

Impiego confinato di Microorganismi Geneticamente Modificati: Normativa per il corretto utilizzo e prospettive future

INAIL




UNIVERSITÀ DI PISA

Dott.ssa Elena Sturchio
Ricercatore INAIL/DIT

4 dicembre 2020



Attività Seminariale a distanza in materia di
“PROTEZIONE DEGLI ANIMALI UTILIZZATI A FINI SCIENTIFICI”
Ottobre - Dicembre 2020

Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti Prodotti e insediamenti Antropici

CHI SIAMO

Progetto di Formazione e addestramento, per ispettori incaricati di controllare gli impianti e le attività autorizzati su territorio nazionale che prevedono l'utilizzazione di (MOGM), come previsto dal D.Lgs.206/01

Progetto CCM
ISS Creazione
di un Corpo
ispettori
MOGM

Ministero
della
Salute

Direttiva 2009/41/CE (Impiego confinato di MOGM per R&S e produzione)

Sicurezza per il lavoratore e per l'ambiente, dai laboratori, stabulari serre fino alle stanze di degenza per medicinali sperimentali per terapie avanzate

Partecipazione con il Ministero della Salute al **European Enforcement Project (EEP) sull'uso confinato di MOGM e il rilascio deliberato di OGM**

European
Enforcement
Project on
GMM and GMO

INAIL

MATTM

Direttiva 2001/18/CE (rilascio deliberato di OGM, per scopi sperimentali e messa in commercio)

Sicurezza d'uso di OGM e Valutazione del rischio ambientale per il personale medico e paramedico per medicinali sperimentali per terapie avanzate

Esperti per MATTM per la Valutazione del rischio relativo all'impiego delle **nuove tecniche** di biologia molecolare (gene drive etc.) per la costruzione di MOGM e OGM

EU Working
Group on New
Techniques

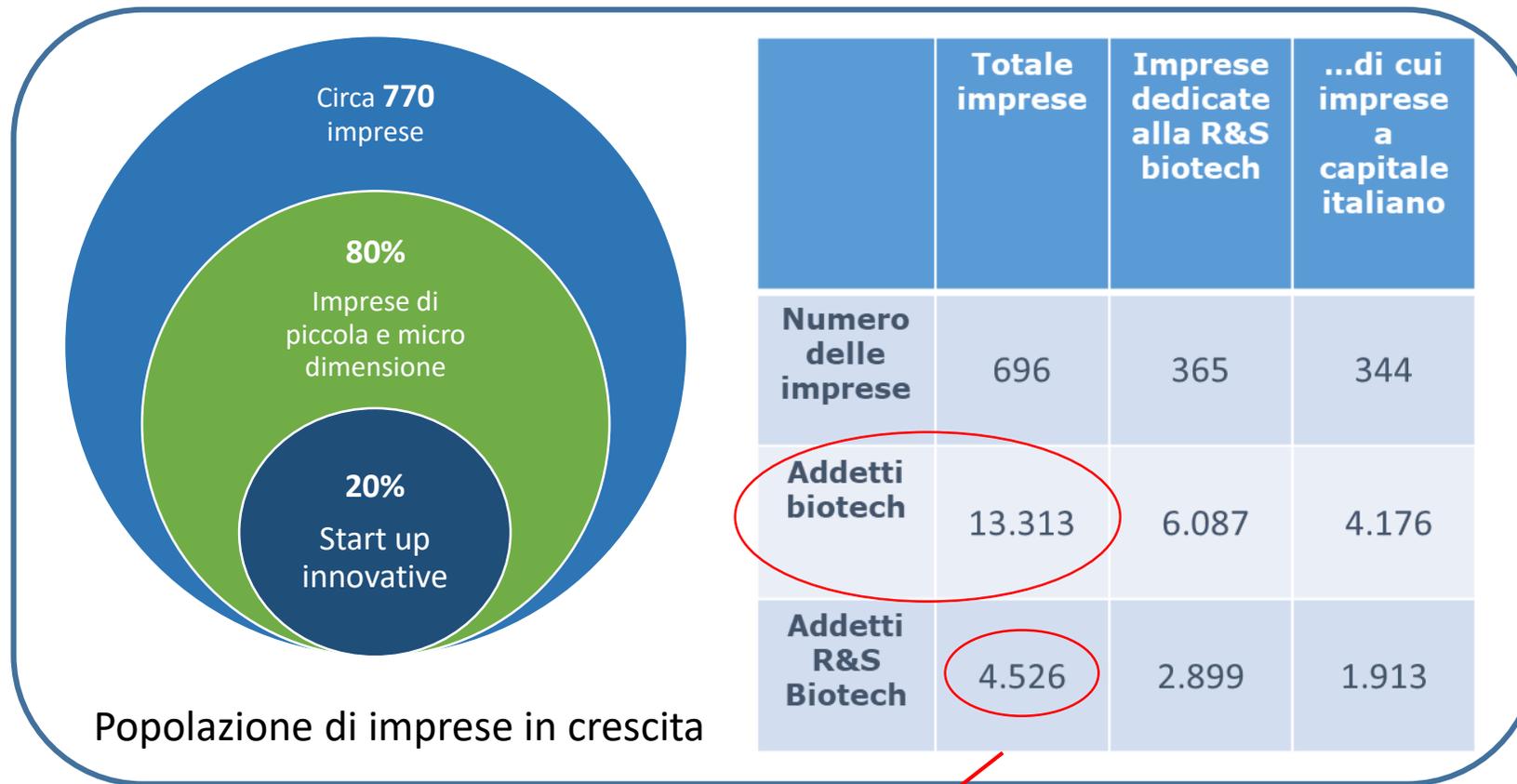
EFSA

Esperti per Ministero Salute del Scientific Network on Risk Assessment of GMOs

Discute con altri gli esperti della Comunità Europea gli aspetti inerenti la sicurezza d'uso di OGM rilasciati nell'ambiente

I numeri del Biotech in Italia

Il mondo del Biotech italiano è protagonista di uno straordinario sviluppo, riconducibile a diversi fattori tra i quali l'indiscussa eccellenza della nostra ricerca accademica e industriale, e la straordinaria capacità delle imprese di trasformare l'innovazione in prodotti di valore.

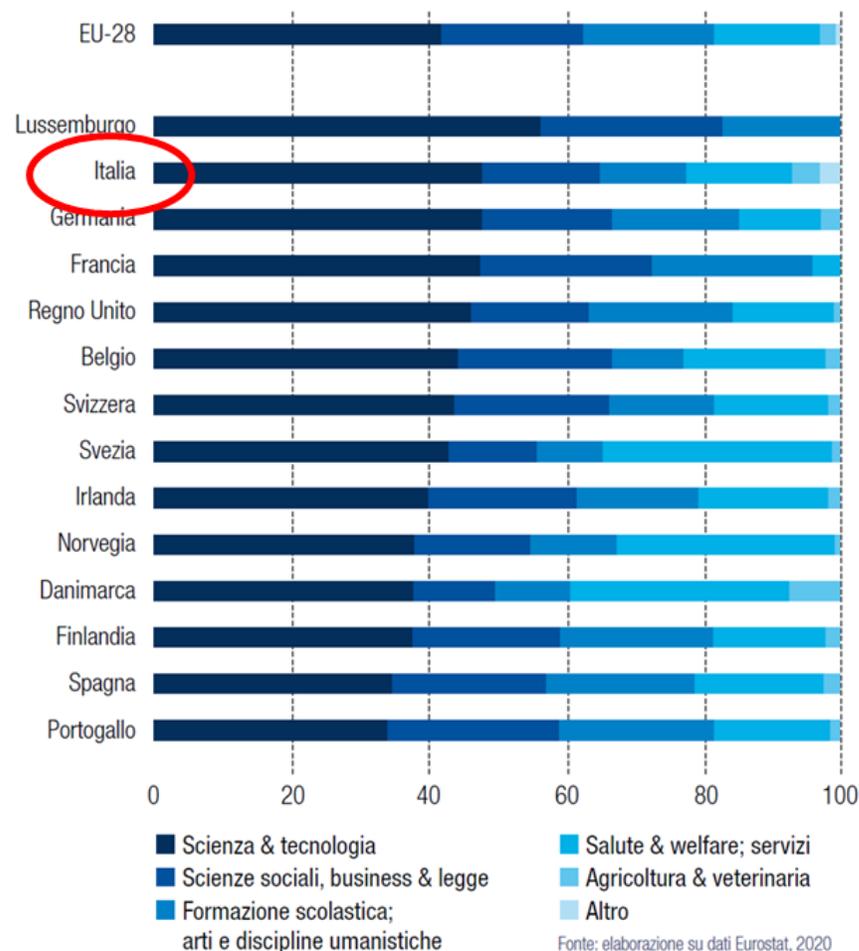


34%

Il mondo accademico: l'eccellenza della ricerca italiana



Percentuale degli studenti coinvolti
in un dottorato di ricerca



- Elevata percentuale di programmi di dottorato attivi nell'area Science & Technology ¹
- **Eccellenza dei ricercatori italiani**, tra i più produttivi al mondo in termini di pubblicazioni scientifiche ²
- La ricerca italiana risulta specializzata in numerose **aree biomediche**. I risultati scientifici sono eccellenti secondo Nature e contribuiscono alle scoperte scientifiche più citate al mondo.
- Nonostante il **sottodimensionamento del numero dei ricercatori italiani** ³

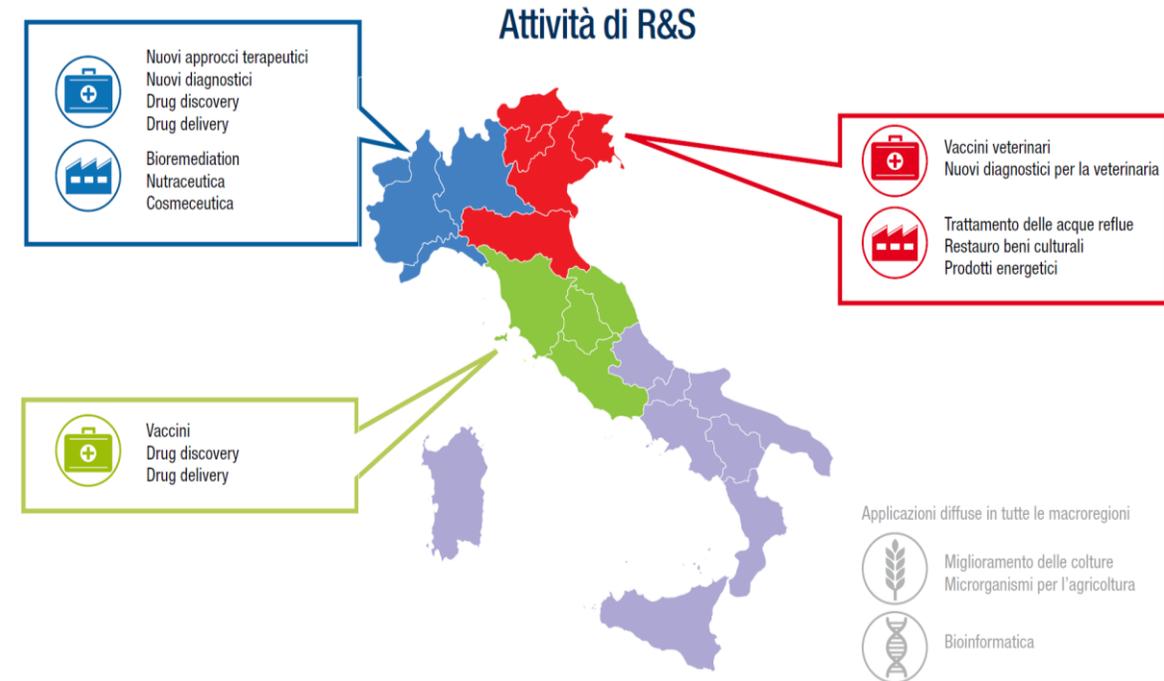
¹ Eurostat (online data code: educ_uoe_enrt03), dati aggiornati al 31.12.2019

² The European House - Ambrosetti, 2019

³ Eurostat (online data code: rd_p_persocc), dati aggiornati al 31.12.2019

Principali tecnologie incluse dall'OCSE nella definizione di biotecnologie e specializzazione territoriale.

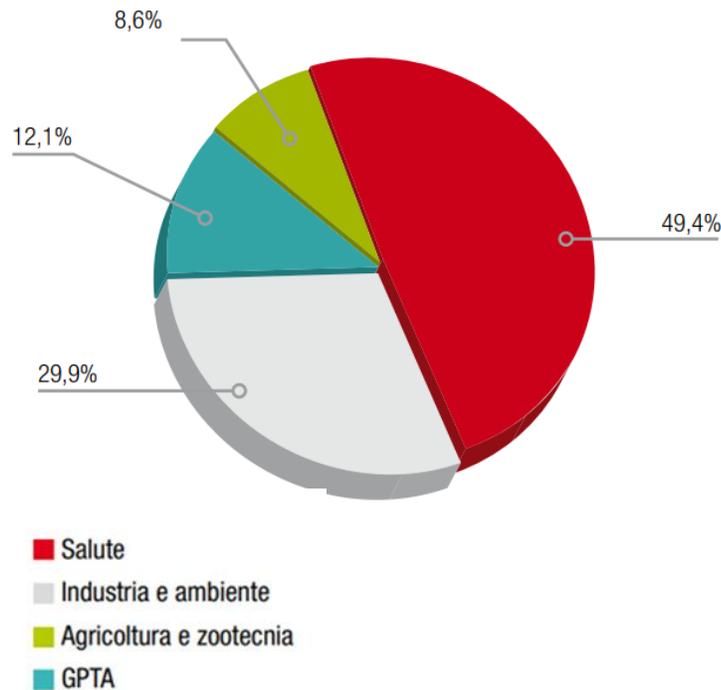
- 1. DNA/RNA:** genomica, farmacogenomica, sonde geniche, ingegneria genetica, sequenziamento/sintesi/amplificazione del DNA/RNA, profilo di espressione genica e utilizzo della tecnologia antisense, gene- and genome- editing, gene-drive.
- 2. Proteine e altre molecole:** sequenziamento/sintesi/ingegnerizzazione di proteine e peptidi (inclusi gli ormoni a grande molecola); nuovi metodi di somministrazione per farmaci a grande molecola; proteomica, isolamento e purificazione delle proteine, identificazione dei recettori/segnalatori cellulari.
- 3. Ingegneria e coltura cellulare e tissutale:** colture cellulari/tissutali, ingegneria dei tessuti (incluse le impalcature tissutali e l'ingegneria biomedica), fusione cellulare, vaccini/immunostimolanti, manipolazione embrionale, tecnologie di selezione assistita da marcatori, ingegneria metabolica, xenobiologia, biopharming.
- 4. Tecniche biotecnologiche di processo:** fermentazione per mezzo di bioreattori, bioraffinazione, biotrasformazione, biolisciviazione, biopulping, biobleaching, biodesolfurazione, biobonifica, biorilevamento, biofiltrazione, fitobonifica, acquacoltura molecolare.
- 5. Vettori genici e a RNA:** terapia genica, vettori virali.
- 6. Bioinformatica:** costruzione di database sul genoma, sequenze di proteine, modellizzazione informatica di processi biologici complessi, disegno computazionale.
- 7. Nanobiotecnologia:** Applicazione degli strumenti e dei processi di nano/microfabbricazione alla costruzione di dispositivi per lo studio dei biosistemi e applicazioni nella somministrazione di farmaci, diagnostica, ...
- 8. Metabolomica/metabonomica:** identificazione ed analisi di metaboliti e loro interazioni.
- 9. Biologia sintetica:** produzione di parti biologiche standard, protocellule, sintesi di DNA in vitro.
- 10. Altro.**



Le imprese di biotecnologie in Italia – BioItaly Report 2020



Settore di applicazione prevalente è quello legato alla **Salute**, il primo che ha dato impulso allo sviluppo delle tecnologie Biotech



Oltre 350 milioni di pazienti nel mondo hanno già beneficiato degli effetti delle terapie biotech; 20-30 milioni solo quelli affetti da malattie rare.

Il 50% per cento di tutti i nuovi farmaci e di tutte le terapie in fase di sviluppo sono biotech.

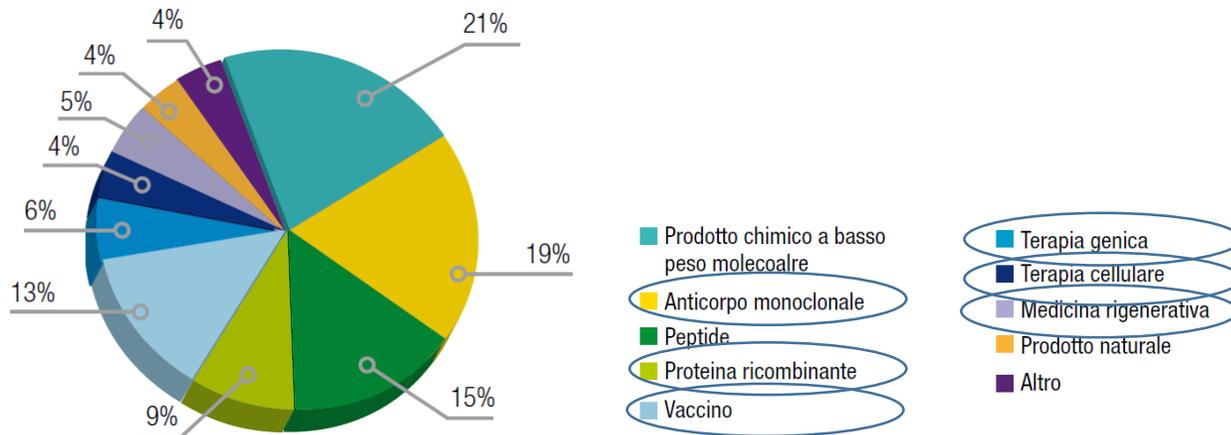
Percentuale in crescita nel caso di:

- ✓ **terapia cellulare, terapia genica e medicina rigenerativa.**
- ✓ **Vaccini**, anticorpi monoclonali per la cura del cancro e delle malattie infiammatorie.
- ✓ **Malattie infettive.**

*Davanti alla più grande **sfida sanitaria attuale**, quella contro il **Covid-19**, il contributo delle biotecnologie nella fase di mobilitazione collettiva è determinante: per il sequenziamento genico del virus, per l'identificazione del recettore responsabile della patologia, per la diagnostica, per lo sviluppo di vaccini che impediscano il contagio. Senza dimenticare la ricerca di una cura efficace attraverso farmaci antivirali e la sperimentazione di nuovi anticorpi monoclonali a scopo profilattico e terapeutico.*

I principali prodotti terapeutici in sviluppo riguardano le molecole classificate come

BIOFARMACI



La maggior parte dei prodotti terapeutici in sviluppo riguarda molecole classificate come **biofarmaci (56%)**, secondo la definizione che include anticorpi monoclonali, proteine ricombinanti, vaccini, **prodotti per Terapie Avanzate, tecnicamente chiamate ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Product)

Con il termine di **Terapie Avanzate**, si indicano quelle terapie o farmaci innovativi che si differenziano dai farmaci più "classici" perché non si basano su molecole prodotte per sintesi chimica bensì su DNA o RNA, cellule e tessuti. Le **ATMP** sono un **settore emergente della biomedicina**, frutto degli enormi progressi fatti negli ultimi venti anni nel campo delle biotecnologie, e offrono nuove opportunità per la diagnosi, la prevenzione o il trattamento di gravi patologie che hanno opzioni terapeutiche limitate o assenti, quali malattie genetiche, malattie croniche e tumori.

- Nuove tecnologie per trasferire ed editare i geni (**Terapia genica**)
- Strategie efficaci per isolare e trapiantare cellule staminali (**Terapie cellulari**)
- Sfruttamento delle armi biologiche dell'immunità (**Immunoterapia**)

*La grande sfida delle ATMP è che sono **medicine viventi**, che si mantengono nell'organismo, possono avere effetti a lungo termine benefici ma potrebbero avere anche potenzialmente effetti avversi, quindi vanno monitorati nel tempo.*

Una farmacologia in continua evoluzione



Con i **geni** introduciamo un farmaco biologico con il suo software di espressione, il gene, che porta le informazioni per fare quel farmaco dove serve, quando serve e quanto serve; quindi siamo molto più mirati o addirittura possiamo usare delle **cellule**, il farmaco cellulare che abbiamo modificato e che in qualche modo viene prodotto per il paziente stesso; un farmaco altamente personalizzato e molto potente.

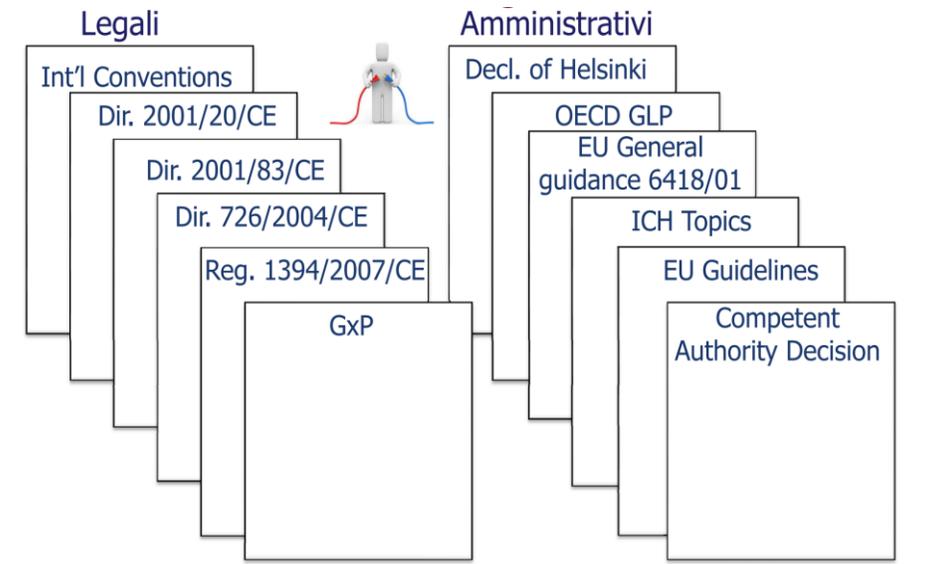
Gli strumenti regolatori

I medicinali per terapie avanzate rappresentano un campo dove la ricerca italiana ha raggiunto risultati di assoluta eccellenza.

L'Italia è infatti leader in Europa per lo sviluppo di questa tipologia di farmaci che offrono nuove opportunità per il trattamento di patologie fino a oggi incurabili o invalidanti.

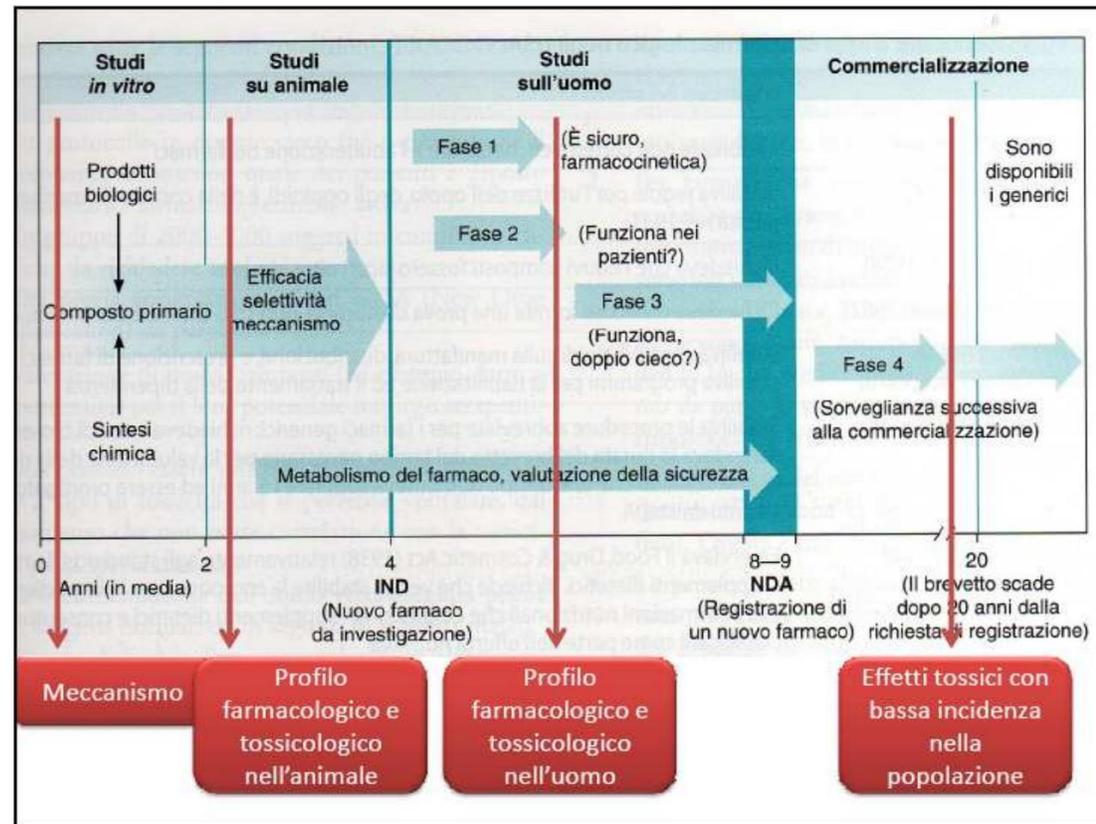
Tanto che la metà di quelle oggi utilizzate in Europa sono nate nel nostro Paese ed è italiano il primo farmaco a base di cellule staminali, la prima terapia genica e il primo farmaco di origine tissutale.

- ❑ Risulta **fondamentale** che i percorsi di sviluppo di questi farmaci siano condotti nel rispetto dei **requisiti normativi e regolatori**, che hanno reso disponibili nuove terapie destinate a compensare esigenze mediche ancora non soddisfatte.



Lo scopo primario della ricerca medica che coinvolge soggetti umani è quello di comprendere le cause, lo sviluppo e gli effetti delle malattie e migliorare gli interventi preventivi, diagnostici e terapeutici (metodi, procedure e trattamenti). Anche gli interventi di comprovata efficacia devono essere valutati continuamente attraverso la ricerca per la loro sicurezza, efficacia, efficienza, accessibilità e qualità.

Dichiarazione di Helsinki



*Si tratta di un percorso lungo, che parte dalla ricerca di laboratorio e, dopo la fase preclinica in **modelli animali**, approda a quella della sperimentazione clinica nei pazienti.*

Normativa concernente le attività in laboratorio con microrganismi wild type

- ✓ **Decreto legislativo 81/08**, in materia di **Tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro**
- ✓ Direttiva comunitaria 2000/54/CE del 18.09.00 relativa alla **Protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da una esposizione ad agenti biologici durante il lavoro**

Art.30, capo III

Gestione della prevenzione nei luoghi di lavoro

Deve essere adottato ed attuato efficacemente un modello idoneo di organizzazione e gestione, per realizzare un sistema aziendale che adempia a tutti gli obblighi giuridici relativi:

- ❖ Al **rispetto degli standard tecnico-strutturali di legge** per attrezzature, impianti, luoghi di lavoro, agenti chimici, fisici e biologici;
- ❖ Alle **attività di valutazione dei rischi** e di predisposizione delle misure di prevenzione e protezione basate sulla classe di rischio individuata;
- ❖ Alle attività di formazione e informazione dei lavoratori;
- ❖ Alle **attività di vigilanza** con riferimento al rispetto delle procedure e delle istruzioni di lavoro in sicurezza da parte dei lavoratori;
- ❖ All'acquisizione di documentazioni e certificazioni obbligatorie;
- ❖ Alle **verifiche periodiche dell'applicazione e dell'efficacia delle procedure adottate**.

Il Contesto Regolatorio del Biotech

- La **sicurezza** delle attività comportanti l'utilizzo di **materiale geneticamente modificato** è garantita in Italia dall'operatività di decreti che recepiscono il contenuto di precise Direttive Europee rivolte alla tutela dell'uomo, dell'ambiente e dell'ecosistema in generale.
- Queste disposizioni stabiliscono in particolare le **misure e le norme procedurali da ottemperare per chiunque voglia manipolare, produrre in laboratorio, utilizzare o rilasciare nell'ambiente esterno microrganismi o organismi geneticamente modificati (MOGM-OGM)**.

*Con il **Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206**, viene data attuazione in Italia alla direttiva 98/81/CE, che modifica la precedente Direttiva 90/219/CE sull'impiego confinato di MOGM. Il presente Decreto stabilisce le misure per l'impiego confinato dei MOGM, volte a tutelare la salute umana dell'uomo e dell'ambiente.*

Direttiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009

La sicurezza dei lavoratori e dell'ambiente nel settore Biotech è garantita dal D.Lgs 206/01

Campo di applicazione:

- Tutte le attività che implicano l'uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM), inclusa la semplice conservazione di ceppi o linee cellulari.

Esclusione:

- I microrganismi modificati con tecniche di mutagenesi tradizionale
- I mogm ottenuti tramite autoclonazione (*self-cloning*), purché non patogeni per l'uomo, animali o piante.

Self-cloning is where a nucleic acid is removed from the cell of an organism and all or part of the nucleic acid is reinserted into cells of the same or a phylogenetically closely related species

ALLEGATO I

PARTE A

Sono considerate, tra l'altro, **tecniche di modificazione genetica** di cui all'art. 2, comma 1, lettera b), punto 1:

- 1) 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 al di fuori dell'organismo, in un virus, in plasmide batterico o 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.
- 2) tecniche che ricorrono all'introduzione diretta in un microorganismo di materiale genetico preparato al di fuori dello stesso, comprese la microinoculazione, la macroinoculazione, la microincapsulazione;
- 3) 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.

PARTE B

Tecniche di cui all'art. 2, comma 1, lettera b), punto 2), **che non sono** considerate tecniche di modificazione genetica se non comportano **ricorso** a molecole ricombinanti di acido nucleico o a microorganismi geneticamente modificati prodotti con tecniche o metodologie diverse da quelle escluse dall'Allegato II, parte A:

- 1) fecondazione in vitro;
- 2) processi naturali come: coniugazione, trasduzione, trasformazione;
- 3) induzione della poliploidia.

Fatto salvo l'articolo 5, comma 1,
il presente decreto **non si applica**:

ALLEGATO II

PARTE A

Le tecniche o metodologie di modificazione genetica di cui all'articolo 3, comma 1, sono:

- 1) mutagenesi;
- 2) fusione cellulare (compresa la fusione di protoplasti) di specie procariotiche che scambiano materiale genetico mediante processi fisiologici noti;
- 3) fusione cellulare (compresa la fusione dei protoplasti) di cellule di qualsiasi specie eucariotica, compresa la produzione di ibridomi e la fusione di cellule vegetali;
- 4) autoclonazione consistente nell'eliminazione di sequenze di acido nucleico da una cellula di un organismo che può essere seguita o meno dal reinserimento in tutto o in parte dell'acido nucleico interessato (o di un equivalente sintetico), che si effettui o meno, in via preliminare, un intervento enzimatico o meccanico, in cellule della stessa specie o in cellule molto vicine da un punto di vista filogenetico, che possono scambiare materiale genetico mediante processi fisiologici naturali, qualora per il microorganismo che ne derivi sia improbabile attendersi che provochi malattie ad esseri umani, animali o piante. L'autoclonazione può comprendere il ricorso a vettori ricombinanti il cui impiego sicuro nel microorganismo specifico sia ampiamente documentato.

PARTE B

Criteri per stabilire la sicurezza dei MOGM per la salute umana e per l'ambiente:

(da completare ai sensi dell'articolo 3, comma 2)

PARTE C

Tipi di organismi geneticamente modificati che soddisfano i criteri elencati nella Parte B:

(da completare ai sensi dell'articolo 3, comma 2)

- ✓ Le Nuove Tecniche ricadono nel campo di applicazione della Direttiva 2001/18/EC (sul rilascio deliberato) o 2009/41/EC (sull'uso confinato)?



The views expressed in this report are those of an expert working group and do not necessarily represent those of the European Commission or the Competent Authorities. Only the European Court of Justice can give a binding opinion on EU law.

New Techniques Working Group

▲ FINAL REPORT

Nuove Tecniche di miglioramento genetico

- ✓ Mutagenesi diretta da oligonucleotidi (ODM)
- ✓ Nucleasi sito specifiche (SDN)
- ✓ Modifiche epigenetiche (RdDM)
- ✓ Cisgenesi
- ✓ Intragenesi
- ✓ Selezione varietale inversa (Reverse Breeding)
- ✓ Agroinfiltrazione
- ✓ Pianta costituita da nesto non GM su portinnesto GM
- ✓ Gene drive



Documento di studio sulle Nuove tecniche di miglioramento genetico

*Ministero dell' Ambiente
e della Tutela del Territorio e del Mare*

DIREZIONE GENERALE PER LE VALUTAZIONI
E LE AUTORIZZAZIONI AMBIENTALI
DIVISIONE IV – Valutazione e Riduzione dei Rischi Derivanti da Prodotti Chimici
e Organismi Geneticamente Modificati

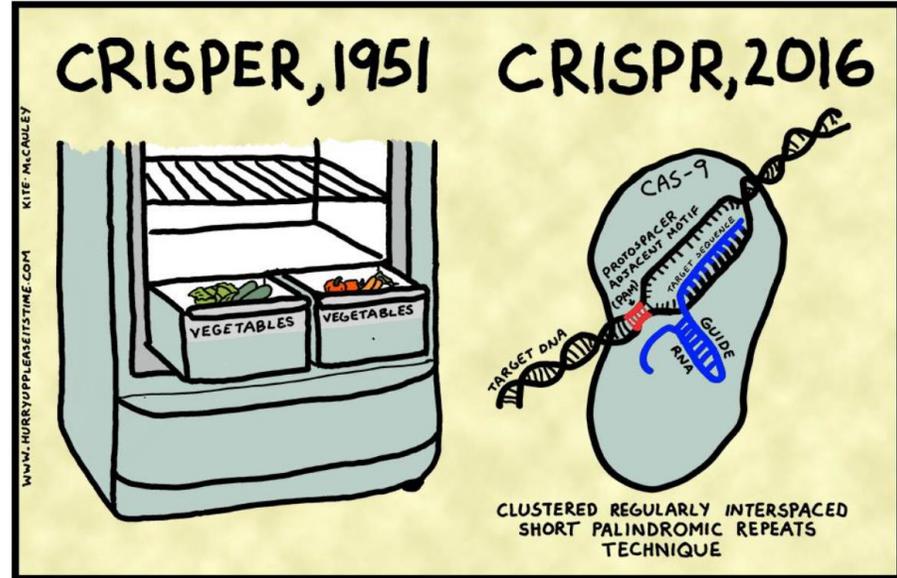
*Nella maggior parte dei casi, le piante ottenute attraverso le NBT sono **prive di nuove combinazioni di materiale genetico e indistinguibili da quelle ottenibili con l'incrocio, la ricombinazione genetica naturale o con la mutagenesi.***

DECISIONE (UE) 2019/1904 DEL CONSIGLIO dell'8 novembre 2019 che invita la Commissione a presentare uno studio alla luce della sentenza della Corte di giustizia nella causa C-528/16 concernente lo statuto delle **nuove tecniche genomiche conformemente al diritto dell'Unione e una proposta, se del caso tenendo conto dei risultati dello studio**

IL CONSIGLIO DELL'UNIONE EUROPEA, visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea, in particolare l'articolo 241, considerando quanto segue:

- (1) *Conformemente alla definizione di cui alla direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio (1), per «organismo geneticamente modificato (OGM)» si intende un **organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale.** Elenchi di tecniche completano la suddetta definizione e specificano l'ambito di applicazione di tale direttiva. La definizione e gli elenchi di tecniche sono stati redatti alla luce delle tecniche di selezione disponibili e utilizzate al momento dell'adozione della direttiva 2001/18/CE.*
- (2) *Da allora sono stati compiuti **progressi sostanziali nello sviluppo di nuove tecniche di selezione**, il che ha determinato incertezza sul fatto se le nuove tecniche di selezione rientrino o meno nella definizione di OGM e nell'ambito di applicazione della direttiva 2001/18/CE e, di conseguenza, se i prodotti da esse ottenuti debbano essere soggetti agli obblighi di cui alla suddetta direttiva.*
- (3) *Con la **sentenza nella causa C-528/16 (2), la Corte di giustizia, dopo avere considerato gli obiettivi generali della direttiva 2001/18/CE, ha stabilito che le nuove tecniche di mutagenesi rientrano nell'ambito di applicazione di tale direttiva** e sono assoggettate agli obblighi che ne discendono.*
- (4) *La sentenza ha apportato chiarezza giuridica sullo statuto delle nuove tecniche di mutagenesi, ma ha anche sollevato questioni pratiche che hanno conseguenze per le autorità nazionali competenti, per l'industria dell'Unione, in particolare nel settore della selezione vegetale, per la ricerca e oltre. Tali questioni riguardano, tra l'altro, come garantire la conformità con la direttiva 2001/18/CE quando i prodotti ottenuti per mezzo di nuove tecniche di mutagenesi non possono essere distinti, utilizzando i metodi attuali, dai prodotti risultanti dalla mutazione naturale, e come assicurare, in una tale situazione, la parità di trattamento tra prodotti importati e prodotti originari dell'Unione.*
- (5) *Il Consiglio ritiene che sia **necessario uno studio** per chiarire la situazione conformemente all'accordo interistituzionale «Legiferare meglio» del 13 aprile 2016, in particolare il punto 10 relativo all'applicazione degli articoli 225 e 241 del trattato sul funzionamento dell'Unione europea,*

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE: Il Consiglio invita la Commissione a presentare, entro il **30 aprile 2021**, uno **studio** alla luce della sentenza della Corte di giustizia concernente **lo statuto delle nuove tecniche genomiche** conformemente al diritto dell'Unione.



Therefore, the study **covers all new genomic techniques.**

Examples of techniques include:

- 1) **Genome editing techniques** such as **CRISPR, TALEN, Zinc-finger nucleases**, mega nucleases techniques, prime editing etc. These techniques can lead to mutagenesis and some of them also to cisgenesis, intragenesis or transgenesis.
- 2) **Mutagenesis techniques** such as oligonucleotide directed mutagenesis (ODM).
- 3) **Epigenetic techniques such RdDM.**

For the purpose of the study, the following definition for **new genomic techniques (NGTs)** is used: techniques, which are capable to alter the genetic material of an organism and which have emerged or have been developed since 2012.

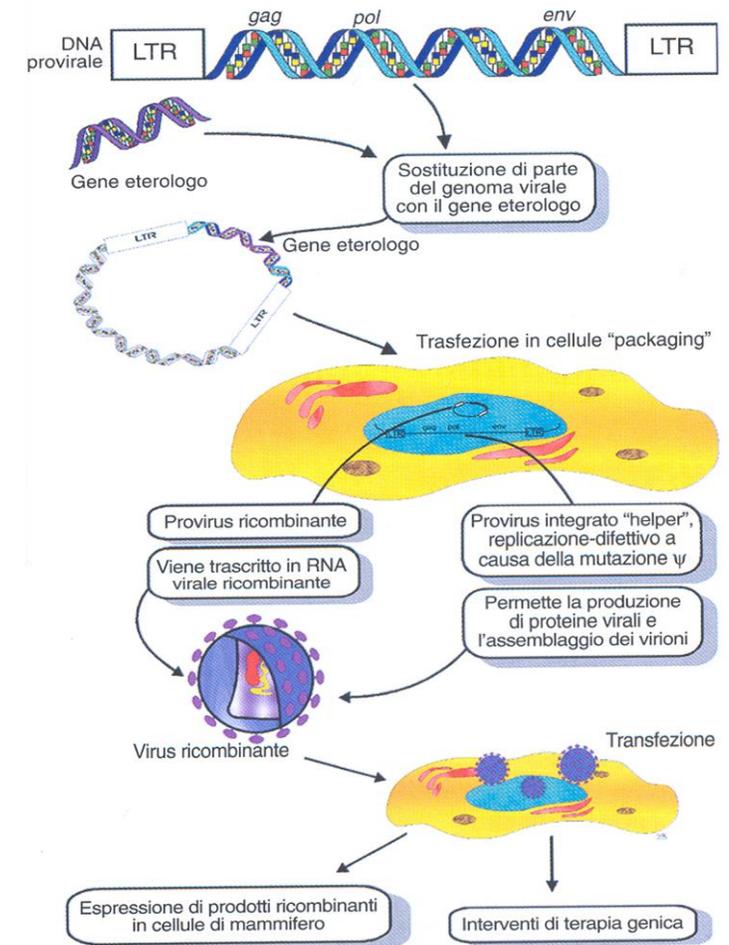
The term **“NGT-products”** covers plants, animals, micro-organisms and derived food and feed products obtained by NGTs for agri-food, **medicinal and industrial applications and for research.**

Decreto Legislativo 206/01: definizioni

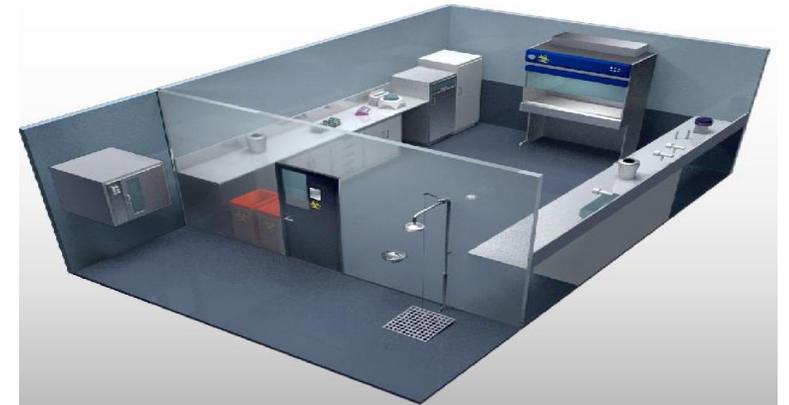
- » **Microrganismo:** ogni entità microbiologica cellulare o non cellulare capace di replicarsi o di trasferire materiale genetico (compresi virus, viroidi, cellule animali e cellule vegetali in coltura).
- » **Microrganismo geneticamente modificato (MOGM):** un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura, di solito mediante tecnica del DNA-ricombinate.

Ricadono quindi nell'ambito della normativa:

- » **Sistemi ospite-vettore per espressione di proteine ricombinanti** (es. procariotici: E.coli+plasmidi; eucariotici: lieviti +plasmidi, linee cellulari in coltura+plasmidi o vettori virali).
- » **Vettori virali e cellule di packaging**



- **Impiego confinato:** ogni attività nella quale i microrganismi vengono modificati geneticamente o i MOGM vengono messi in coltura, conservati, utilizzati, 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.
- **Incidente:** ogni evento imprevisto che comporti una diffusione non intenzionale di MOGM nel corso del loro impiego confinato che possa presentare un pericolo immediato o differito, per la salute dell'uomo o per l'ambiente.
- **Utilizzatore:** il responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato di MOGM.
- **Notifica:** la presentazione da parte dell'utilizzatore e del titolare dell'impianto al Ministero della Salute dei documenti contenenti le informazioni richieste a norma del decreto.



Autorità Competente



Ministero della Salute

E' il Ministero della Salute presso il quale viene istituita una
Commissione Interministeriale di Valutazione DM 08/02/2011

DIREZIONE GENERALE DEGLI ORGANI COLLEGIALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE

**COMITATO TECNICO SANITARIO: APPLICAZIONE DECRETO LEGISLATIVO
206/2001 (Sezione g- Biotecnologie)**

Autorità Competente

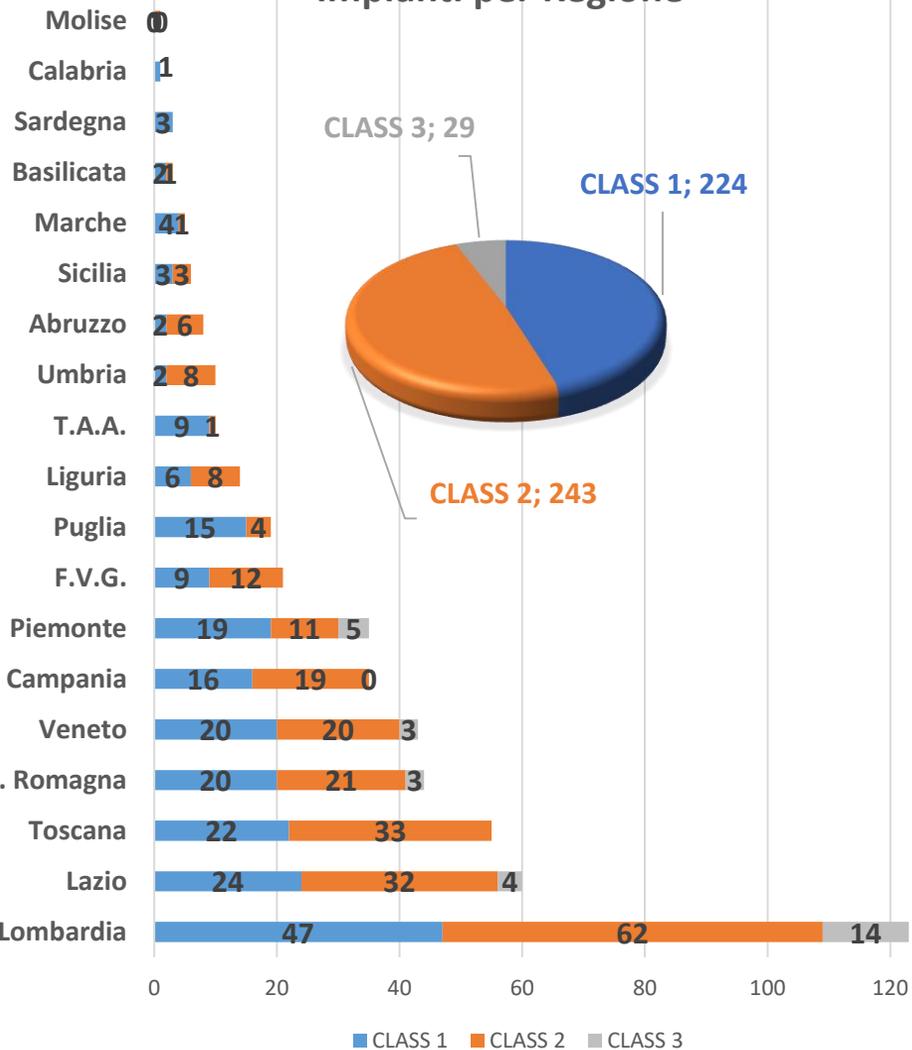
- ❑ Il decreto legislativo 206/01 prevede un **regime di notifica e autorizzazione** per gli impieghi confinati che ricadono nel suo campo di applicazione e per gli impianti ove si intende mettere in atto tali impieghi.

- ❑ Tutte le notifiche, sia di impiego che di impianto, devono essere presentate all'Autorità Competente, il Ministero della Salute.

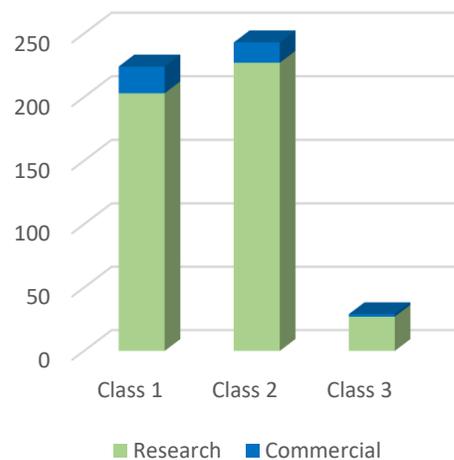
NOTIFICA DI IMPIANTO

- In ordine di tempo, la prima notifica da presentare sarà quella relativa all'impianto.
- La notifica dovrà essere firmata e presentata al Ministero della Salute dal titolare dell'impianto.
- Essa contiene le informazioni relative all'impianto, come specificato nella parte A dell'allegato V al D. L.vo 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.

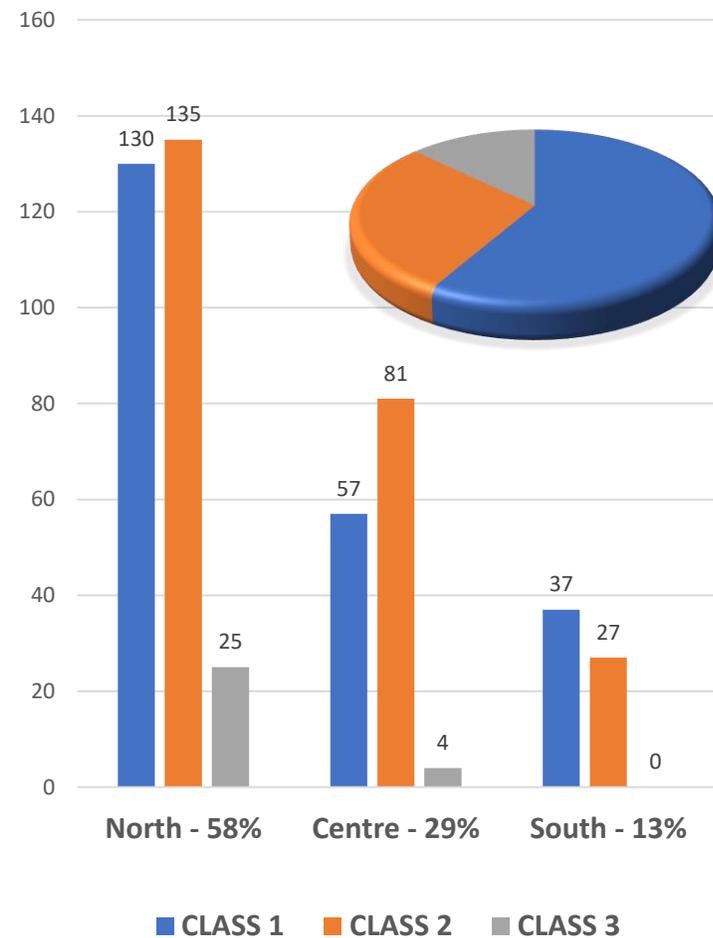
Impianti per Regione



Research vs. Commercial



Impianti per Regione



NOTIFICA DI IMPIEGO

La **notifica di impiego** di un determinato MOGM, con indicazione del:

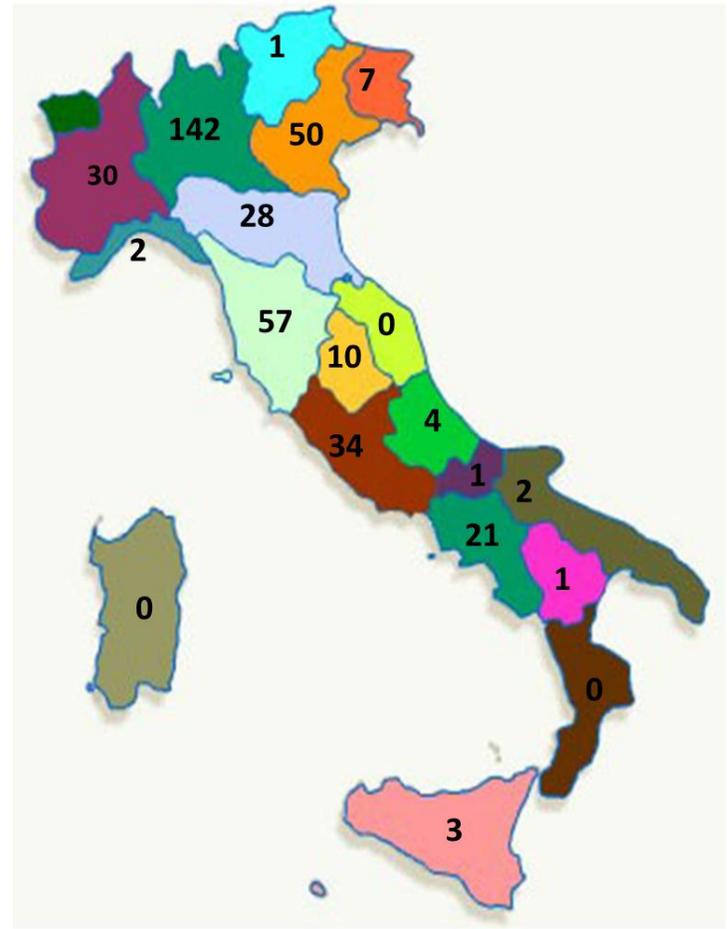
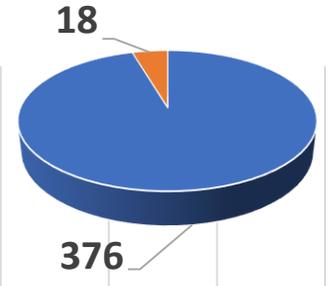
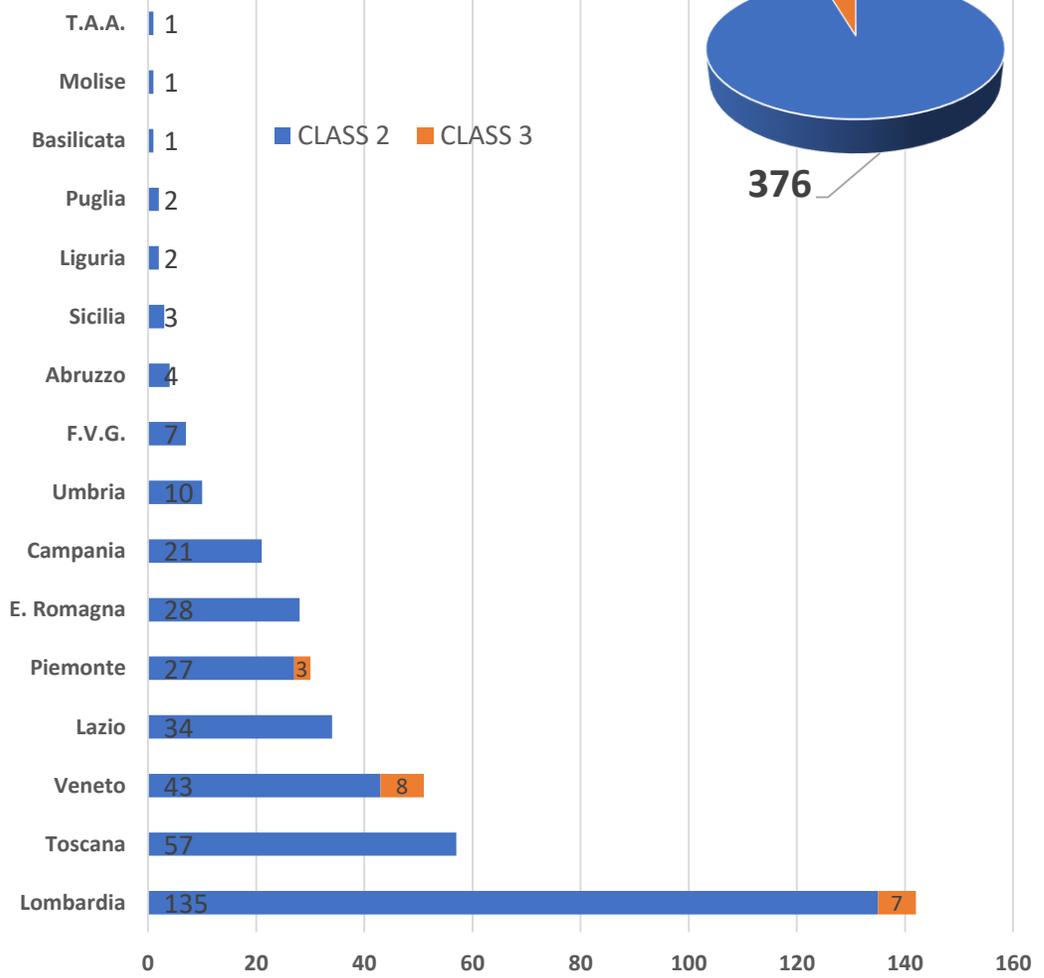
- microrganismo ricevente -o ospite-,
- tipo di inserto
- e dell'eventuale vettore utilizzato,

viene presentata dall'**Utilizzatore**.

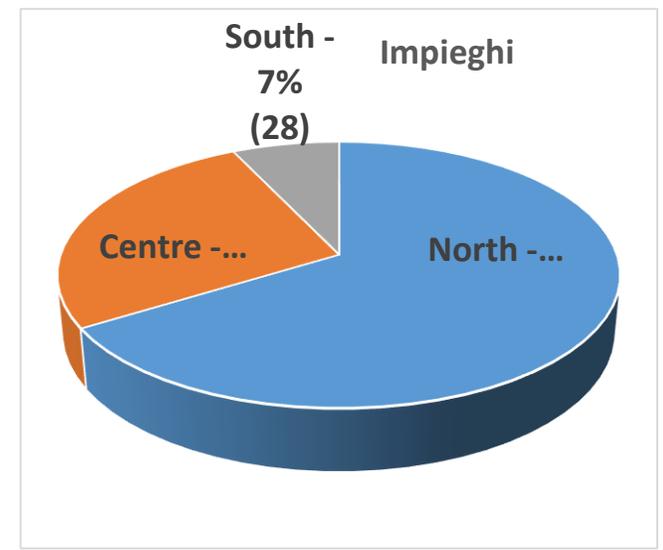
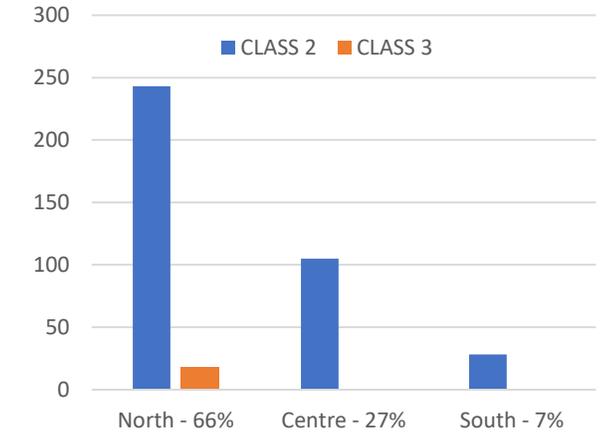
E' a lui che compete la valutazione e la conseguente assegnazione **dell'impiego confinato ad una delle 4 classi**.

La notifica dovrà essere **vistata dal titolare dell'impianto**, cui essa viene consegnata in copia, unitamente al documento di valutazione.

Impieghi autorizzati per Regione



Impieghi



Buona pratica sulla valutazione degli aspetti relativi agli OGM nell'ambito di sperimentazioni cliniche con cellule umane geneticamente modificate mediante vettori retro-lentivirali¹



Modulo unico di domanda per la ricerca clinica con cellule umane geneticamente modificate mediante vettori retro-lentivirali

NOTA 1 Questo modulo di domanda può essere usato solo per cellule umane geneticamente modificate mediante vettori retro-lentivirali nei casi in cui il richiedente dimostri che:

- 1) non vi è alcun rischio di formazione di virus competente per la replicazione;
- 2) il prodotto finito è privo di particelle di vettori virali infettanti che possono essere emesse nell'ambiente.

NOTA 2 Questo modulo può essere usato per la presentazione delle domande nelle giurisdizioni di: Austria, Belgio, Cipro, Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Italia, Lussemburgo, Malta, Portogallo, Romania, Spagna e Norvegia.

NOTA 3 Il modulo di domanda deve essere accompagnato dal modello per la sintesi delle notifiche (per le notifiche relative all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati per scopi diversi dall'immissione in commercio) per le domande presentate a Cipro, in Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Portogallo, Romania e Spagna.





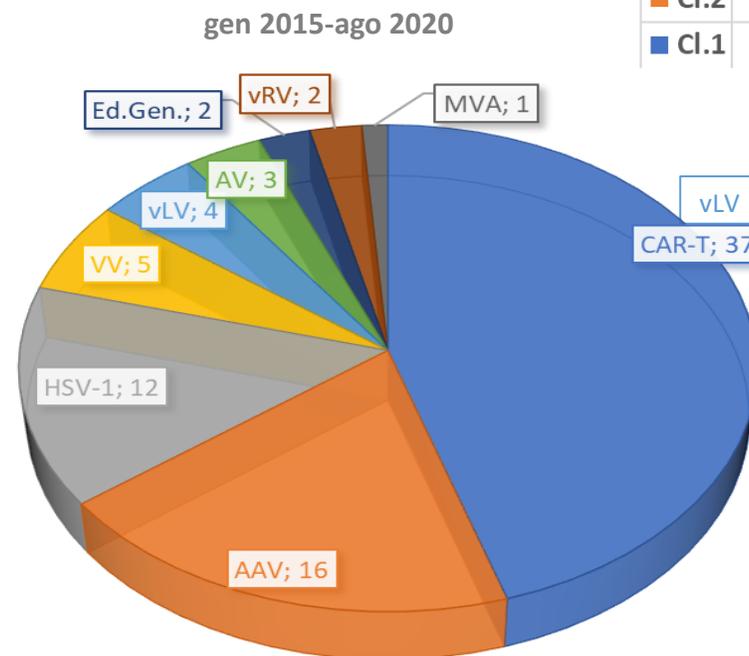
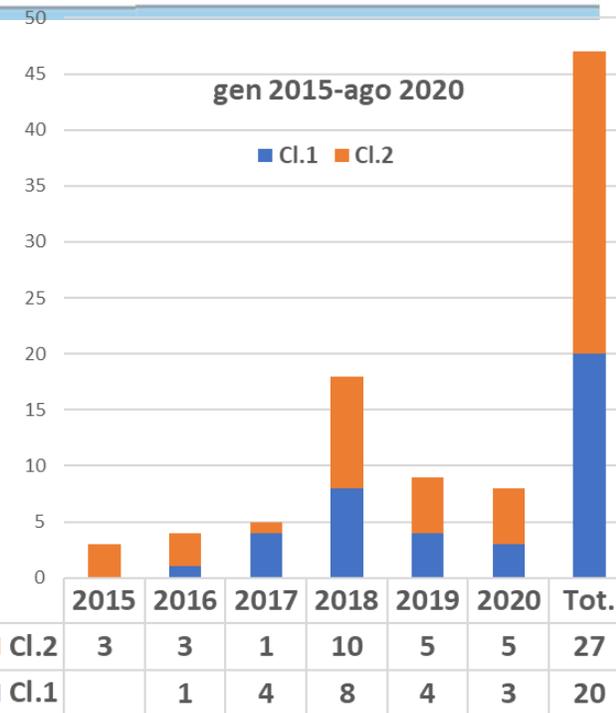
Modulo unico di domanda per la ricerca clinica con cellule umane geneticamente modificate mediante vettori retro-lentivirali¹

NOTA 1 Questo modulo di domanda può essere usato solo per cellule umane geneticamente modificate mediante vettori retro-lentivirali nei casi in cui il richiedente dimostri che:
1) non vi è alcun rischio di formazione di virus competente per la replicazione;
2) il prodotto finito è privo di particelle di vettori virali infettanti che possono essere emesse nell'ambiente.

NOTA 2 Questo modulo può essere usato per la presentazione delle domande nelle giurisdizioni di:
Austria, Belgio, Cipro, Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Italia, Lussemburgo, Malta, Portogallo, Romania, Spagna e Norvegia.

NOTA 3 Il modulo di domanda deve essere accompagnato dal modello per la sintesi delle notifiche (per le notifiche relative all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati per scopi diversi dall'immissione in commercio)² per le domande presentate a Cipro, in Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Portogallo, Romania e Spagna.

Impianti autorizzati alla sperimentazione clinica con prodotti di terapia avanzata



Sperimentazioni cliniche autorizzate e vettori impiegati

Proposta rilevante di regolamento della COM UE che chiarisce e dispone un approccio centralizzato in caso di sperimentazioni cliniche con (M)OGM anti Covid19.



Brussels, 17.6.2020
COM(2020) 261 final

2020/0128 (COD)

Proposal for a

REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

on the conduct of clinical trials with and supply of medicinal products for human use containing or consisting of genetically modified organisms intended to treat or prevent coronavirus disease

(Text with EEA relevance)

Elementi per la Valutazione del Rischio

secondo l'art.271 D.Lgs 81/08 e art.5 e All.III D.Lgs 206/01

- ❖ Informazioni disponibili sui microrganismi
- ❖ Applicazione dei principi di buona prassi microbiologica
- ❖ Aggiornamento periodico della valutazione del rischio, anche in caso di modifiche
- ❖ Verifica delle attività effettuate
- ❖ Descrizione delle fasi del procedimento lavorativo, numero dei lavoratori addetti, metodi e procedure adottate, entità dell'esposizione, misure preventive e protettive applicate, programma da attuare in caso di emergenza

Quindi, nel caso di attività oltre che con microrganismi wild type anche con Mogm, gli utilizzatori devono effettuare una valutazione specifica di impiego confinato che deve essere **allegata al DVR dell'Ente**.

La stesura di questo documento implica che gli utilizzatori, nel corso delle loro attività, **verifichino l'idoneità e l'efficienza delle strutture, il corretto funzionamento delle apparecchiature ed il livello di contaminazione presente nelle diverse fasi di lavoro.**

La valutazione dell'impiego confinato

- ❑ Elemento essenziale per la preparazione di una notifica di impiego è la **valutazione della classe dell'impiego confinato** che si intende eseguire (art. 5 del D. L.vo 206/01).
- ❑ In analogia con i gruppi di rischio 1-4 previsti dal D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 , sono infatti previste **quattro classi di impiego**, definite sulla base del livello di contenimento necessario a proteggere la salute umana e l'ambiente dai possibili rischi connessi con l'uso del particolare MOGM.

Si noti che mentre a norma del D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81, si classificano in gruppi di rischio gli agenti biologici, qui **l'oggetto della classificazione non sono i MOGM bensì gli impieghi previsti.**

La valutazione dell'impiego

- ❑ E' compito del notificante quello di valutare -seguendo le linee indicate **nell'allegato III** al D. L.vo 206/01- quali sono le **misure di contenimento minime** adeguate al caso, scegliendole tra i quattro progressivi livelli di contenimento specificati nell'allegato IV allo stesso decreto.

E' il livello di contenimento adeguato a garantire la sicurezza che determina la classe dell'impiego confinato.

Nel processo di valutazione, delineato nell'allegato III, si tiene conto anche della presenza o meno, nei pressi dell'impianto, di specie animali o vegetali suscettibili ad una eventuale azione patogena del MOGM.

Classi di impiego confinato

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

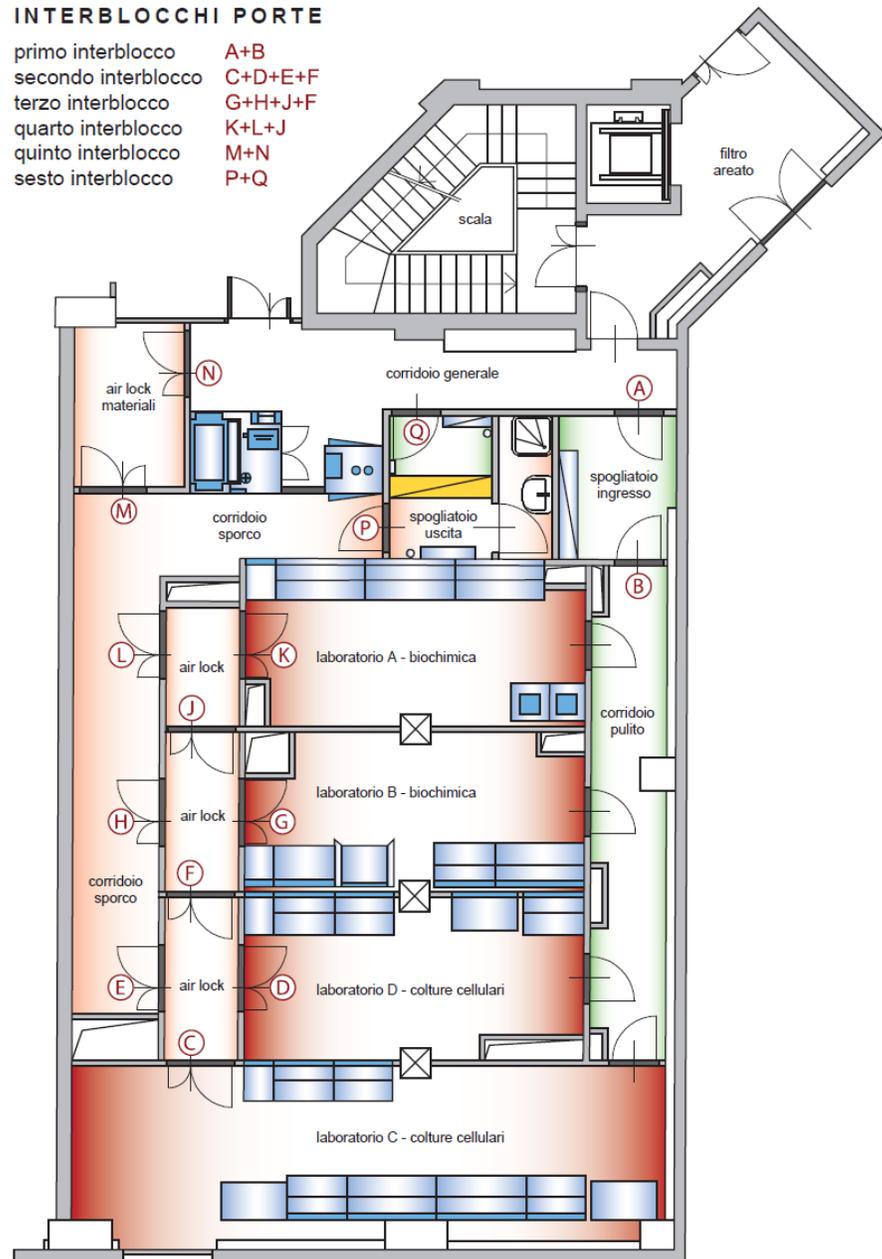
Classe 3 impieghi confinati che presentano un rischio moderato, ovvero operazioni per le quali un livello 3 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

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

Il livello di contenimento adeguato a garantire la sicurezza determina la classe dell'impiego confinato

INTERBLOCCHI PORTE

- primo interblocco A+B
- secondo interblocco C+D+E+F
- terzo interblocco G+H+J+F
- quarto interblocco K+L+J
- quinto interblocco M+N
- sesto interblocco P+Q

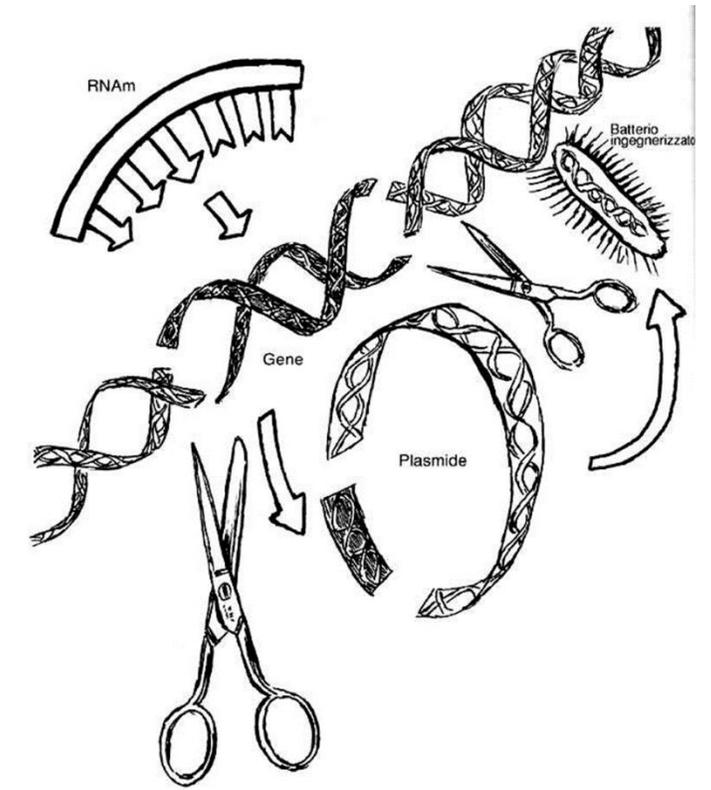


| | Livello 1 | Livello 2 | Livello 3 | Livello 4 |
|--|----------------------|----------------------|---|--|
| Ambiente di lavoro: isolamento | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| Laboratorio sigillabile per la fumigazione | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| CARATTERISTICHE GENERALI | | | | |
| Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire e disinfettare | Necessario (bancone) | Necessario (bancone) | Necessario (bancone, arredo, pavimento) | Necessario (bancone, arredo pavimento, soffitto, pareti) |
| Laboratorio equipaggiato con gruppo elettrogeno | Non necessario | Non necessario | Preferibile | Necessario |
| VENTILAZIONE | | | | |
| - flusso d'aria verso l'interno | Non necessario | Preferibile | Necessario | Necessario |
| - legata al sistema di ventilazione dell'edificio | Non necessario | Preferibile | Se necessario | No |
| - dotata di sistema indipendente | Non necessario | Preferibile | Necessario | Necessario |
| - Aria emessa dal laboratorio sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA) | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| Entrata con doppia porta | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| Pressione negativa rispetto alla pressione nelle immediate vicinanze | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| La pressione del laboratorio monitorata con un sistema di allarme nel caso di variazioni di pressione non accettabile | Non necessario | Non necessario | Necessario | Necessario |
| Accesso al laboratorio attraverso camera di compensazione | Non necessario | Non necessario | Se necessario | Necessario |
| Inattivazione dei MOGM negli effluenti dei lavandini, degli scarichi o delle docce, se presenti, o in effluenti analoghi | Non necessario | Non necessario | Se necessario | Necessario |
| AUTOCLAVE | | | | |
| Sul piano | Necessario | Necessario | Necessario | Necessario |
| Nel laboratorio | Non necessario | Non necessario | Preferibile | Necessario |
| A doppia entrata | Non necessario | Non necessario | Preferibile | Necessario |
| CAPPA BIOLOGICA | | | | |
| Classe II | Non necessario | Se necessario | Necessario | Necessario |
| Classe III | Non necessario | Non necessario | Preferibile | Necessario |

Principi per la valutazione del rischio

Identificazione di tutti gli effetti potenzialmente nocivi, in particolare quelli associati a:

- **microrganismo ricevente**
 - **materiale genetico inserito** (proveniente da un organismo donatore)
 - **vettore**
 - **microrganismo donatore** (quanto è usato durante le operazioni)
 - **MOGM risultante**
-
- Valutazione della **gravità** degli effetti potenzialmente nocivi
 - Valutazione della **probabilità** con cui gli effetti nocivi possono verificarsi (probabilità di esposizione di soggetti umani o dell'ambiente dipende dal tipo di operazioni effettuate, portata di tali operazioni, insieme alle condizioni di contenimento).



Procedura della valutazione del rischio

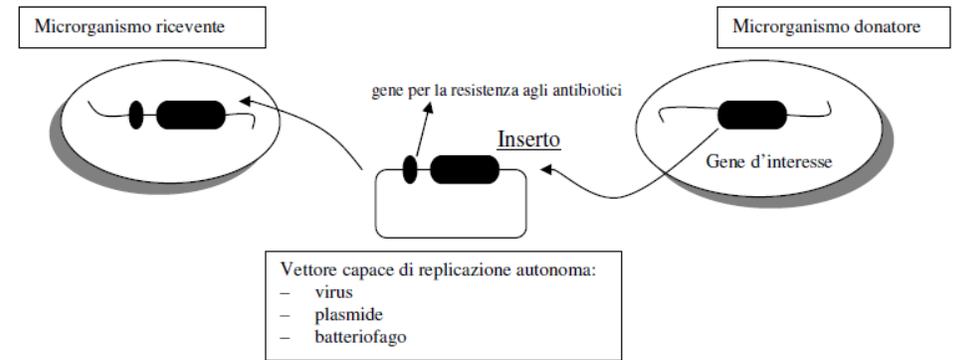


Figura 2. Rappresentazione schematica della tecnica di ricombinazione di acido nucleico. Il microorganismo ricevente diventa un MOGM con una nuova funzione fisiologica. Tale funzione gli viene conferita dal gene che viene prelevato dal microorganismo donatore e trasferito per mezzo di un vettore al microorganismo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

Individuazione del livello di rischio associato al MOGM:

- ❑ L'utilizzatore può fare riferimento a normative nazionali e comunitarie pertinenti, in particolare **D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81**, ovvero a normative internazionali. I gruppi di rischio identificati possono essere usati dall'utilizzatore come riferimento per la classificazione delle attività di impiego confinato nelle 4 classi di rischio di cui all'art.5. L'utilizzatore può anche consultare schemi di classificazione che si riferiscono ad agenti patogeni per piante o animali.
- ❑ Tali normative forniranno solo una indicazione provvisoria della classe di rischio dell'impiego confinato e delle relative misure di contenimento.

Procedura della valutazione del rischio

- ❑ **Al fine di selezionare le misure di contenimento** si devono tener presenti le caratteristiche dell'ambiente potenzialmente esposto ai MOGM, l'entità dell'impiego, o la natura delle operazioni (concentrazione del MOGM, portata: volume assoluto di un'unica operazione)
- ❑ Sulla base degli elementi al punto precedente il livello di rischio del MOGM associato all'impiego confinato, può essere ridotto o incrementato.
- ❑ **Tale valutazione eseguita in conformità alle indicazioni precedenti deve consentire l'assegnazione dell'impiego confinato ad una delle 4 classi.**

Notifica di impiego

VII) Descrizione delle operazioni

1) Natura e entità delle singole operazioni:

- | | | |
|--------------|--------------------------|--------------------------------|
| Insegnamento | <input type="checkbox"/> | volume massimo di coltura..... |
| Ricerca | <input type="checkbox"/> | volume massimo di coltura..... |
| Sviluppo | <input type="checkbox"/> | volume massimo di coltura..... |
| Produzione | <input type="checkbox"/> | volume massimo di coltura... |

2) Scopo dell'impiego confinato:

- | | | | | | |
|---|----|--------------------------|----|--------------------------|-------|
| Produzione di biomassa..... | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> | |
| Produzione di sostanze biologiche..... | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> | |
| Clonare materiale genetico specifico... | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> | |
| Altro (specificare)..... | | | | | |

3) Descrizione delle fasi di coltura.....

4) Concentrazione massima di MOGM nella coltura

5) Descrizione dei metodi di trattamento dei microorganismi

6) E' prevista l'inoculazione in animali?.....

7) Periodo proposto per l'impiego oggetto della notifica

8) Risultati previsti:

Allegare la copia della descrizione data al punto D della notifica di impianto relativamente alla/e sezione/i in cui si svolge l'impiego oggetto della presente notifica, con indicazione del livello di contenimento previsto per ciascuno dei vani utilizzati (inclusi eventualmente stabulari, serre ecc.).

Notifica di impianto

D) Descrizione di ciascuna sezione dell'impianto (compilare un foglio per ogni sezione o reparto interessato dalla presente notifica)

1) Denominazione della sezione (o reparto):.....

2) Destinazione della sezione (o reparto)

- a) Laboratorio di ricerca
- b) Impianto sperimentale o pilota
- c) Impianto industriale
- d) Altro specificare.....

3) Pianta dettagliata allegata ^(***) (obbligatoria per impianti destinati ad impieghi di classe 2, 3 e 4). **LAY-OUT LEGGIBILE OBBLIGATORIO ANCHE PER IMPIANTI DI CLASSE 1 CON INDICATI I NUMERI IDENTIFICATIVI DELLE STANZE, LEGENDA E COLLOCAZIONE DELLE ATTREZZATURE RILEVANTI (ES: AUTOCLAVE, CAPPA, GABBIA PER CONTAMINAZIONE ANIMALI ECC.)**

SI NO

4) Numero e sigle identificative dei locali costituenti la sezione (inclusi stabulari, serre, camere di crescita):

5) Indicazioni sulla destinazione e sulle caratteristiche di ciascun vano e relativo livello di contenimento attuabile (1-4) soddisfacendo tutti i requisiti specificati nelle tabelle dell'allegato IV del D. L. n° 206/2001).

Destinazione del locale

Livello di contenimento

1 2 3 4

- a).....
- b).....
- c).....
- d).....
- e).....
- f).....

Procedura della valutazione del rischio

- ❑ E' chiaro che un **impiego di una determinata classe** potrà essere eseguito solo in un **impianto che realizzi le corrispondenti misure di contenimento**.
- ❑ Sarà cura **dell'Autorità competente verificare la corrispondenza** tra classe di impiego e livello di contenimento realizzato presso l'impianto proposto per la sua esecuzione, avendo anzitutto verificato la correttezza della classe proposta dal notificante sulla base della propria valutazione.
- ❑ Tale valutazione (e la conseguente scelta della classe da assegnare all'impiego) va argomentata per iscritto, e costituisce un documento che va conservato presso l'impianto. L'intero documento (nei casi di notifiche di impieghi di classe 3 o 4) od una sua sintesi (nel caso di notifiche di impieghi di classe 2) forma parte integrante ed essenziale della notifica di impiego.

X) Tabella sinottica di riepilogo del/dei MOGM che si intende utilizzare:

| TITOLO DEL PROGETTO: | | | | | | |
|---|----------------|----------------|------------------------------|--|------------------|--------------------------|
| SCOPO DEL PROGETTO: (breve descrizione) | | | | | | |
| NOME DEL MOGM | VETTORE | INSERTO | Funzione dell'inserto | Organismo donatore dell'inserto | RICEVENTE | CLASSE DI RISCHIO |
| 1 | | | | | | |
| 2. | | | | | | |
| 3. | | | | | | |
| | | | | | | |

Descrizione delle fasi di processo, delle misure di contenimento e delle altre misure di protezione da adottare per tutta la durata dell'impiego confinato

Estrazione e clonaggio

| ACCESSO AL LABORATORIO E NORME DI COMPORTAMENTO | | |
|--|---|---|
| In laboratorio è obbligatorio l'uso di appositi DPI quali abbigliamento e calzature specifiche. | | |
| Tutte le fasi di processo devono essere eseguite secondo le buone pratiche di laboratorio | | |
| FASI DI PROCESSO | Rischio biologico/Stima | MISURE DI CONTENIMENTO DA APPLICARE |
| Estrazione di RNA totale da matrici virali | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle matrici virali | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio antiaerosol |
| Retrotrascrizione ed amplificazione di geni target (RT-PCR) | RNA e cDNA non infettante | Utilizzare guanti monouso e cappa biologica. Eseguire in locale dedicato per ridurre il rischio di contaminazioni crociate e falsi positivi |
| Corsa elettroforetica in gel di agarosio e rilevazione del prodotto di amplificazione mediante transilluminatore UV, taglio banda e purificazione con QIAquick gel extraction kit | DNA non infettante ed utilizzo di reagente intercalante degli acidi nucleici. Utilizzo di bisturi | Utilizzare guanti monouso e cappa chimica, occhiali protettivi anti-UV (nel caso in cui il transilluminatore non sia chiuso in apposita camera). Eseguire in locale dedicato per ridurre il rischio di contaminazioni crociate e falsi positivi |
| Verificare la sequenza degli amplificati mediante sequenziamento, utilizzando i primers adeguati secondo DS BIO IOP 037 e conservarlo a $\leq -18^{\circ}C$ | DNA non infettante | Utilizzare guanti monouso |
| Digestione e defosforilazione del plasmide. Digestione degli amplificati e successiva ligazione | DNA non infettante | Utilizzare guanti monouso; eseguire in locale dedicato per ridurre il rischio di contaminazioni crociate e falsi positivi |
| Trasformazione di DNA plasmidico di cellule di E. coli competenti | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli | Utilizzare guanti monouso |
| Utilizzare la PCR su colonia per identificare i cloni positivi | Contatto in occasione della manipolazione delle piastre petri | Utilizzare guanti monouso |

| FASI DI PROCESSO | Rischio biologico/Stima | MISURE DI CONTENIMENTO DA APPLICARE |
|---|--|---|
| Corsa elettroforetica in gel di agarosio e rilevazione del prodotto di amplificazione mediante transilluminatore UV | DNA non infettante ed utilizzo di reagente intercalante di acidi nucleici | Utilizzare guanti monouso e cappa chimica, occhiali protettivi anti-UV (nel caso in cui il transilluminatore non sia chiuso in apposita camera). Eseguire in locale dedicato per ridurre il rischio di contaminazioni crociate e falsi positivi |
| Incubare le colonie positive in 2ml di brodo LB con antibiotico e lasciare crescere ON in incubatore a 37°C in agitazione a circa 230rpm | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli | Eseguire le operazioni di inoculo sotto cappa biologica, utilizzando guanti e manicotti monouso |
| Estrarre il DNA plasmidico della coltura satura utilizzando il kit Gene Elute Plasmid miniprep (Sigma) secondo le indicazioni della ditta (Manual GenElute Plasmid Miniprep kit) | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli. Lisi e inattivazione delle cellule batteriche, DNA non infettante | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio anti-aerosol. |
| Verificare la sequenza del DNA plasmidico purificato con il sequenziamento, utilizzando i primers adeguati secondo DS BIO IOP 037 e conservato a $\leq -18^{\circ}C$ | DNA non infettante | Utilizzare guanti monouso |
| Inoculare il clone scelto in 1ml di LB con antibiotico e lasciare crescere ON in incubatore a 37°C in agitazione a circa 230 rpm | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli. | Eseguire le operazioni di inoculo sotto cappa biologica, utilizzando guanti e manicotti monouso |
| Inoculare successivamente la coltura satura in 100ml di LB con antibiotico in una beuta sterile e lasciare crescere ON in incubatore a 37°C in agitazione a circa 230 rpm | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli. | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio anti-aerosol. |
| Estrazione del DNA plasmidico utilizzando l'Endofree plasmid maxi kit (QIAGEN) secondo le indicazioni della ditta | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione delle cellule di E. coli. Lisi e inattivazione delle cellule | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio anti-aerosol. |

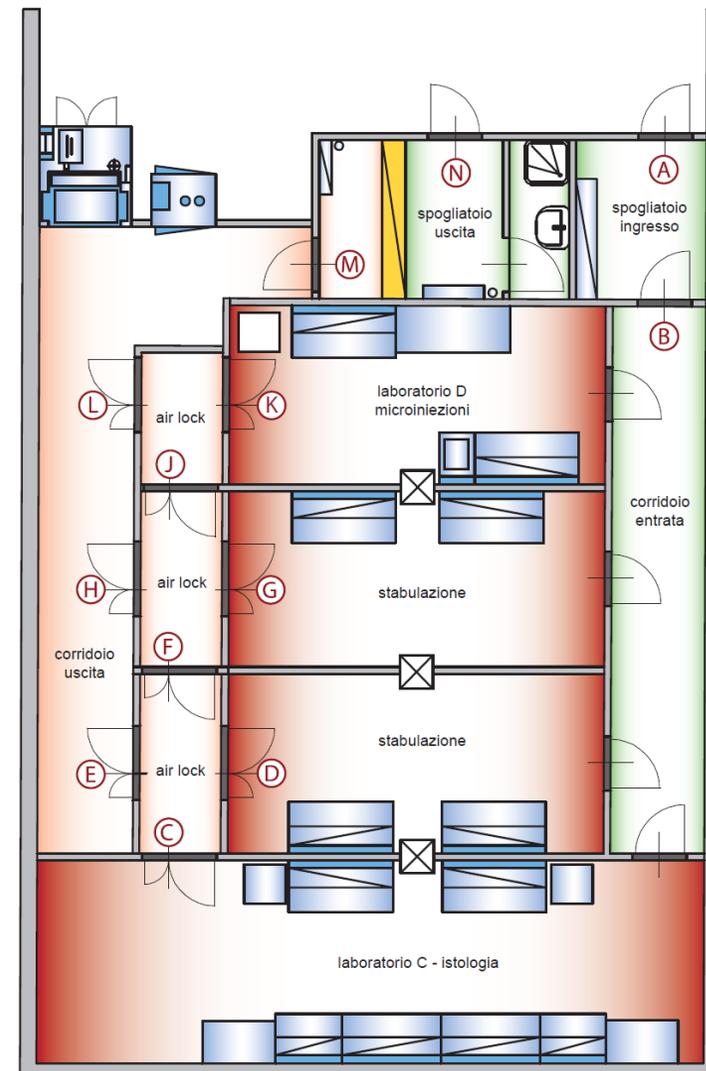
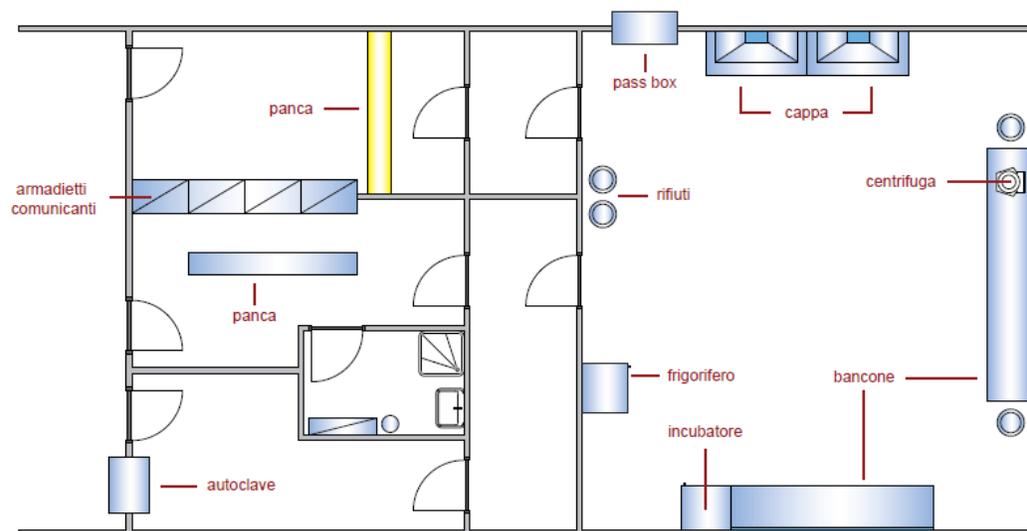
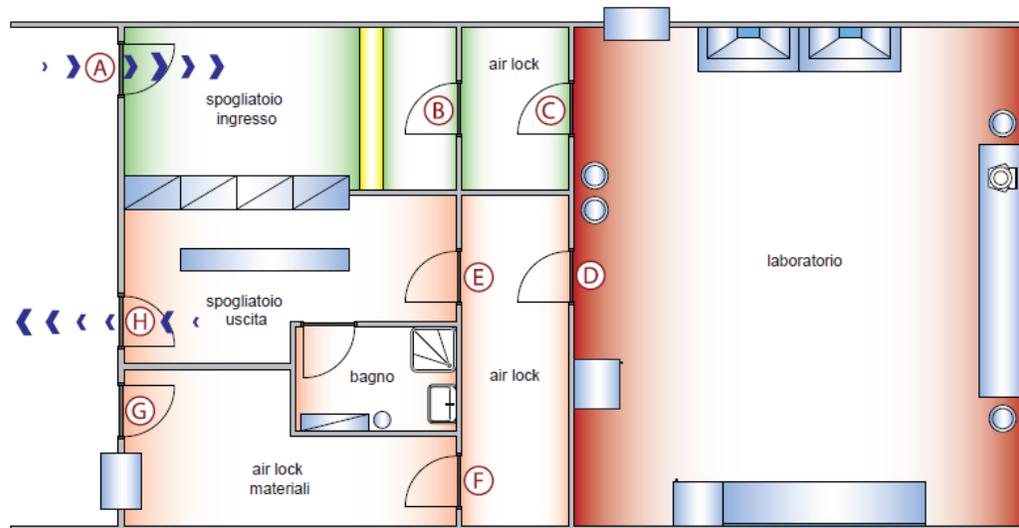
In laboratorio è obbligatorio l'uso di appositi DPI quali abbigliamento e calzature specifiche.

Tutte le fasi di processo devono essere eseguite secondo le buone pratiche di laboratorio.

Ove non diversamente indicato il livello di contenimento da applicare è 2

| FASI DI PROCESSO | Rischio biologico/Stima | MISURE DI CONTENIMENTO DA APPLICARE |
|---|---|---|
| Preparazione di una piastrina da 6 pozzetti con una cocoltura di cellule 293T e MDCK in rapporto 1:1 | Utilizzo di cellule di rene di origine umana e canina | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. |
| Sostituzione del terreno di coltura 1h prima della trasfezione | Utilizzo di cellule di rene di origine umana e canina | Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. |
| Trasfezione delle cellule con DNA plasmidico | Utilizzo di cellule di rene di origine umana e canina, DNA non infettante | Livello di contenimento 3. Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. |
| Aggiunta di tripsina se i virus da generare sono a bassa patogenicità | Utilizzo di cellule di rene di origine umana e canina. Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione del surnatante cellulare potenzialmente infetto | Livello di contenimento 3. Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. |
| Raccolta del surnatante, centrifugazione per 1 min e 13000 rpm e filtrazione con filtro da 0.45 µm | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione del surnatante cellulare potenzialmente infetto | Livello di contenimento 3. Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio anti-aerosol |

| FASI DI PROCESSO | Rischio biologico/Stima | MISURE DI CONTENIMENTO DA APPLICARE |
|---|--|---|
| Inoculo e titolazione in uova embrionate SPF. Eseguire tutte le operazioni in conformità alle specifiche fornite dalla PDP VIR 005 | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione del surnatante cellulare potenzialmente infetto e del liquido allantoideo contenente il virus reverse genetics generato | Livello di contenimento 3. Utilizzare cappa biologica, manicotti, mascherina e guanti monouso. |
| Estrarre l'RNA del virus reverse genetics ottenuto, utilizzando il kit commerciale Nucleospin® RNA (Machery Nagel, Germany) secondo le informazioni fornite dal produttore | Contatto, investimento da spruzzi, generazione di aerosol in occasione della manipolazione del surnatante cellulare potenzialmente infetto | Livello di contenimento 3. Utilizzare cappa biologica, manicotti e guanti monouso. Utilizzo di centrifughe con coperchio anti-aerosol |
| Retrotrascrizione, amplificazione e sequenziamento completo dell'RNA estratto utilizzando i primers adeguati secondo DSBIO IOP 037 | RNA e cDNA non infettante | Utilizzare guanti monouso |



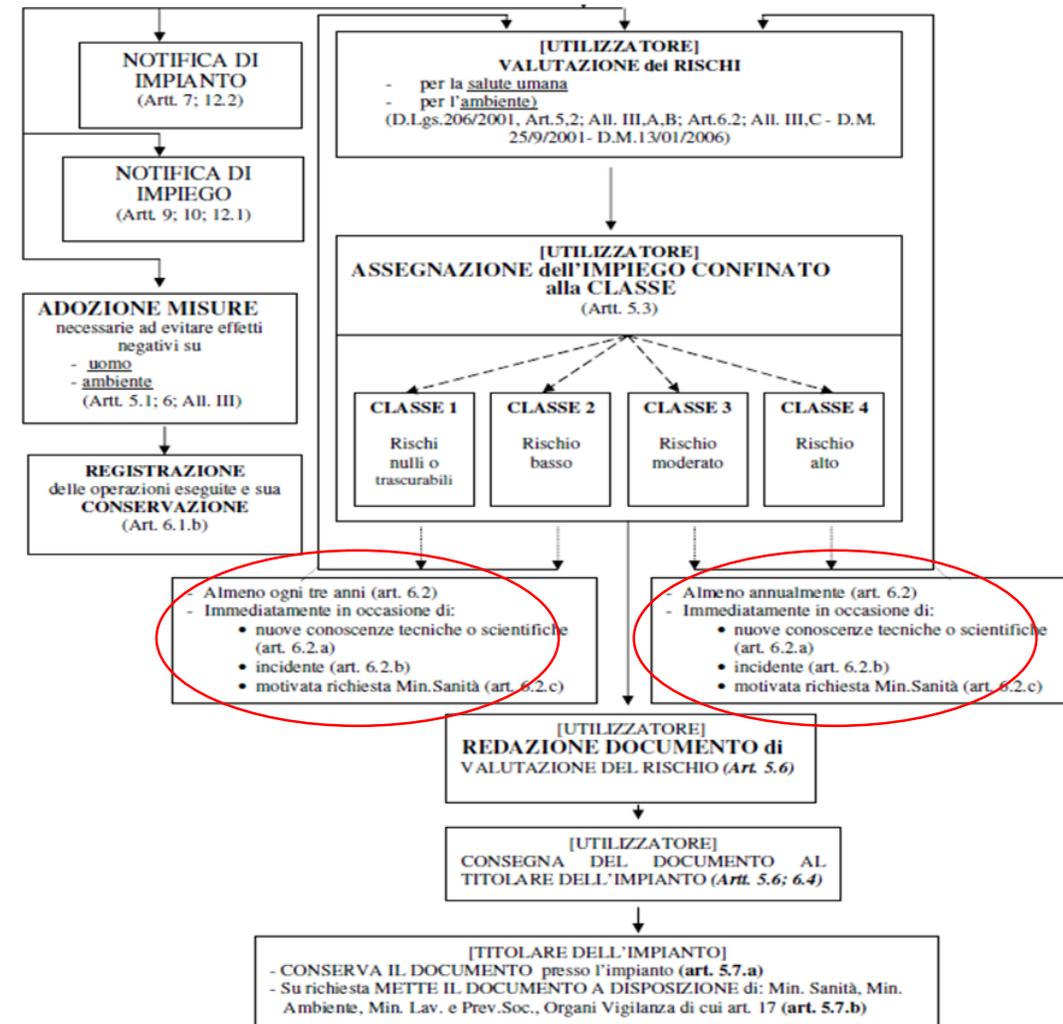
RESPONSABILITA'

Notificante (titolare dell'impianto, e utilizzatore per l'impiego):

- Valutare quali siano le misure di contenimento minime adeguate al caso, scegliendole tra quelle indicate nel decreto per i quattro progressivi livelli

Utilizzatore:

- Assicurarsi che per tutta la durata dell'impiego confinato siano applicate le misure di contenimento e di protezione specificate
- **Conservare i quaderni (o i file)** in cui sono registrate le operazioni eseguite in particolare per impieghi di classe 1
- 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 di impiego
- Redigere un documento di riesame che dovrà essere consegnato al titolare dell'impianto
- Al verificarsi di un incidente, informarne immediatamente il Ministero della Salute



★ Il D.Lgs 206/2001 prevede all'art. 6 comma 1(b) che gli impieghi di classe 1 vengano registrati: ★

l'utilizzatore conserva, su supporto cartaceo o informatico, registrazioni delle operazioni eseguite!

ON-GOING

Per aiutare i ricercatori in questa operazione di tracciabilità



Fac simile di pagina di registro per operazioni con MOGM classe 1



Modello esemplificativo per raccolta informazioni che "al minimo" devono essere tenute nei quaderni di laboratorio





Fac simile pagina di registro

I quaderni di laboratorio non devono essere necessariamente organizzati come nel fac simile

ma



i dati scientifici + valutazione del rischio



*disponibili in caso di visita ispettiva a impianti autorizzati impiego MOGM classe
1*



Fac simile pagina di registro



SIGLA IDENTIFICATIVA DELL'IMPIANTO AUTORIZZATO.....

Fac-simile di pagina di registro per MOGM di classe 1 (D. Lgs. 206/01 art.6, comma 1b)

Descrizione delle operazioni

1) Natura e entità delle singole operazioni:

- Insegnamento volume massimo di coltura.....
- Ricerca volume massimo di coltura.....
- Sviluppo volume massimo di coltura.....
- Produzione volume massimo di coltura.....

2) Concentrazione massima di MOGM nella coltura

II) Sintesi della valutazione dei rischi per la salute dell'uomo, degli animali, delle piante e per l'ambiente in generale, conseguenti sia alle normali attività che ad eventi accidentali ipotizzabili (cfr. art. 5 del D. L.gs 206/01).....

III) Altre informazioni:

Se ottenuto da un altro laboratorio, indicare quale e data di arrivo

Laboratorio/Industria di provenienza

Data dell'ottenimento del MOGM:.....

Forma e luogo di conservazione del MOGM.....

N°/SIGLA/Nome del registro di laboratorio di riferimento.....



IV) Tabella riassuntiva

Nome scientifico, ceppo utilizzato del **MICROORGANISMO RICEVENTE**.....

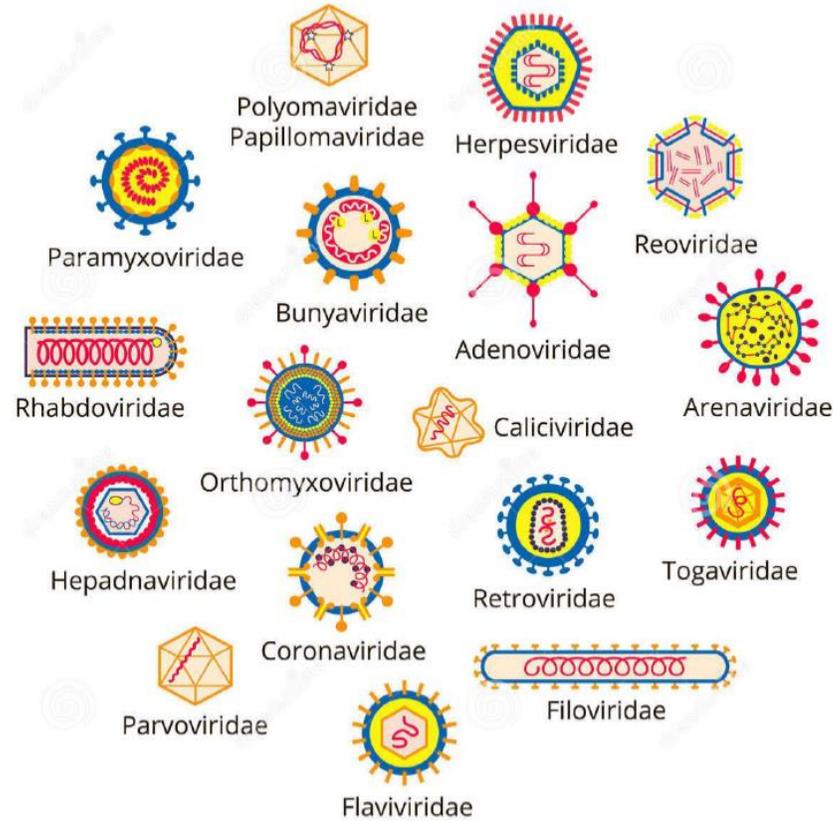
EVENTUALI MODIFICAZIONI GENETICHE PRECEDENTI.....

| Nome e sigla del MOGM | Vettore | Inserito (nome e dimensione) | Organismo donatore dell'inserito | Funzione dell'inserito | Tipo di modificazione genetica* | Metodo utilizzato per introdurre l'inserito nella cellula ricevente/parentale** | Scopo della modificazione genetica | Il MOGM è differente dal microorganismo ricevente per quanto riguarda possibili effetti sull'ambiente? | Presenza di resistenza agli Antibiotici? | Classe di rischio |
|-----------------------|---------|------------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------------|---|------------------------------------|--|--|-------------------|
| 1 | | | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

* Specificare se inserzione, delezione ecc. ** Specificare se per trasformazione, elettroporazione, microiniezione, microincapsulazione, infezione ecc.

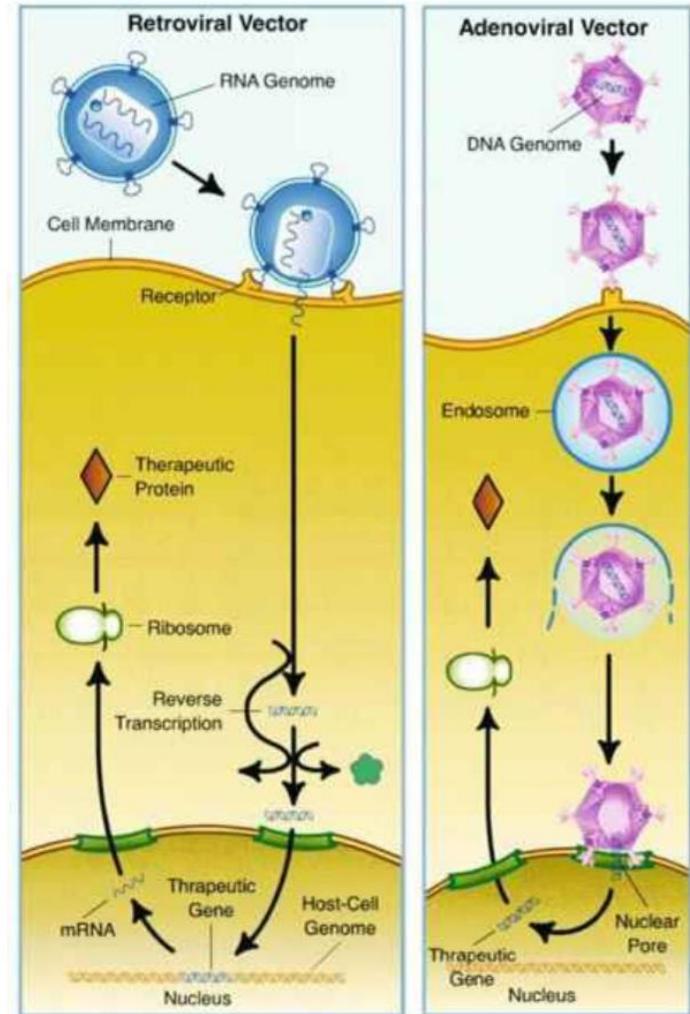
Vettori virali

Sono impiegati da lungo tempo per trasferire materiale genetico



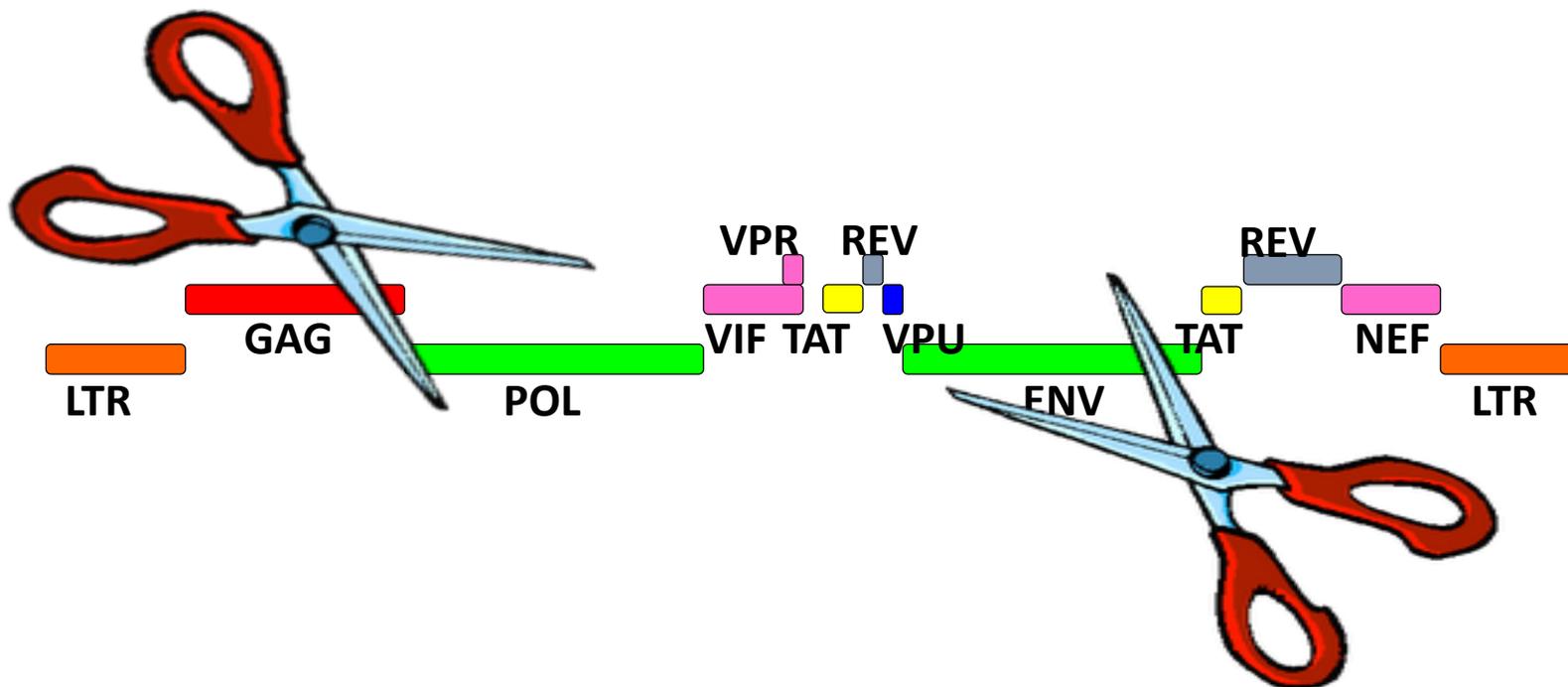
Download from Dreamstime.com
This watermarked image is for previewing purposes only.

68736220
Marina Efremova | Dreamstime.com



<https://www.europeanmedical.info/>

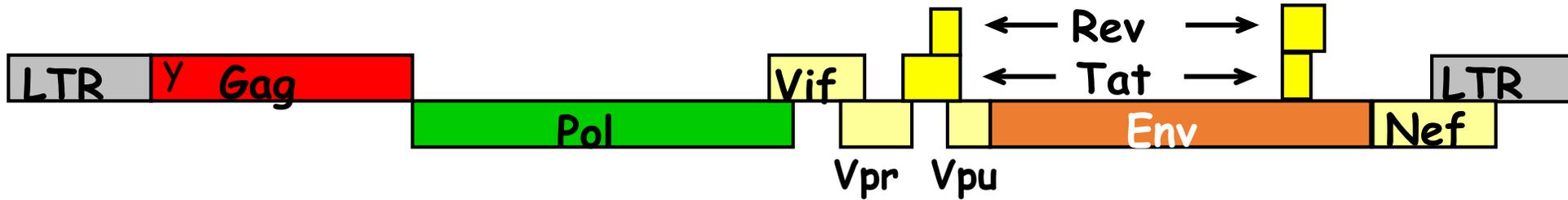
Miglioramento degli Standard di biosicurezza



I vettori lentivirali, derivano dal virus HIV, opportunamente modificato (della versione originale viene mantenuto solo il 10 per cento e non c'è alcun rischio che si riformi il virus): questo virus, molto aggressivo ed efficace nei confronti delle cellule umane, una volta "addomesticato" a sufficienza in tanti anni di lavoro, risulta un veicolo molto efficiente di geni terapeutici.

Eliminazione dal vettore delle proteine virali e separazione delle sequenze codificanti necessarie in più costrutti, per diminuire la probabilità di eventi ricombinativi che portano alla formazione di RCR (retrovirus competenti per la replicazione).

Tre generazioni di vettori lentivirali



HIV genome

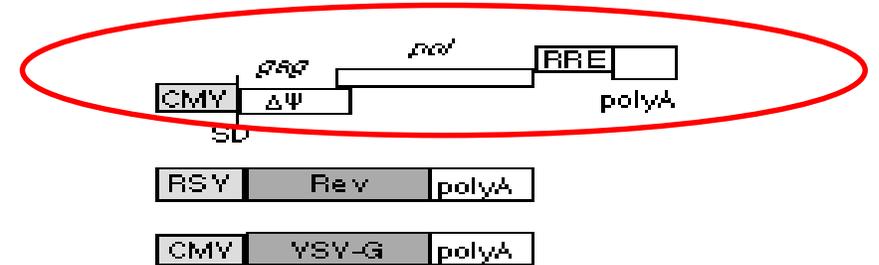
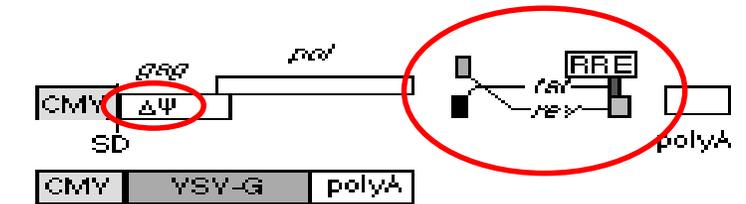
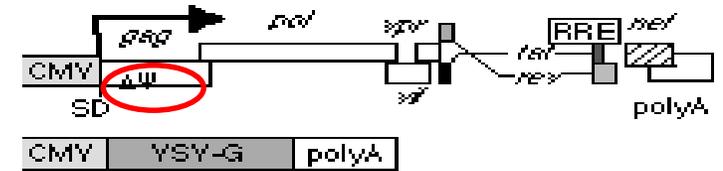
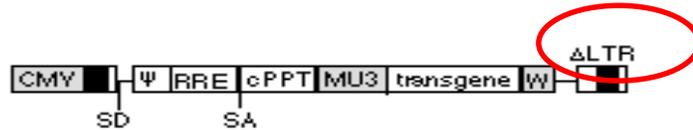
A
first generation
HIV vector system



B
second generation
HIV vector system



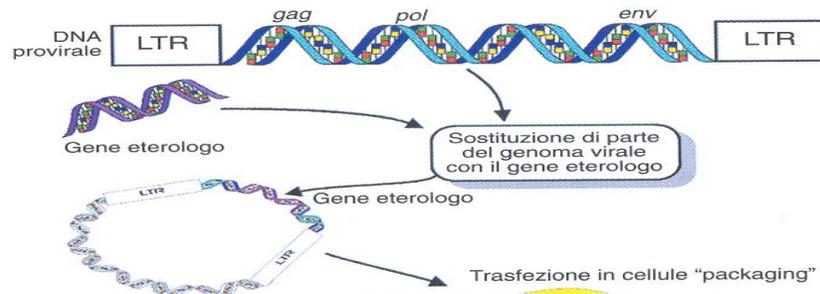
C
third generation
HIV vector system



Miglioramento degli Standard di biosicurezza

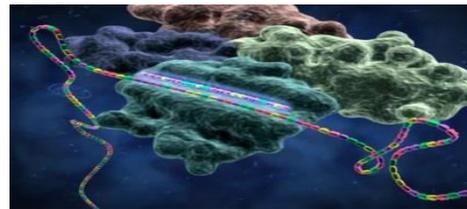
Attraverso tecniche di biologia molecolare è possibile lavorare con microrganismi/costrutti meno pericolosi per la salute dell'uomo e dell'ambiente, è possibile quindi ridurre il rischio di esposizione dell'operatore e utilizzare livelli di contenimenti più bassi rispetto a quelli previsti per i rispettivi microrganismi wild type.

Costrutti retrovirali per Terapia genica I generazione



Livello di biosicurezza 3

Costrutti lentivirali o adenovirali di ultima generazione



Livello di biosicurezza 2

Vettori lentivirali di terza generazione

Self-inactivating (SIN) vectors

- Deletion in the enhancer region of the 3' U3 of the long terminal repeat (LTR)
- Results in a transcriptionally inactive vector that can not be converted into a full length RNA
- Reduces likelihood of RCL regeneration
- Hampers mobilization by wild-type HIV
- May reduce risk of tumorigenesis via promoter insertion

Nella valutazione del rischio si deve tener conto di un possibile **recupero della competenza alla replicazione** da parte di vettori virali progettati per essere difettivi.

Ciò deve essere valutato in relazione ai sistemi di complementazione e alla possibilità di eventi di ricombinazione che permettano la ricostituzione di particelle virali capaci di replicarsi.

Nella valutazione del rischio per la produzione dei vettori lentivirali devono essere considerate tutte le possibili combinazioni dei plasmidi utilizzati

| <i>Packaging vector</i> | <i>Envelope vector</i> | <i>Transfer vector</i> |
|--|--|--|
| I-II- generazione | Non in grado di trasdurre cellule umane | Specificare promotore, geni e se si tratta di un costrutto SIN (self-inactivating) |
| III generazione con integrasi difettiva per l'integrazione | In grado di trasdurre cellule umane | Contenente geni non patogenetici (geni marcatori, geni terapeutici, geni regolatori) |
| III generazione con integrasi competente per l'integrazione | | Contenente geni con potenziale patogenetico (oncogeni o geni tossici) |

| Elenco dei MOGM risultanti dalla combinazione dei vettori <i>transfer, envelope e packaging</i> | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
| Specificare se la trasfezione è transiente o stabile. | | | |
| Effettuare un valutazione del rischio in relazione ai singoli vettori che saranno utilizzati. | | | |
| Valutare i diversi profili di biosicurezza in seguito all'impiego delle diverse combinazioni di vettori che si intendono utilizzare all'interno dello stesso disegno sperimentale. | | | |

Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs)

Regolamento n. 1394/2007 CE

In vigore dal 30 dic 2008



Terapia cellulare

Terapia genica

Ingegneria tessutale

Tali prodotti pongono numerose sfide, anche in ambito regolatorio e normativo.

- Le terapie avanzate comprendono **terapie cellulari**, **terapie geniche** e **terapie di ingegneria dei tessuti** che offrono soluzioni paziente-specifiche o per nicchie di pazienti e sono in grado di ristabilire funzioni fisiologiche compromesse, a volte con la correzione di mutazioni acquisite su base genetica. Per la prima volta non si tratta più di mitigare i sintomi di una condizione, ma di curarne le cause.
- Le ATMP rientrano nella definizione tecnica di farmaco e, devono sottostare alle stesse procedure e ai regolamenti previsti dagli enti preposti. A livello europeo l'ente di riferimento è l'European Medicines Agency (**EMA**), mentre l'Agenzia Italiana del Farmaco (**AIFA**) si occupa delle procedure per l'autorizzazione di nuovi farmaci nel nostro Paese.

Leadership dell'Italia, avendo sviluppato ben 3 delle 9 terapie avanzate attualmente in commercio in Europa.

Glybera (2012) primo prodotto di GT approvato per il trattamento della deficienza di LPL (AAV vector coding for LPL) → **GT**

Holoclar  (2015) primo prodotto approvato a base di cellule staminali -per deficit di cellule staminali limbari da moderato a grave (corneal tissue with autologous limbal stem cells for cornea regeneration)

Imlygic (2015) (oncolytic virus for melanoma) → **GT**

Strimvelis  (2016) per il trattamento di una grave immunodeficienza di origine genetica ADA-SCID: la prima terapia genica ex vivo con cellule staminali ematopoietiche approvata (**autologus CD34+ cells transduced** with a retroviral vector encoding human ADA cDNA sequence, for treating ADA-SCID children) → **GT**

Zalmoxis  (2016) (allogenic T cells genetically modified with HSV-TK) for treatment of GVHD within a haploidentical haematopoietic stem cell transplant for various types of blood cancer) → **GT**

Inquadramento regolatorio

Le **sperimentazioni cliniche** con ATMP devono essere conformi alla legislazione che disciplina l'autorizzazione delle sperimentazioni cliniche:

- sperimentazione clinica (**Dir.2001/20/EC**)
- autorizzazione europea al commercio (EMA) (**EU Reg.1394/2007**)
- GLP, GMP, GCP
- farmacovigilanza (**EU Reg.1394/2007**)
- Farmacopea Europea

ATMPs: procedura centralizzata obbligatoria

- Procedura centralizzata europea obbligatoria: una singola **autorizzazione al mercato** valida per tutta Europa
- Procedura di 210 giorni (con clock-stop): coinvolgimento di BWP, CAT, CHMP e autorizzazione finale di EC
- Due team di valutazione indipendenti all'interno dei comitati EMA.

Le sperimentazioni cliniche con ATMP devono essere conformi ai requisiti applicabili previsti da:

(**Dir.2009/41/EC**) sull'impiego confinato di MOGM

(**Dir.2001/18/EC**) sul rilascio deliberato di OGM

Requisiti Regolatori

Reg. (EC) 726/2004 sulla commercializzazione stabilisce che:

- **la Dir. 2001/18/CE (OGM) è applicabile ai farmaci ma solo per la valutazione del rischio ambientale (ERA)**
- nel modulo 2 del dossier (CTD) deve essere inserita la ERA
- per l'ERA, nella procedura centralizzata EMEA sono consultate le autorità nazionali competenti per la direttiva OGM

Direttiva 2001/20/EC sulla sperimentazione clinica non dà indicazioni su questa materia: perciò ciascuno stato membro è libero di applicare il rilascio deliberato oppure l'uso confinato

❖ **l'Italia applica l'impiego confinato di MOGM (D. l.vo 206/2001)**

SPERIMENTAZIONE CLINICA CON TG

Lo sponsor della sperimentazione clinica che si svolgerà in Italia deve chiedere due tipi di autorizzazione per il suo medicinale sperimentale per TG:

- per la sperimentazione clinica (ISS/AIFA)
- **per l'impiego confinato (Min. Salute / CIV)**

Le due procedure sono parallele ed entrambe necessarie

Sperimentazione clinica con medicinale sperimentale per TG

- Il rischio sarà determinato *caso per caso* in funzione del vettore, del materiale genetico trasferito, e della via di introduzione.
- **Classe 2 di impiego confinato**
 - Stanze di degenza in area protetta, con accesso controllato, simbolo di rischio biologico. Autoclave sul piano.....
- **Classe 3 di impiego confinato**
 - Stanze di degenza in depressione, filtri HEPA...Controllo per la presenza di virus ricombinanti nei liquidi biologici, autoclave passante. Percorsi in entrata e in uscita attraverso locali adibiti a spogliatoi e doccia ad ogni uscita.

Linee guida per l'**Environmental Risk Assessment (ERA)** (per gli operatori, i familiari e per l'ambiente, non per il paziente)

GTWP/EMA ha emesso una linea guida che fornisce i principi scientifici per l' ERA:
"Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products"

(EMA/CHMP/GTWP/125491/2006)

I principi scientifici sono sostanzialmente gli stessi che vengono presentati nelle notifiche per il d.lvo 206/2001 nella valutazione che porta alla scelta della classe di impiego confinato

RISCHI PRINCIPALI per ATMP

 Trasduzione linea germinale: inaccettabile (dir. 2001/20 sulla sperimentazione clinica)

Mutagenesi inserzionale → oncogenesi

*(In passato, con costrutti lentivirali di **prima generazione** si è visto che in alcuni casi l'inserzione poteva avvenire vicino a un gene "delicato" perché coinvolto nella regolazione della crescita cellulare: questo poteva tradursi nell'attivazione del gene e in una crescita incontrollata della cellula, che in alcuni casi nel tempo ha portato alla leucemia).*

Vettore capace di replicazione → lisi cellule bersaglio / **disseminazione/ shedding**

Virus oncolitici → **replicazione ectopica.**

vengono ingegnerizzati per potersi replicare attivamente e in modo specifico nelle cellule tumorali, determinandone la lisi

Transgene e/o vettore immunogenici → riduzione dell'efficacia clinica / immuno-tossicità

Espressione disregolata del transgene → tossicità/ riduzione dell'efficacia clinica

L'ambito di applicazione del Dlgs 206/01 non è stato esteso all'uso confinato di piante e animali geneticamente modificati ma nei suoi Allegati sono previste le misure minime di contenimento da adottare.

| GM-PLANTS and ANIMALS | | |
|-----------------------|-----------|----------------|
| | First use | Subsequent use |
| Requirements | | |
| Comments | | |
| | | |
| | | |
| | | |

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:

Strutture

| | Specifiche | Livelli di contenimento 1 | Livelli di contenimento 2 | Livelli di contenimento 3 | Livelli di contenimento 4 |
|---|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 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 |

Note

(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.

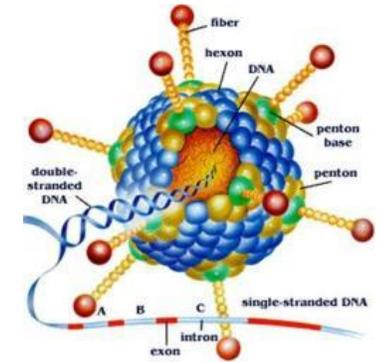
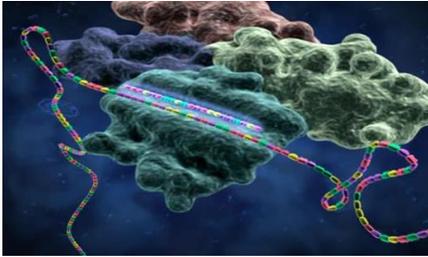
(2) Strutture per animali: una struttura impiegata normalmente per ospitare animali da stabulare, da allevare o da esperimento o che viene utilizzata per effettuare piccoli interventi chirurgici

(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.

Quali sono i riferimenti normativi e principi da applicare per le misure di contenimento di OGM ?

- OGM impiegati in ambiente confinato sono destinati ad essere impiegati unicamente in attività in cui si attuano misure rigorose e specifiche di confinamento atte a limitare il contatto di questi organismi con la popolazione e con l'ambiente e per garantire un livello elevato di sicurezza per questi ultimi, ai sensi dell'art.3, lettera d), punto 2 del decreto legislativo 8 luglio 2003, n.224.
- Viene effettuata dal Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare l'attività di vigilanza sulla base delle segnalazioni pervenute e ha lo scopo di verificare l'applicazione delle misure di confinamento e il rispetto dei requisiti in materia di etichettatura ai sensi dell'articolo 28 del suindicato decreto.
- **Le misure di confinamento si basano sugli stessi principi di confinamento stabiliti dal decreto legislativo 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 (MOGM).**
- Per l'impiego in ambiente confinato di OGM, intesi come organismi pluricellulari è opportuno ricordare che non è prevista e non è necessaria l'autorizzazione. Infatti, il Decreto legislativo 12 aprile 2001, n.206 si applica solamente all'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati, ma se si fa uso di Mogm in animali o in piante sarà necessario notificare lo stabulario o la serra per l'impiego confinato di tali Mogm.

Utilizzo di adenovirus e virus adeno-associati per over-esprimere l'espressione di specifici geni in modelli animali



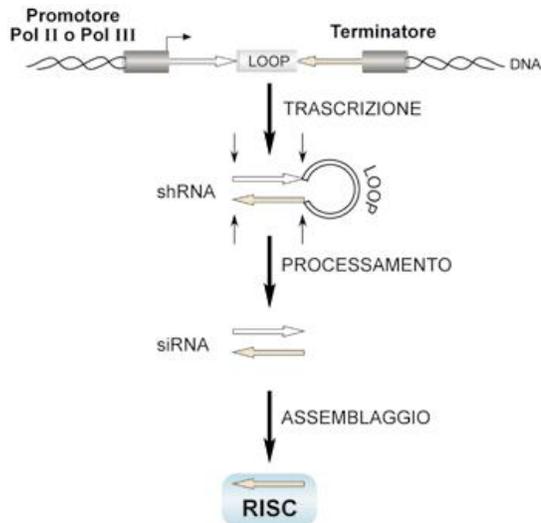
Gli siRNA possono essere introdotti nelle cellule sia direttamente per trasfezioni, sia generati da taglio endogeno di short hairping RNA (shRNA) tradotti da costrutti di espressione

Gli adenovirus o virus adeno-associati contenenti siRNA di interesse vengono inoculati nei roditori di laboratorio tramite micro iniezione intracraniale in specifiche aree del cervello per analizzare gli effetti della soppressione dei geni bersaglio, valutando eventuali modificazioni comportamentali e/o fenotipiche specifiche nel tessuto neuronale cerebrale.

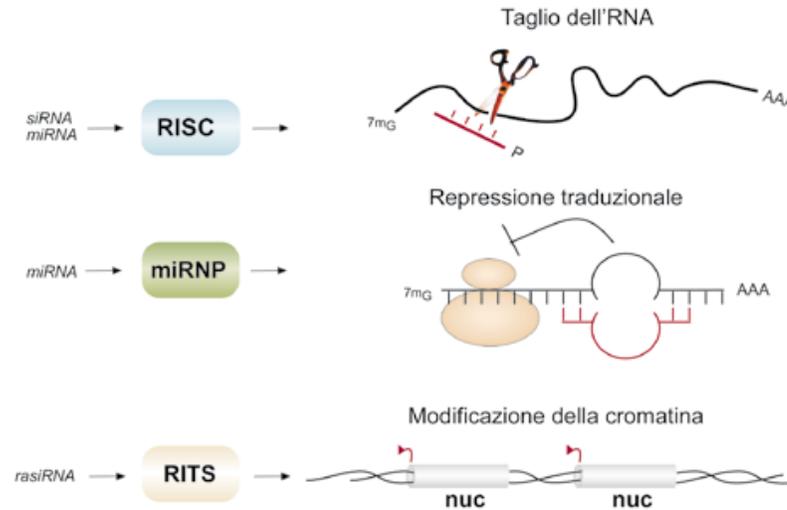


Vettori per l'espressione di siRNA *in vivo*

FASE DI INIZIO



FASE EFFETTRICE



Taglio e degradazione dell'mRNA cellulare complementare al siRNA. L'elicasi del RISC separa i due filamenti di siRNA, le sequenze del filamento antisense identificano l'mRNA complementare e unendo l'endoribonucleasi del RISC degrada l'RNA messaggero bersaglio.

L'efficacia di siRNA sintetici o espressi come shRNA contro diversi mRNA di HIV, o di cofattori cellulari, è stata saggiata in sistemi cellulari *in vitro* e nella maggior parte dei casi si è ottenuta un'efficace repressione degli specifici target.

Problematiche nell'impiego di questa strategia *in vivo*: i) l'alto tasso mutazionale del virus; ii) la somministrazione delle molecole terapeutiche nell'esatto distretto cellulare; iii) la non ancora definita tossicità di questo trattamento *in vivo*.

Ciononostante esistono a tutt'oggi molte richieste di test clinici per l'uso di siRNA sintetici o di vettori esprimenti shRNA in numerose patologie.

Valutazione del rischio

Nei laboratori destinati alla manipolazione di MOGM sono impiegati solo vettori virali geneticamente difettivi, non replicativi :

- non si integrano nel genoma dell'ospite;
- sono privi di capacità infettante;
- sono replicazione-incompetenti;
- permangono per poche settimane (1-5), transienti;
- non contengono i geni di patogenicità.

Per l' operatore:

-  le procedure eseguite nei laboratori destinati alla manipolazione dei suddetti virus non prevedono l'uso di materiali taglienti;
-  la manipolazione del virus GM avviene sotto cappa a flusso laminare di classe IIA dotata di due filtri assoluti;
-  l'operatore indossa tutti i dispositivi di protezione individuale (DPI) previsti;
-  deve essere inoltre adottato un programma di monitoraggio sanitario e controllo veterinario per stabilire lo stato microbiologico degli animali nello stabulario.

DPI

- Occhiali
- Camici usa e getta o lavabili e disinfettabili
- Grembiuli sterili durante la chirurgia
- Guanti
- Sovrascarpe
- Cuffie
- Maschere per polveri nello stabulario

Personale di laboratorio seguirà procedure precauzionali per evitare eventi dannosi derivanti dal contatto fisico con gli animali o da attività di laboratorio (campionamento di sangue, interventi chirurgici, necropsia o manipolazione di materiale biologico di origine animale)

Salute animali

- gli animali non sono geneticamente modificati;
- gli animali inoculati sono mantenuti nel laboratorio stesso, adibito parzialmente a stabulario secondo le leggi vigenti;
- i roditori soppressi sono posti in idonei contenitori e in seguito inceneriti.

Ambiente

tutti i rifiuti, oggetti o strumenti, che vengono in contatto con i vettori virali GM sono inattivati tramite sterilizzazione in autoclave o, se è possibile mediante agenti disinfettanti, prima dell'eventuale incenerimento.

OGM destinati ad impieghi in ambiente confinato

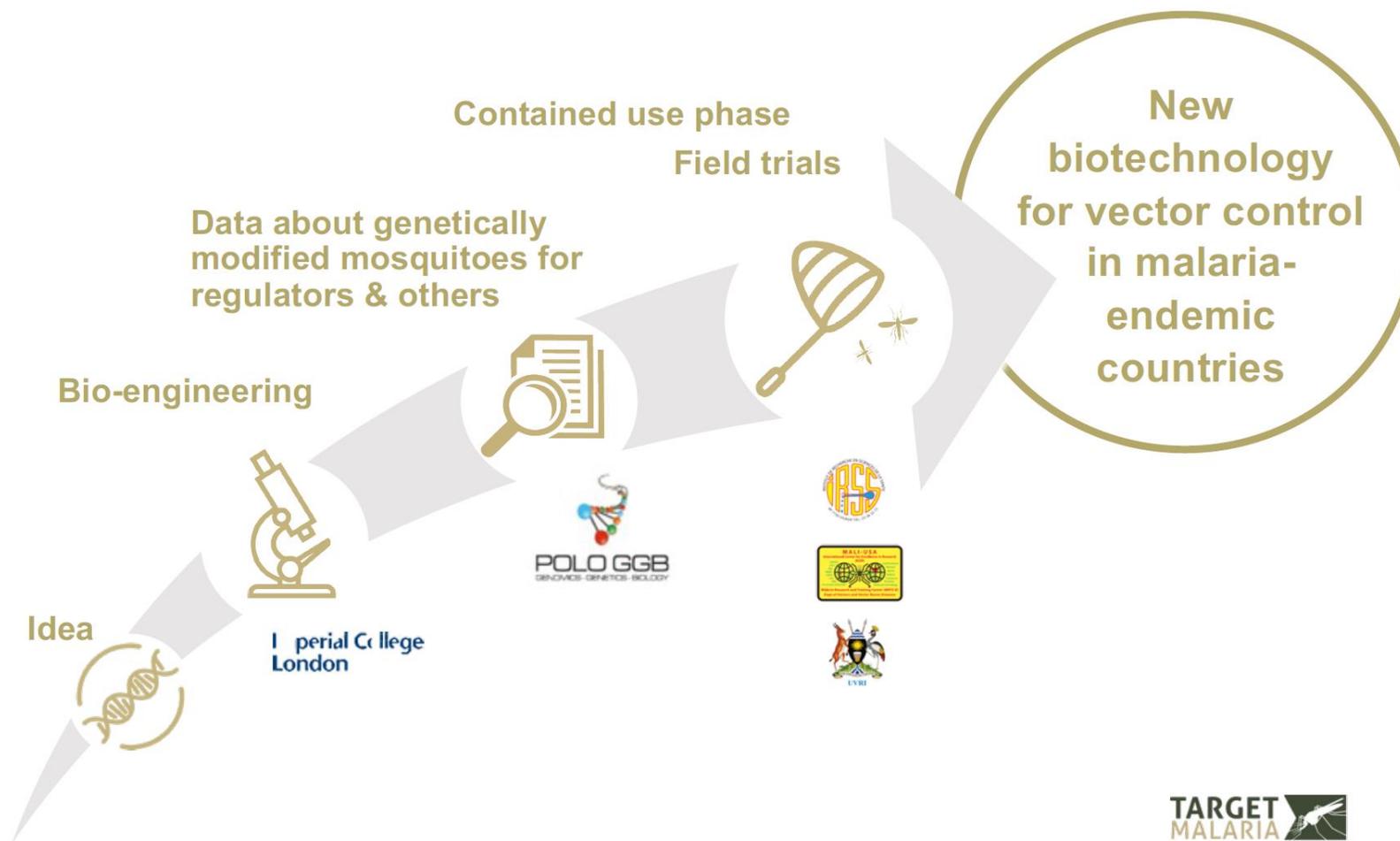
- ❖ Solo nel caso in cui è previsto l'impiego confinato di OGM, prodotti presso altre strutture autorizzate, e non manipolati, non è prevista autorizzazione.

In questo caso, gli utilizzatori di OGM in ambiente confinato, possono su base volontaria rivolgersi all'Autorità competente MATTM per chiedere una **verifica dell'idoneità delle misure di confinamento** adottate. In questi casi il MATTM, richiede all'utilizzatore di fornire tutte le informazioni utili per tale verifica e successivamente le trasmette all'ISPRA per avere un parere tecnico in merito.

L'Ispra è coinvolta in quanto, il DM n. 58 del 1/3/2018, le ha trasferito le funzioni di supporto al MATTM già esercitate dalla Commissione interministeriale di valutazione di cui all'articolo 6 del D.lgs 224/2003.

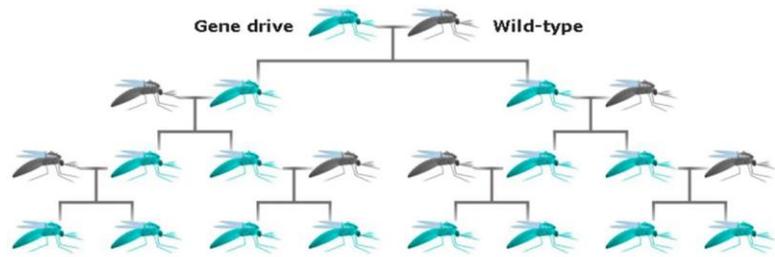
Sperimentazioni con zanzare (*Anopheles gambiae*) geneticamente modificate

From the idea to a new vector control tool



Sono utilizzate zanzare della specie *Anopheles gambiae*, insetto vettore della malaria, modificate **al fine di ridurre il numero delle femmine nella popolazione di zanzare target** attraverso due approcci: producendo solo zanzare maschi o compromettendo la fertilità delle zanzare femmine.

Per diffondere le modificazione da alcuni individui a tutta la popolazione viene utilizzato un meccanismo genetico definito **“gene drive”**.



Quando un organismo che possiede un *gene drive* con attività endonucleasica (blu) si accoppia con un organismo di tipo selvatico (grigio), il *gene drive* è ereditato in maniera preferenziale da tutti i figli. Ciò consente al *gene drive* di diffondersi in tutti gli individui della popolazione.

L'idea di utilizzare il fenomeno del gene drive per controllare le popolazioni di organismi vettori di malattie infettive (come ad es. la zanzara portatrice della malaria) risale alla metà del secolo scorso ma è solo con l'avvento delle moderne tecnologie di genome editing, e in particolare con l'introduzione del sistema CRISPR/Cas, che è diventato possibile realizzare il gene drive in modo efficiente, preciso e prevedibile.

L'impiego di zanzare GM, valutando i potenziali fattori di rischio derivanti da insetti geneticamente modificati non infetti da un patogeno, è stato **classificato di rischio 2 e pertanto il livello di contenimento richiesto è il 2.**

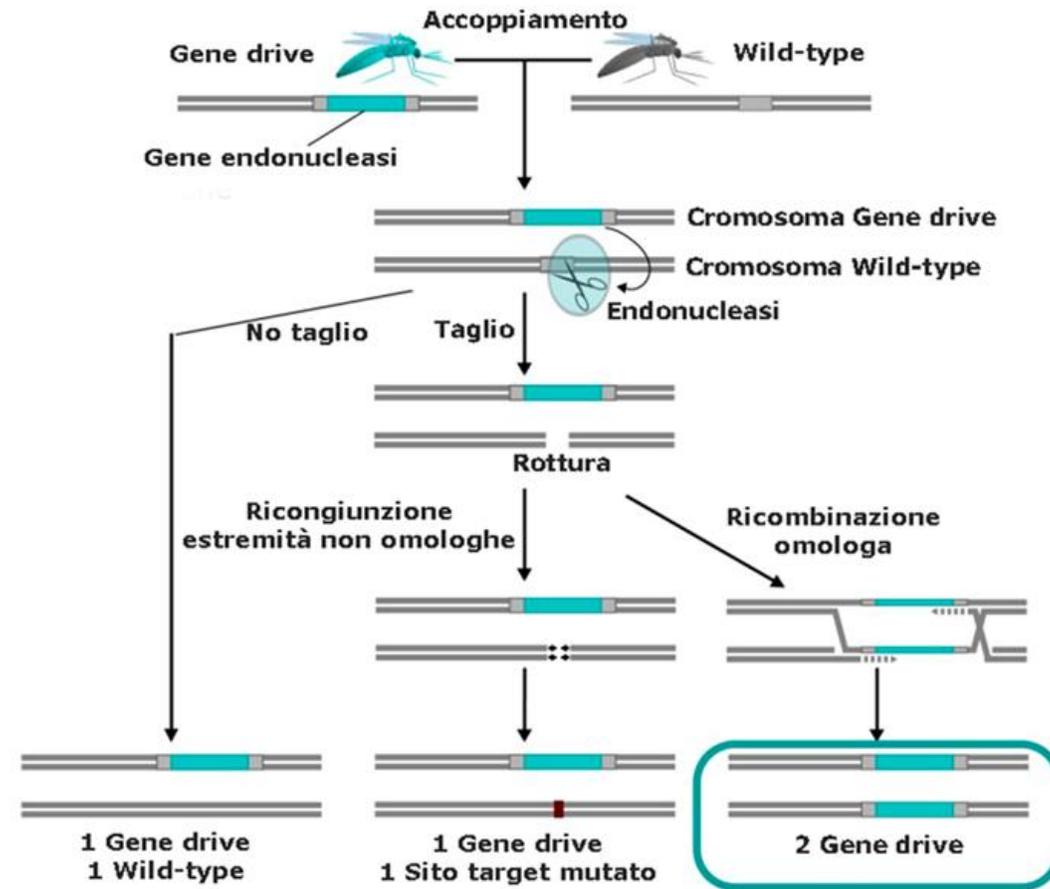
L'attuale quadro normativo europeo (2009/41/CE) e italiano (D. Lgs 206/01) prevede i requisiti per le misure di contenimento applicabile a qualsiasi lavoro sperimentale con microrganismi, piante o animali geneticamente modificati.

Tuttavia, tali misure di contenimento non sono specifiche per gli artropodi GM per cui sono state utilizzate anche tecniche di contenimento specifiche per gli **artropodi ACL 2** definite da esperti e istituzioni scientifiche internazionali.

Con il sistema CRISPR/Cas il gene drive è costituito da un costrutto di DNA (transgenico), contenente le sequenze codificanti per la nucleasi e per l'RNA guida (sgRNA), inserito nel gene che si vuole modificare.

In questo modo, quando l'organismo transgenico contenente il gene drive si incrocia con un organismo selvatico, la nucleasi, guidata dall'sgRNA, taglia la copia selvatica del gene e il cromosoma contenente il costrutto viene utilizzato come stampo per la riparazione del cromosoma omologo, risultando in due copie con la versione mutata del gene.

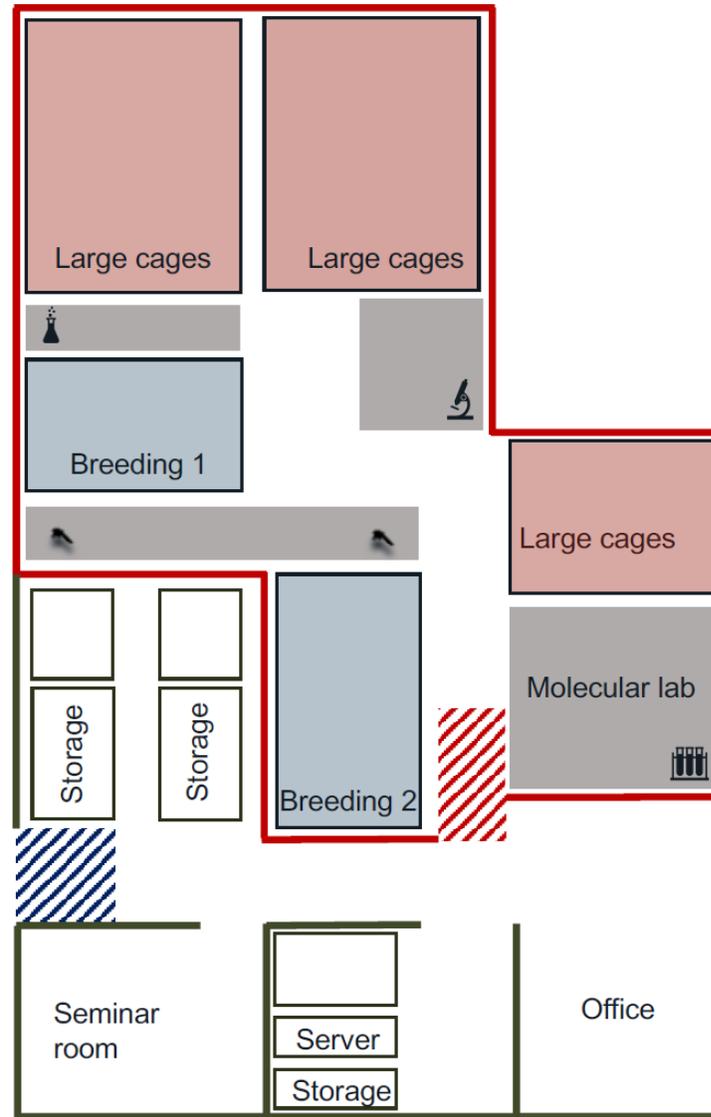
Se nel costrutto è presente anche una sequenza genica il gene drive può introdurre anche una nuova funzione oltre ad inattivare il gene in cui è inserito. In questo modo la progenie, che avrebbe dovuto essere portatrice di una sola copia mutata del gene, risulta portatrice di due copie mutate e può trasmettere l'allele mutato con il gene drive al 100% della sua progenie nell'incrocio successivo. Il processo di "taglia e incolla" si ripete ad ogni generazione e si autosostiene, assicurando così la diffusione dell'allele mutato nella popolazione



The facility

The contained facility in Terni hosts a new laboratory for **ecological and genetic study** of malaria vectors.

Biosafety level BSL2
and arthropod
containment level **ACL2**



Insectary

Ultra-modern insectary :

- > Mosquito repository
- > Ecology platform
- > Molecular laboratory



Legal framework for ACL2+ insectaries in Italy

International law

- Cartagena Protocol on Biosafety

European law

- Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of GMOs
- EU Regulation 1946/2003 on the transboundary movement of GMOs (implementation of Cartagena Protocol)
- Directive 2009/41/EC on the contained use of GMMOs
- Directive 200/54/EC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work

Italian law

- D. lgs. 206/2001 on the contained use of GMMOs
- D.lgs. 224/2003 on the deliberate release into the environment of GMOs
- D.lgs. 81/2008 on work health and safety

Authorisations and opinion

➤ Notifica di impianto:

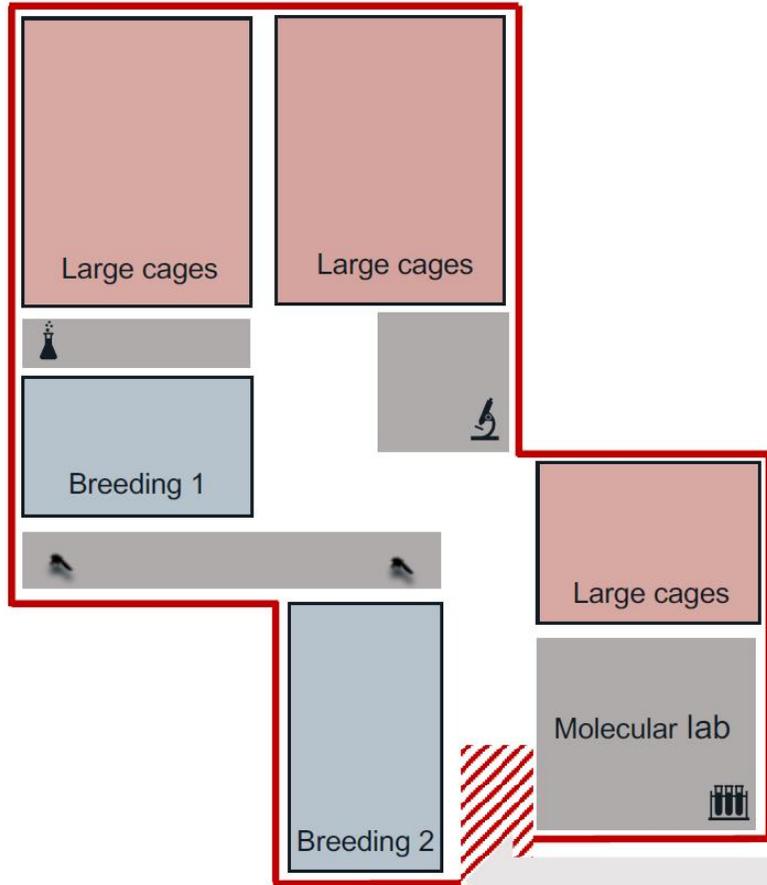
Authorization from the Ministry of Health in Italy to operate at ACL2 & BSL2

- Field of application: Contained Use of GMMOs and GMOs
- Duties of operators: assess risks; assign the contained use to class 2
- Active from 25.07.2017

➤ Authorisation from Ministry of Health to import African wild type colonies

➤ Official Opinion from ISPRA – Ministry of Environment: positive response on the contained use of GMOs in CRF-TR (Date:29.10.2019)

Insectary access



BSL2/ACL2 area is through a room with a double door filter called vestibule

Repository



- Two environmental chambers for mosquitoes rearing in small and medium size cages



Il ruolo principale svolto dal laboratorio di ecologia e genetica consiste **nell'allevamento di popolazioni di zanzare wild type e GM**, quest'ultime provenienti da un laboratorio inglese, al fine di verificare, in un ambiente confinato che riproduce fedelmente le condizioni climatiche delle zone in cui la malaria è endemica, le caratteristiche e la competitività delle linee di zanzare che esprimono gene drive.

Large cages



Large cages



> The environment mimics tropical condition

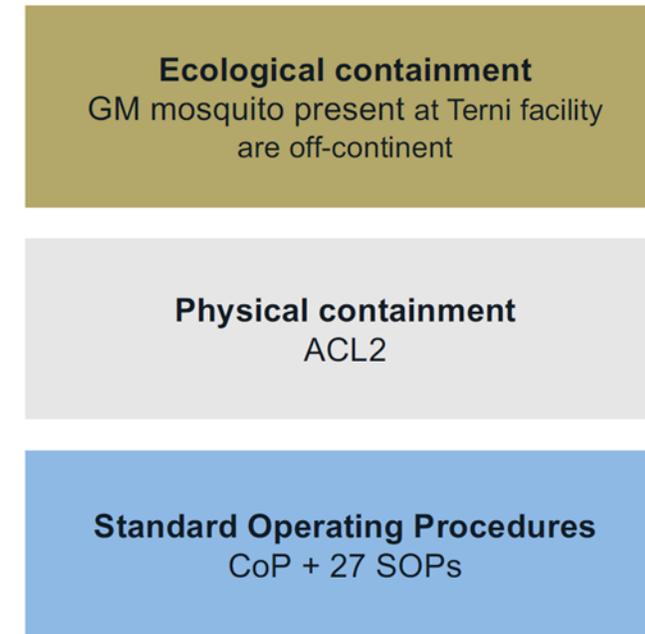
Particolare attenzione deve essere prestata durante tutte le fasi del lavoro in insettario al fine di prevenire il rilascio di zanzare dal contenimento primario.

Sono quindi previste misure di confinamento fisico garantite da: la struttura del laboratorio, l'implementazione delle procedure operative, l'organizzazione del laboratorio e la gestione dei rifiuti funzionali al fine di ridurre al minimo la possibilità che le zanzare geneticamente modificate possano essere rilasciate accidentalmente o deliberatamente nell'ambiente.

L'efficacia delle misure di contenimento è regolarmente controllata da trappole per zanzare collocate all'interno di ogni stanza del laboratorio così come nel vestibolo, negli uffici, e all'esterno nelle vicinanze dell'edificio. Specifici protocolli in uso all'interno del laboratorio includono esami molecolari da effettuare sugli insetti raccolti dalle trappole per vedere quali e quanti zanzare sono state catturate in modo da regolare (e gradualmente perfezionare) le procedure di contenimento vigenti. Le misure di contenimento fisico sono adattate alle esigenze della gestione ordinaria. Tuttavia, nella valutazione dei rischi è stato preso in considerazione anche uno "scenario estremo" quale, ad esempio, un incendio o un terremoto distruttivo.

Ulteriore misura di contenimento è quello geografico in quanto la specie *Anopheles gambiae* è tropicale e non è in grado di colonizzare regioni climatiche temperate. Infatti, nonostante la continuità territoriale con l'Africa tropicale, queste zanzare non sono presenti nelle regioni temperate (mediterranee) del Nord Africa. Si può ritenere che in caso di "disastri strutturali durante i mesi estivi", le zanzare rilasciate accidentalmente non sono in grado di riprodursi nell'ambiente per un lungo periodo a causa della inidoneità climatica a breve termine di Terni. In caso di rilascio accidentale, si può con certezza affermare che le suddette zanzare non sarebbero in grado di riprodursi a lungo e non potrebbero in ogni caso superare la stagione invernale.

Containment



- > Location
- > Infrastructure
- > Procedures



I progetti di ricerca e formativi realizzati dal dit

Sono stati realizzati progetti innovativi e di rete in collaborazione tra Istituzioni, scuola, organismi pubblici e privati di ricerca e territorio al fine di promuovere la cultura scientifica e tecnologica e della sicurezza sul lavoro nel settore delle Biotecnologie e nell'agroalimentare per il raggiungimento in maniera trasversale degli obiettivi dell'Agenda 2030 sullo Sviluppo Sostenibile dell'Onu.





Avvicinare il mondo della Ricerca a quello della Scuola

Biotechnologie (MOGM-OGM) Ricerca e comunicazione

Importanza di una Comunicazione Scientifica corretta

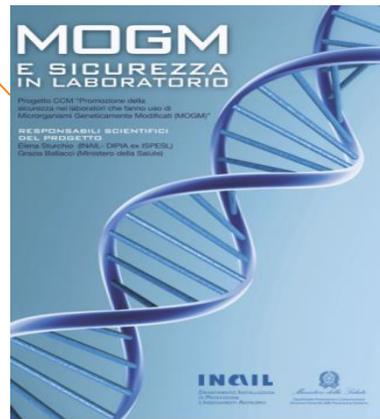


Il Quaderno informativo "OGM e Sicurezza alimentare" è presente in molte biblioteche scolastiche.

LE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE: COSA SONO E COSA NON SONO



Laura Nicolini¹ ed Elena Sturchio²
¹Servizio Biologico, ISS
²Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti ed Insediamenti Antropici (CIT), INAIL



Il Manuale dal titolo "MOGM e sicurezza in laboratorio" ed il relativo CD.



INAIL

Creazione di un network per la corretta Comunicazione del Rischio in tema di Biotecnologie

- sviluppare una nuova strategia a lungo termine per favorire il **dialogo** tra gli attori coinvolti nel processo di innovazione e ricerca

- favorire **percorsi di valorizzazione** delle attività di ricerca (tecnologie e competenze) nella scuola e nell'industria

- mettere a sistema strumenti e obiettivi finora raggiunti di **sostegno all'innovazione ed alla ricerca**.

- promuovere la cultura scientifica e tecnologica e della sicurezza sul lavoro per il raggiungimento in maniera trasversale degli **obiettivi dell'Agenda 2030 sullo Sviluppo Sostenibile dell'Onu**

- promuovere **strategie educative innovative in ottica Vision Zero**

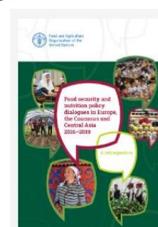


Progetto Sportello per la Sicurezza nell'Agroalimentare e lo Sviluppo Sostenibile www.innsite.it

Collaborazione con ISS, Comitato per lo Sviluppo della Cultura Scientifica e Tecnologica, Miur e con DGPREV e DGISAN - Ministero della Salute

Progetto SPAIC: Cause dello spreco alimentare e interventi correttivi
Realizzazione di toolkit SPAIC

Progetto FAO: Consolidating School Food and Nutrition Approaches in Europe and Central Asia – Selezionato SPAIC come *best practice*

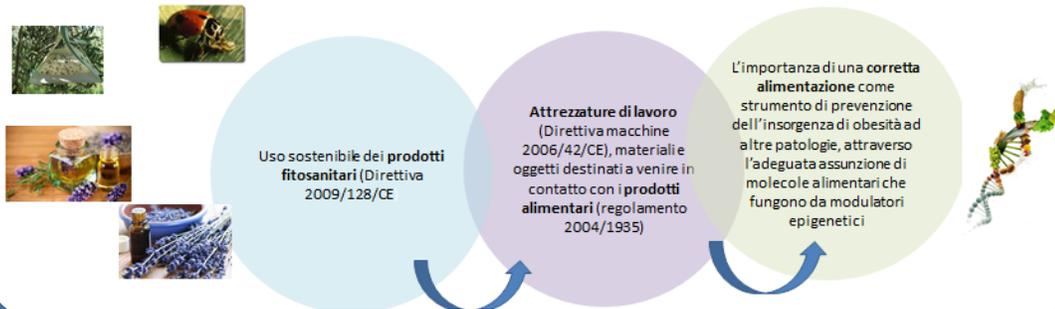


Biotecnologie e corretti stili di vita per la **tutela delle fragilità dei giovani e del territorio**.



<https://biotechweek.org/impressions-biotech-week-2019/>

Attività di informazione, formazione e realizzazione di laboratori dimostrativi per il trasferimento delle attività di ricerca alle **Scuole** e alle **Imprese del Settore Agroalimentare** con l'obiettivo di contribuire all'aumento di conoscenze e tecnologie per la **salvaguardia dell'ambiente, della sicurezza e della salute dell'operatore** e migliorare la **qualità degli alimenti** e la **salute del consumatore**



Progettazione e costituzione di una Rete per la realizzazione del Progetto Erasmus Plus per lo scambio delle buone pratiche, approvato dalla comunità Europea nel luglio 2018. Partecipazione a due transnational meeting e due mobility del **Towards Inclusive Education Project**



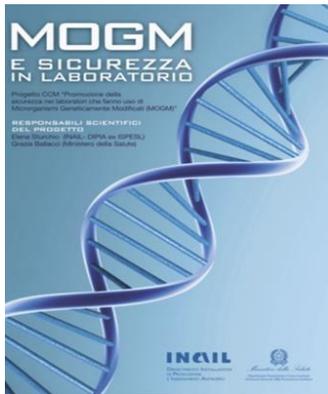
Progetto CCM 2009 e CCM 2011 "Promozione della sicurezza nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM)"



E' stato realizzato, dai ricercatori dell'INAIL ex ISPESL, un Cd-rom multimediale e interattivo corredato da un manuale relativo alla sicurezza nei laboratori che fanno uso di MOGM, il cui intento è quello di offrire agli operatori biotecnologici un valido strumento operativo che riassume in sé la formazione, l'informazione, la divulgazione fin dalle scuole superiori e l'interattività delle principali problematiche attinenti al settore delle biotecnologie. Il Cd-rom evidenzia in maniera chiara ed esaustiva i processi lavorativi e le misure di controllo atte ad evitare o minimizzare il rilascio di MOGM nei luoghi di lavoro e nell'ambiente ed espone dettagliatamente la procedura di valutazione dei rischi correlati con l'impiego confinato di MOGM in conformità alla Direttiva 2009/41/CE.



Livello di biosicurezza 2



Livello di biosicurezza 3

Ricerca Scientifica INAIL 2020: Prevenzione e tutela della salute e dell'ambiente nei laboratori di Atenei e Aziende ospedaliere che utilizzano metodiche biotecnologiche avanzate e innovative per promuovere la crescita delle competenze e la cultura della sicurezza.

La parola chiave dell'attività, quindi, è la promozione della Sicurezza intesa come attuazione di un processo sistematico complesso che presupponga incrocio di competenze, tecniche e scientifiche, molto diversificate dal punto di vista disciplinare, ma con l'obiettivo comune e non rinunciabile di unire tutti gli sforzi finalizzati alla razionalizzazione ed al miglioramento degli ambienti di lavoro.

Da qui l'importanza di:

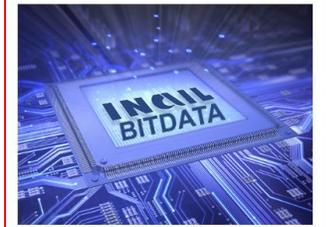
1. **connettere** molteplici competenze;
2. **creare** uno strumento che metta in rete le diverse competenze;
3. **verificare** e sviluppare strumenti e dispositivi innovativi al fine di ridurre l'esposizione del lavoratore, nel caso di carenze impiantistiche di strutture obsolete;
4. **formare e sensibilizzare** il lavoratore tenendo conto che il comportamento del lavoratore è il nodo cruciale del processo di sicurezza.



<https://youtu.be/7g2pdFBYAyg>

Il progetto pilota intende costituire un modello operativo replicabile da esportare in tutte le realtà degli Atenei e Aziende ospedaliere a livello nazionale, attraverso:

- ❑ la creazione di una **rete tra RSPP e ricercatori degli Atenei e delle Aziende ospedaliere** universitarie e Istituzioni.
- ❑ lo sviluppo e messa a disposizione della rete di RSPP di una **piattaforma digitale**.
- ❑ la produzione da parte degli esperti di protocolli di biosicurezza, preventivamente condivisi con l'Autorità Competente, **su tematiche emergenti** in tema di applicazioni biotecnologiche.
- ❑ la produzione di **materiale multimediale innovativo**, al fine di trasmettere messaggi prevenzionistici in maniera più semplice e chiara anche ai non esperti del settore (es: ai giovani che si alternano ciclicamente nei laboratori didattici).
- ❑ lo **sviluppo di specifici dispositivi ingegneristici adeguati a contenere e minimizzare l'esposizione** ad agenti biologici da utilizzare come utili misure di contenimento alternative nel caso di carenze impiantistiche di vecchie strutture, o per monitorare *in continuum* il benessere lavorativo (es.: biosensoristica, specifici sistemi di gestione...).
- ❑ **l'utilizzo e la rianalisi (meta-analisi) della nuova Banca dati molecolare INAIL (BiTdata)** che ha preso in esame Piattaforme Informatiche Internazionali, che mettono a disposizione dataset completi dei principali cambiamenti genomici in seguito ad esposizione occupazionale ad agenti fisici chimici e biologici, quale utile strumento a fini prevenzionistici e di aggiornamento professionale.



Stanziate 50mila ore di calcolo sul supercomputer Galileo.

Progetto Inail bioinformatico Elixir, dal titolo: "Transcriptomes profiling after xenobiotics exposure to identify early biomarkers for differential diagnosis in lung and mesothelial cancer", che si trova nella prima fase di attività, il supercomputer dedicato al calcolo scientifico e ingegneristico ospitato presso il Cineca.

L'impatto previsto più rilevante della proposta è, quindi, la **realizzazione del Primo Network Italiano, tra Istituzioni, Università, Enti di ricerca, Aziende ospedaliere, IRCCS e l'Autorità Competenti**, come piattaforma di scambio e di dialogo in tema di prevenzione e sicurezza nel settore biotecnologico.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Elena Sturchio
e.sturchio@inail.it



**ANCHE QUESTO
È INAIL.**

PARTNERSHIP

TECNOLOGIA

PROGETTAZIONE

INAIL

**LA RICERCA È IL PRIMO PASSO PER RENDERE
GLI AMBIENTI DI LAVORO PIÙ SICURI.**

Dalle necessità dei lavoratori prendono vita i progetti che Inail realizza con importanti enti e istituti di ricerca per prevenire il rischio di infortuni e malattie professionali nei luoghi di lavoro. Scopri di più su [Inail.it](https://www.inail.it).

INAIL, la persona al centro del nostro impegno

INAIL