15	Il personale deve fare una doccia prima di uscire dalla zona controllata	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
16	Indumenti protettivi	Indumenti di protezione adeguati	Indumenti di protezione adeguati	Indumenti di protezione e (se necessario) calzature adeguate	Cambio completo di indumenti e calzature all'entrata e all'uscita
17	Guanti	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
18	Controllo efficace di possibili vettori (ad esempio per roditori ed insetti)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
19	Specifiche procedure di disinfezione	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario

Rifiuti

20	Inattivazione degli MOGM negli effluenti dei lavandini, degli scarichi o delle docce, se presenti, o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
21	Inattivazione degli MOGM nei materiali e nei rifiuti contaminati	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario

Altre misure

22	Il laboratorio deve contenere la propria attrezzatura	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
23	Deve essere presente una	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario

	finestra di osservazione, o una soluzione alternativa, che consenta di vedere gli occupanti				
--	---	--	--	--	--

- (1) Isolamento = il laboratorio è separato dalle altre zone dello stesso edificio o si trova in un edificio separato
(2) Zona filtro (air lock) : l'accesso deve avvenire attraverso una zona filtro che è un ambiente separato dal laboratorio. Il lato esente da contaminazione della zona filtro deve essere separato dalla parte ad accesso limitato da uno spogliatoio o da impianti doccia e, preferibilmente, da porte interbloccanti.
(3) HEPA = High Efficiency Particulate Air
(4) In base a procedure convalidate che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio e che forniscano un livello di protezione equivalente.

Tabella I b

Misure di contenimento e altre misure di protezione per serre e camere di crescita

I termini serra e camera di crescita si riferiscono ad una struttura dotata di pareti, tetto e pavimento progettata ed utilizzata principalmente per la coltivazione di piante in un ambiente controllato e protetto.

Si applicano tutte le disposizioni della tabella Ia, con le seguenti aggiunte/modifiche:

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4

Edifici

1	Serra: struttura permanente (1)	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
---	---------------------------------	----------------	------------	------------	------------

Attrezzature

3	Accesso mediante compartimento separato dotato di due porte interbloccanti	Non necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario
4	Controllo degli scarichi idrici contaminati	Se necessario	Minimizzare gli scarichi (2)	Impediregli scarichi	Impediregli scarichi

Modalità di funzionamento

6	Misure per il controllo di specie indesiderate quali insetti, roditori, artropodi	Necessario	Necessario	Necessario	Necessario
7	Procedure per il trasferimento di materiale biologico tra la struttura protettiva della serra o camera di crescita e il laboratorio che impediscano la diffusione di MOGM	Minimizzare la diffusione	Minimizzare la diffusione	Impedire la diffusione	Impedire la diffusione

- (1) La serra deve consistere in una struttura permanente dotata di una copertura continua impermeabile, deve essere ubicata in un sito sopraelevato rispetto al terreno in modo da evitare la penetrazione di scoli superficiali e deve essere dotata di porte autochiudenti e munite di serratura.
(2) Nel caso la trasmissione possa avvenire attraverso il terreno

Tabella I c

Misure di contenimento e altre misure per le attività degli stabulari

Si applicano tutte le disposizioni della tabella I a con le seguenti aggiunte/modifiche:

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4

Strutture

1	Isolamento dello stabulario (1)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
2	Strutture per animali(2) separate da porte munite di serratura	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
3	Strutture per animali previste in modo da agevolare la decontaminazione [materiale impermeabile e facilmente lavabile (gabbie, ecc)]	Se necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
4	Pavimento e/o pareti facilmente lavabili	Se necessario	Necessario (pavimento)	Necessario (pavimento e pareti)	Necessario (pavimento e pareti)
5	Animali tenuti in installazioni di contenimento adeguate, quali gabbie, recinti o acquari	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Se necessario
6	Filtri per gli isolatori o le camere isolate (3)	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

(1) Stabulario: un edificio o un'area separata all'interno di un edificio che contiene strutture per animali e altre aree come spogliatoi, docce, autoclavi, magazzini per alimenti, ecc.

(2) Strutture per animali: una struttura impiegata normalmente per ospitare animali da stabulare, da allevare o da esperimento o che viene utilizzata per effettuare piccoli interventi chirurgici.

(3) Isolatori: contenitori trasparenti nei quali gli animali di piccole dimensioni vengono confinati all'interno o all'esterno di una gabbia; per gli animali di grandi dimensioni possono essere più appropriate camere isolate.

Tabella II

Misure di contenimento e altre misure di protezione per attività diverse da quelle di laboratorio

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4

Aspetti generali

1	I microorganismi vivi devono trovarsi in un sistema che separi il processo dall'ambiente (sistema chiuso)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
2	Controllo dei gas di scarico dal sistema chiuso	Non necessario	Necessario minimizzare il rilascio	Necessario impedire il rilasci	Necessario impedire il rilascio
3	Controllo degli aerosol durante il prelievo di campioni, l'aggiunta di materiale ad un sistema chiuso o il	Se necessario	Necessario minimizzare il rilascio	Necessario impedire il rilascio	Necessario impedire il rilascio

	trasferimento di materiale ad un altro sistema chiuso				
4	Inattivazione della massa dei brodi di coltura prima dell'eliminazione dal sistema chiuso	Se necessario	Necessario con mezzi convalidati	Necessario con mezzi convalidati	Necessario con mezzi convalidati
5	I sigilli devono essere previsti in modo da ridurre al minimo o evitare il rilascio	Nessun requisito specifico	Minimizzare il rilascio	Impedire il rilascio	Impedire il rilascio
6	La zona controllata deve essere prevista in modo da circoscrivere la fuoriuscita dell'intero contenuto del sistema chiuso	Se necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
7	La zona controllata deve essere sigillabile in modo da consentirne la fumigazione	Non necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario

Attrezzature

8	Entrata attraverso una zona filtro.	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
9	Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire	Necessario (bancone, se presente)	Necessario (bancone, se presente)	Necessario (bancone, se presente, pavimento)	Necessario (bancone, pavimento, soffitto, pareti)
10	Misure specifiche per ventilare adeguatamente la zona controllata in modo da ridurre al minimo la contaminazione atmosferica	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario
11	La pressione atmosferica nella zona controllata deve essere mantenuta al di sotto di quella delle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
12	L'aria immessa ed emessa dalla zona controllata deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA)	Non necessario	Non necessario	Necessario per l'aria emessa, Se necessario per l'aria immessa	Necessario (aria immessa ed emessa)
13	Presenza di strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale	Necessari apparati di lavaggio	Necessario	Necessario	Necessario
14	Deposito sicuro per MOGM, nonché per attrezzature e materiali di laboratorio contaminati	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario

Modalità di funzionamento

15	I sistemi chiusi devono essere ubicati in una zona controllata	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
16	L'accesso deve essere limitato al personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
17	Deve essere apposto un segno di pericolo biologico	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
18	Specificazione formazione del personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario

19	Il personale deve fare una doccia prima di uscire dalla zona controllata	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
20	Il personale deve indossare indumenti protettivi	Necessario (indumenti di lavoro)	Necessario (indumenti di lavoro)	Necessario	Cambio completo prima dell'entrata e dell'uscita
21	Devono essere fornite procedure operative standard scritte volte a garantire la sicurezza, incluse specifiche procedure di disinfezione	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

Rifiuti

22	Inattivazione degli MOGM negli effluenti dei lavandini e delle docce o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
23	Inattivazione degli MOGM nel materiale e nei rifiuti contaminati compresi gli effluenti di processo prima dello scarico finale	Se necessario	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati

Modulistica

Le notifiche (quattro diversi tipi di notifica: di impianto, di impiego confinato di classe 2, di impiego confinato di classi 3 e 4, di impiego confinato in applicazioni cliniche) devono essere effettuate utilizzando una specifica modulistica prevista e messa a disposizione dal Ministero della salute nel sito web: <http://www.ministerosalute.it/biotecnologie/biotecnologie.jsp>

I moduli contenenti le notifiche **devono essere firmati**, come in fondo ad essi indicato:

- per la **NOTIFICA DI IMPIANTO**, dal “**TITOLARE** dell’impianto”, che, come indicato nel decreto all’art. 2, comma 1, lettera e), e ricordato in un’apposita nota all’inizio del modulo stesso, è “*il datore di lavoro così come definito all’articolo 2, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626, e successive modifiche ed integrazioni*”; per l’Università di Genova è quindi il **Rettore**;
la preparazione del documento dovrà essere effettuata a cura del **RESPONSABILE DELLA RICERCA**, che lo firmerà e lo farà vistare anche al **DIRETTORE DI DIPARTIMENTO** prima di sottoporlo alla firma del **RETTORE**;
- per la **NOTIFICA DI IMPIEGO**, dall’ “**UTILIZZATORE**”, che, come indicato nel decreto all’art. 2, comma 1, lettera f), e ricordato in un’apposita nota all’inizio del modulo stesso, è “*il responsabile scientifico e gestionale dell’impiego confinato di MOGM*”;
la preparazione del documento dovrà essere effettuata dal **RESPONSABILE DELLA RICERCA**, che lo firmerà e lo farà vistare anche al **DIRETTORE DI DIPARTIMENTO** prima di sottoporlo al visto, come previsto sul modulo stesso, del “**TITOLARE** dell’impianto”, e cioè del **RETTORE**.

Schemi riassuntivi

Si riportano alcune schematizzazioni che sintetizzano il decreto 206/2001 per fornire un aiuto alla lettura ed alla memorizzazione di alcuni dei contenuti del decreto, per la cui completezza occorre comunque leggere il decreto stesso ed i suoi allegati, che sono essenziali per i dettagli operativi.

