

Normativa sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati

- 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.

- 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 nuovo decreto supera, abrogandolo, il Decreto Legislativo 3 Marzo 1993 n. 91, che recepiva la precedente direttiva.
- Il presente Decreto stabilisce le misure per l'impiego confinato dei MOGM, volte a tutelare la salute umana dell'uomo e dell'ambiente.

D.L.vo 206/01:Attuazione della Direttiva 98/81/CE

Misure per l'impiego confinato dei microrganismi geneticamente modificati, volte a tutelare la salute dell'uomo e l'ambiente

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 (cioè non DNA-ricombinante)
- I mogm ottenuti tramite autoclonazione (self-cloning), purchè non patogeni per l'uomo, animali o piante.

D.L.vo 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 ricombinati** (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 presso il quale viene istituita una Commissione Interministeriale di Valutazione composta da:

- Direttore Generale del Dip.to Prevezione del Min.Sal. presidente
- 11 rappresentanti dei Ministeri dell'ambiente, delle politiche agricole e forestali, del lavoro e previdenza sociale, dell'industria, commercio e artigianato, dell'interno, dell'università e della ricerca scientifica e tecnologica, e della Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le regioni e le provincie autonome.
- 11 esperti di comprovata competenza scientifica: esperti dell'Istituto superiore di sanità, dell'Istituto superiore per la prevenzione e la sicurezza del lavoro, dell'Agenzia nazionale per la protezione ambientale e dell'Agenzia nazionale per la protezione civile.

Tutte le notifiche, sia di impiego che di impianto, devono essere presentate al
Ministero della Salute

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.

La valutazione dell'impiego

- 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. L.vo 626/94, 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. L.vo 626/94 si classificano in gruppi di rischio gli agenti biologici, l'oggetto della classificazione non sono i MOGM bensì gli impieghi previsti.

- 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 rischio, cioè di impiego confinato del MOGM

- 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

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
- 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

- **Individuazione del livello di rischio associato al MOGM:** l'utilizzatore può fare riferimento a normative nazionali e comunitarie pertinenti, in particolare alla 626, 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.

- **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 un delle 4 classi.**

- 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.

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, da identificarsi con il datore di lavoro ai sensi del D. L.vo 626/94 (e successive modificazioni).
- 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.

NOTIFICA DI IMPIEGO

- La notifica di impiego di un determinato MOGM (con indicazione del microrganismo ricevente -o ospite-, del tipo di inserto e dell'eventuale vettore utilizzato) viene presentata dall'utilizzatore.
- 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.

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
- 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

Terapia genica

- Approccio terapeutico basato sulla modificazione del materiale genetico delle cellule viventi in vista di scopi diagnostici, terapeutici e di prevenzione.

Possibili geni terapeutici

- **Geni codificanti:**

- geni sostitutivi di una funzione cellulare mancante

- geni in grado di modulare una funzione cellulare

- geni in grado di produrre una proteina che viene secreta

- Geni che inducono apoptosi

- Geni che inducono il riconoscimento della cellula da parte del sistema immunitario

- **Geni che codificano per proteine con fini vaccinali**

- **Geni che codificano per anticorpi intracellulari**

- **Ribozimi**

- **RNA o DNA che competono per il legame di proteine cellulari**

Tecniche di trasferimento genetico

Il successo di un approccio di terapia genica è strettamente dipendente dall'efficacia con cui il trasferimento del gene terapeutico avviene.

Strategia	Geni terapeutici
Trasferimento di geni per citochine immunoregolatorie	IL2, IL12, IL7, IL4, GM-CSF
Trasferimento di geni per proteine immunogeniche	Antigeni MHC classe I e II Antigeni tumore-specifici
Trasferimento di geni che bloccano la proliferazione	p53,p16
Trasferimento di geni che attivano un profarmaco tossico	Timidino chinasi di HSV-1 (+ganciclovir) Citosina deaminasi (+5-fluoro citosina)
Trasferimento di geni che migliorano l'indice terapeutico della chemioterapia	mdr-1

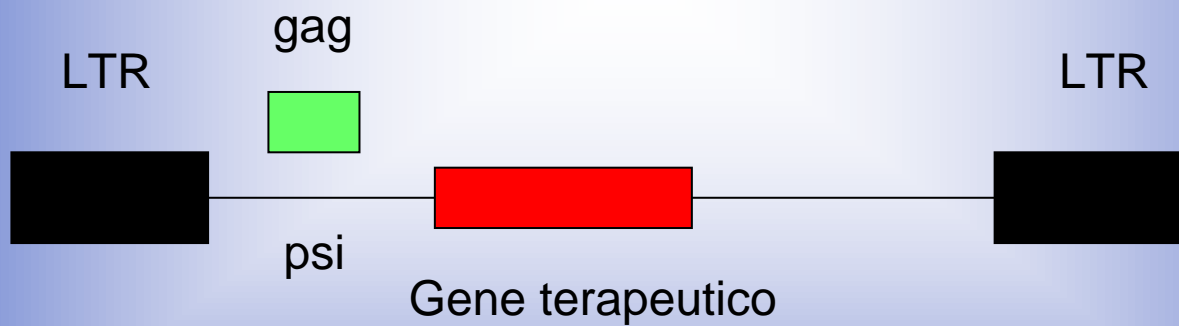
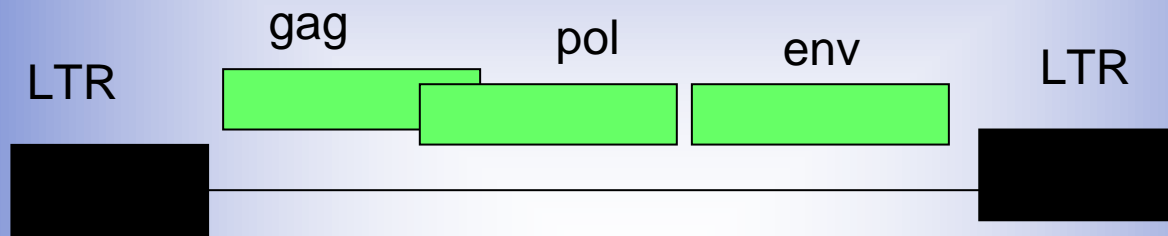
Vettori virali

- Sfruttano le proprietà fisiologiche dei virus di infettare le cellule bersaglio con alta efficienza utilizzando recettori specifici.
- Almeno 4 principali classi di virus sono correntemente usate a questo scopo: retrovirus, adenovirus, virus adeno-associati ed herpesvirus

Retrovirus aviari e murini

- Semplicità genetica
- Infettano ad alta efficienza una vasta serie di tipi cellulari
- Ciclo biologico: DNA provirale si integra nel genoma della cellula ospite

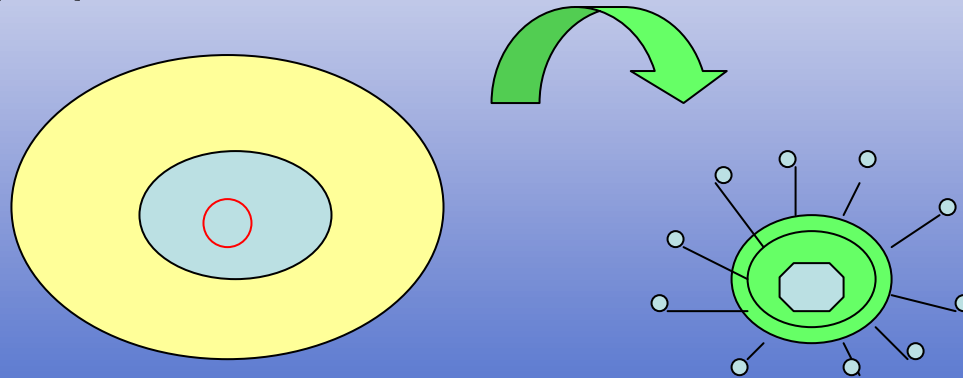
Provirus



Vettore retrovirale

Packaging cell line

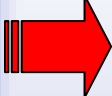
- La piu' semplice linea di packaging consiste in una linea cellulare stabilmente infettata, che ha integrato un **provirus (gag-pol-env)** con sequenza di packaging deleta (Ψ)

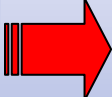


- Transfezione con il vettore retrovirale delecto delle regioni strutturali
- Selezione delle cellule attraverso uso di marker
- I cloni risultanti rilasciano particelle virali contenenti:
 - il gene terapeutico e le sequenze per integrasi e trascrittasi inversa
- Tali particelle virali saranno usate per infettare le cellule target
- La cellula target transfettata conterra' il gene terapeutico stabilmente integrato ma non sara' in grado di rilasciare virioni.

Valutazione del rischio

- **Microrganismo di partenza:**

 virus nel caso di costrutti di origine virale

 linee cellulari nel caso di cellule somatiche geneticamente modificate

Ad es.: Valutare se la modifica apportata aumenti la capacità di espressione, di integrazione o di replicazione del vettore

- **Inserto** (adeguata valutazione del potenziamento del rischio):

➡ geni che controllano la proliferazione cellulare

➡ geni ad alto impatto biologico (fattori di crescita, citochine, neurotrasmettitori)

➡ sequenze sconosciute

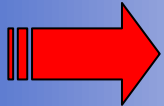
Ad es. vanno valutate le possibili conseguenze di un evento accidentale che esponga i tessuti dell'operatore alla possibilità di integrazione di un costrutto esprimente sostanze ad elevata attività biologica

- **Donatore**

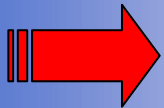
l'organismo da cui proviene l'inserto

- Ricevente

Cellule di packaging



sistemi ecotropici (non pongono problemi per l'operatore)



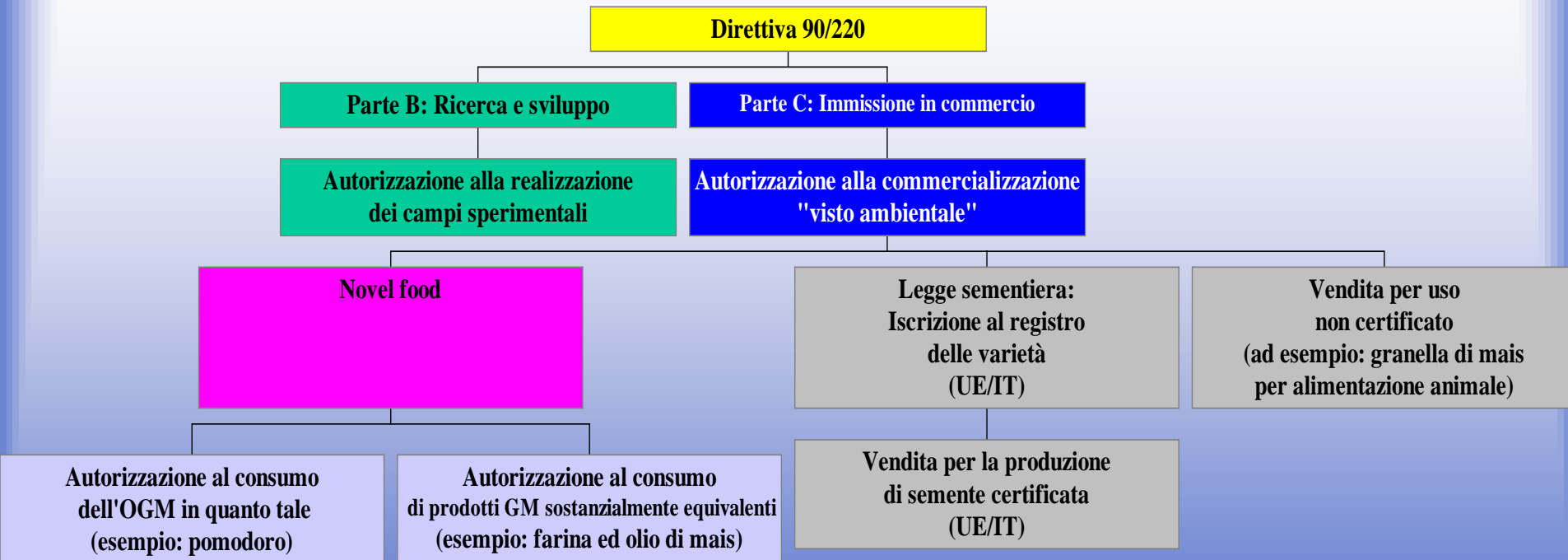
sistemi amfotropici

- Nella valutazione 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.

Sperimentazione clinica

- Il rischio sarà determinato caso per caso in funzione del vettore, del materiale genetico trasferito, e della via di introduzione.
- **Classe 2:**
 - camere in area protetta, con accesso controllato, simbolo di rischio biologico. Autoclave sul piano.....
- **Classe 3**
 - Camere 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.

Procedura di autorizzazione comunitaria al rilascio deliberato di OGM



LIBRO BIANCO 2000

Dir. n.98/81 e d.l.vo n.206/4/2001: impiego confinato di MOGM

Reg. n.178/2002
Sicurezza alimentare

Reg. n.258/97
Novel food/feed

Dir. n.2001/18 e d.l.vo n.224/7/2003: rilascio nell'ambiente di OGM

A E S A

Reg.n.1829/2003
Alimenti e mangimi GM

Reg.(CE)
n.641/2004
norme attuative

Reg.n.1830/2003
Tracciabilità/Etichettatura

Ai sensi art.31,par.2
Dec. n.204/2004
Registri OGM

Raccomandazione
n.556/2003
Coesistenza

Ai sensi dell'art. 8 del Reg. 1830:
Reg. n.65/2004 identificatori unici

Ai sensi art.8,comma 6
d.l.vo224: DM per valutazione rischio agrobiodiversità, sistemi agrari e filiera agroalimentare

Racc. n. 787/2004/CE Orientamenti tecnici
Metodi di campionamento e analisi OGM:
ai sensi dell'art.9 del Reg.1830/2003

Dal 1998 in Europa è stato attivato il processo di revisione della normativa relativa agli OGM che aveva determinato una “moratoria di fatto” delle richieste di commercializzazione

Dir.(CE) n.2001/18/CE e D.L.vo n.224/2003

La direttiva 2001/18/CE regola l'immissione nell'ambiente a scopi sperimentali di organismi geneticamente modificati e l'immissione in commercio:

- **Dopo diversi anni di emissioni sperimentali, l'azienda interessata presenta all'Autorità Nazionale competente notifica di commercializzazione**
- **La notifica comprende una completa valutazione del rischio per l'impatto ambientale e relativo monitoraggio**
- **Valutazione del dossier da parte dell'Autorità Nazionale Competente (AC) del Paese Membro nel quale il prodotto sarà commercializzato**
- **In caso di esito favorevole, l'AC informa la Commissione e questa gli altri Paesi membri**
- **Salvo obiezioni in senso contrario, il Paese membro può autorizzarne l'immissione in commercio sul proprio territorio, tale autorizzazione si intende valida per tutta l'Unione Europea**
- **Il Comitato Autorità Competenti per la dir.2001/18 autorizza formalmente la commercializzazione con una specifica decisione**

Richieste presentate ai sensi della Direttiva 2001/18/CE

27 richieste, 3 delle quali sono state ritirate, tutte riguardano piante GM, 14 includono la coltivazione:

- 10 mais, 6 colza, 5 cotone, 2 barbabietola, 1 patata, 1 soia, 1 riso e 1 trifoglio
- modificate per la tolleranza agli erbicidi e/o per la resistenza a insetti fitofagi, eccetto la patata

10 richieste sono state autorizzate dallo Stato Membro ricevente e sono ora esaminate a livello comunitario

Le richieste sono pubblicate dalla Commissione UE sul sito
<http://gmoinfo.jrc.it>

Elementi che formano la base per la valutazione del rischio

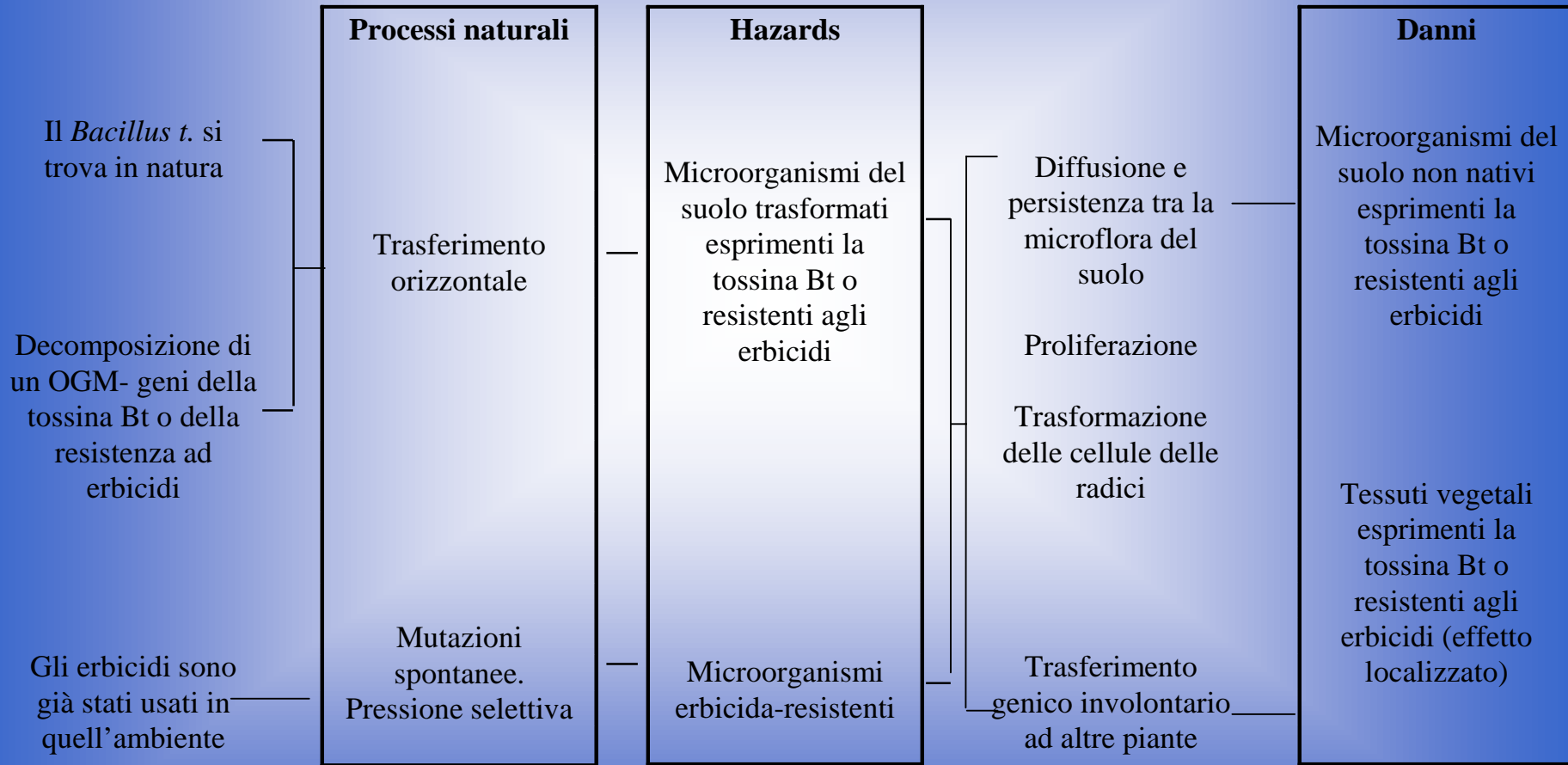
- Caratteristiche dell'organismo non modificato
- Tratti introdotti che provocano lo sviluppo dell'OGM
- Impiego previsto
- Ambiente ricevente
- Interazioni tra questi ultimi due elementi

Elementi che possono essere considerati come potenzialmente effetti nocivi

- Patogenicità per l'uomo, gli animali e le piante
- Compromissione dei trattamenti profilattici o terapeutici
- Effetti della dinamica della popolazione all'interno dell'ambiente ricevente
- Diffusione incontrollata dell'OGM nell'ambiente ed invasione degli ecosistemi non correlati
- Effetti risultanti dal trasferimento di materiale genetico inserito ad altri organismi
- Instabilità fenotipica e genotipica

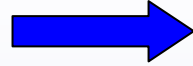


Scenario retrospettivo | Scenario prospettivo



Glossario

Impatto



È un probabile evento futuro che suscita difficoltà e preoccupazione

Pericolo potenziale
Hazard



Stato, condizione o processo che suscita effetti indesiderabili o dannosi, costituisce fonte di rischio

Danno



Si riferisce al valore o alla funzione dovuta al verificarsi di un certo pericolo (hazard)

Rischio



Misura quantitativa della probabilità condizionale del danno; è una funzione espressa sia dalla probabilità che dall'entità di un certo danno

Sicurezza



Termine relativo definito da livelli di accettabilità e tollerabilità

Informazioni da considerare nella valutazione della possibilità di trasferimento dei geni per la resistenza agli antibiotici presenti come markers nelle PGM

- Importanza dell'antibiotico e sua unicità in terapia
- Frequenza nell'uso
- Eventuale somministrazione orale
- Presenza di pressione selettiva in caso di trasformazione dei batteri dell'intestino
- Livello di resistenza agli antibiotici nella popolazione batterica

Potenziale allergenico di un OGM

L'allergia alimentare è una risposta ad un componente proteico di un alimento in soggetti, geneticamente predisposti, alto-produttori di IgE.

Le allergie alimentari sono causate, nella maggior parte dei casi, da otto gruppi di alimenti (crostacei, uova, pesce, latte, noccioline americane, soia, noci e frumento).

Elementi da valutare

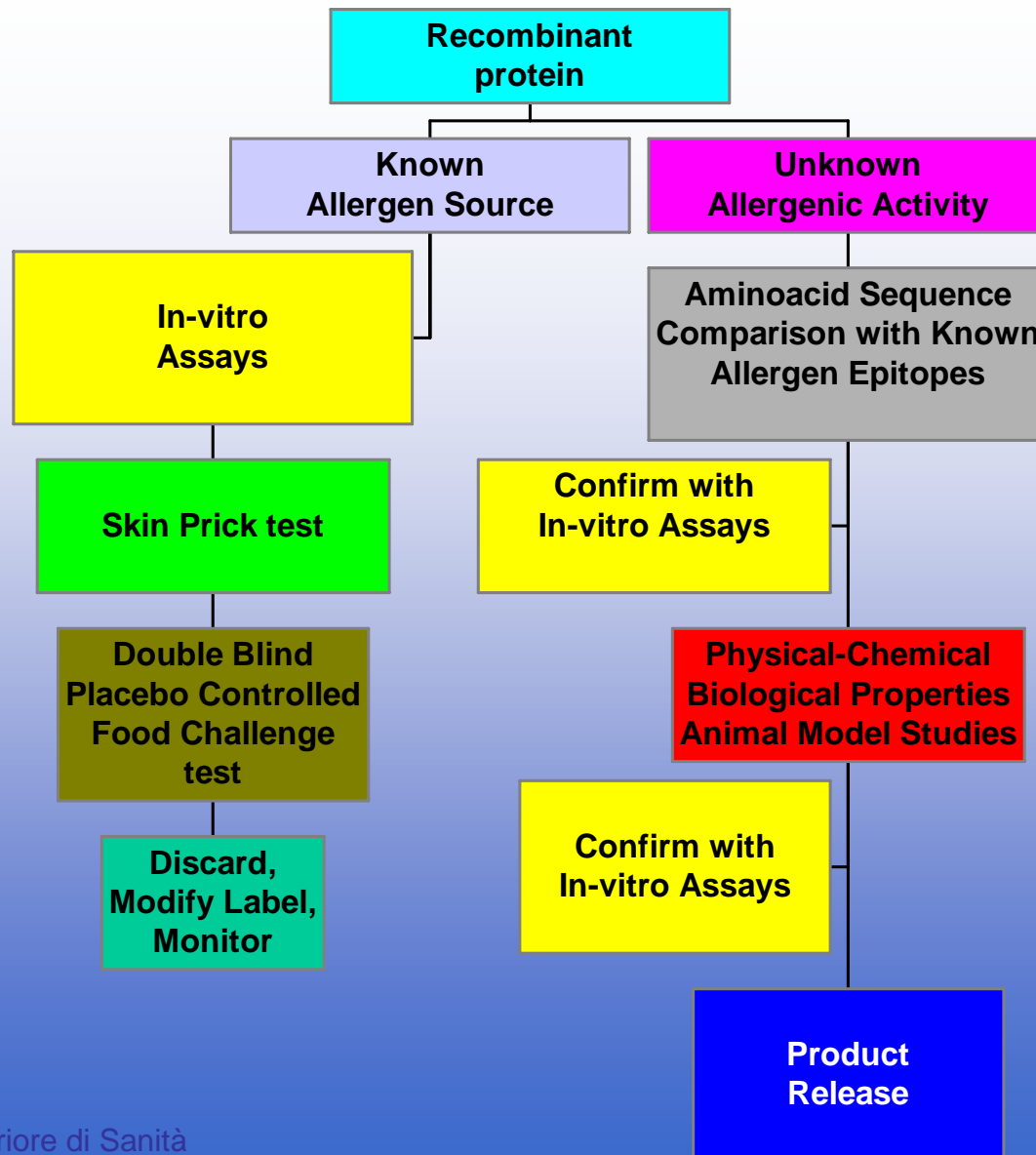
- Trasferimento di una proteina allergenica
- Possibilità che una proteina non-allergenica lo diventi nell'OGM
Questa possibilità è altamente improbabile, a meno di differenze nella glicosilazione o nei siti di accumulo che la rendano più resistente alla digestione
- Alterazione dell'allergenicità della pianta ospite
Finora gli esami con IgE specifiche non hanno evidenziato differenze tra OGM e pianta ospite

Come valutare il potenziale allergenico delle proteine inserite nelle piante geneticamente modificate

- Caratteristiche della fonte del gene inserito
- Proprietà fisico-chimiche della proteina
- Omologia di sequenza della proteina introdotta con gli allergeni conosciuti
- Reattività immunologica della proteina con le IgE del siero di individui allergici alla fonte del gene inserito
- Tests *in-vivo* (Skin Prick and Double Blind Placebo Controlled Food-Challenge DBPCFC)

Fonte: Istituto Superiore di Sanità

Recombinant food proteins: allergen risk assessment



Regolamento n.1829/2003

In vigore dal 18 aprile 2004

Prevede un'unica procedura centralizzata (*principio "one door-one key"*) di valutazione del rischio per la salute umana, animale ed ambientale

Il notificante presenta una sola richiesta per raggiungere due obiettivi:

- l'autorizzazione all'emissione deliberata di un OGM nell'ambiente conformemente ai criteri di cui alla Direttiva (CE) n.2001/18.
- l'autorizzazione all'utilizzo di tale OGM negli alimenti e/o nei mangimi secondo i criteri previsti nel Regolamento (CE) n.1829/2003.

Valutazione del rischio per l'uomo e per gli animali connesso all'uso di un OGM o di un prodotto derivato come alimento o mangime, e la valutazione dell'impatto ambientale è demandata all'Autorità Alimentare Europea (AESA) (Istituita con il Reg. (CE) n.178/2002)

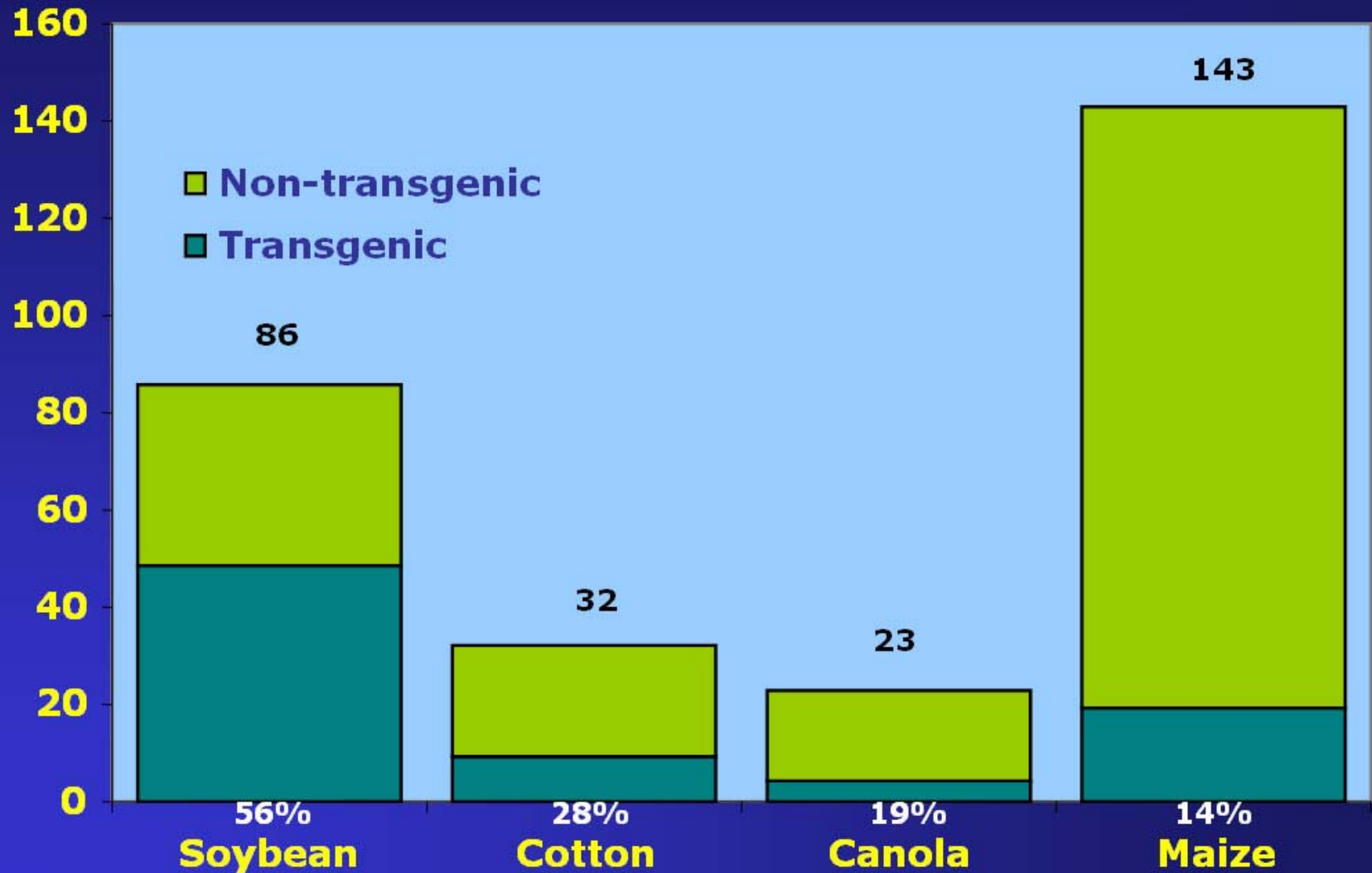
Il notificante, dopo la fase di sperimentazione, potrà chiedere l'autorizzazione al commercio sia attraverso il Regolamento n.1829/2003 sugli alimenti sia attraverso la direttiva n.2001/18/CE

Raccomandazione UE n.556

“Orientamenti per lo sviluppo di strategie nazionali e migliori pratiche per garantire la Coesistenza fra agricoltura convenzionale, agricoltura con metodo biologico e colture geneticamente modificate”.

- **Scopo:** fornire “linee guida” in materia di coesistenza agli Stati Membri ma, di contro, lascia aperti molti “*quesiti*” di natura tecnica, economica e giuridica.

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares)



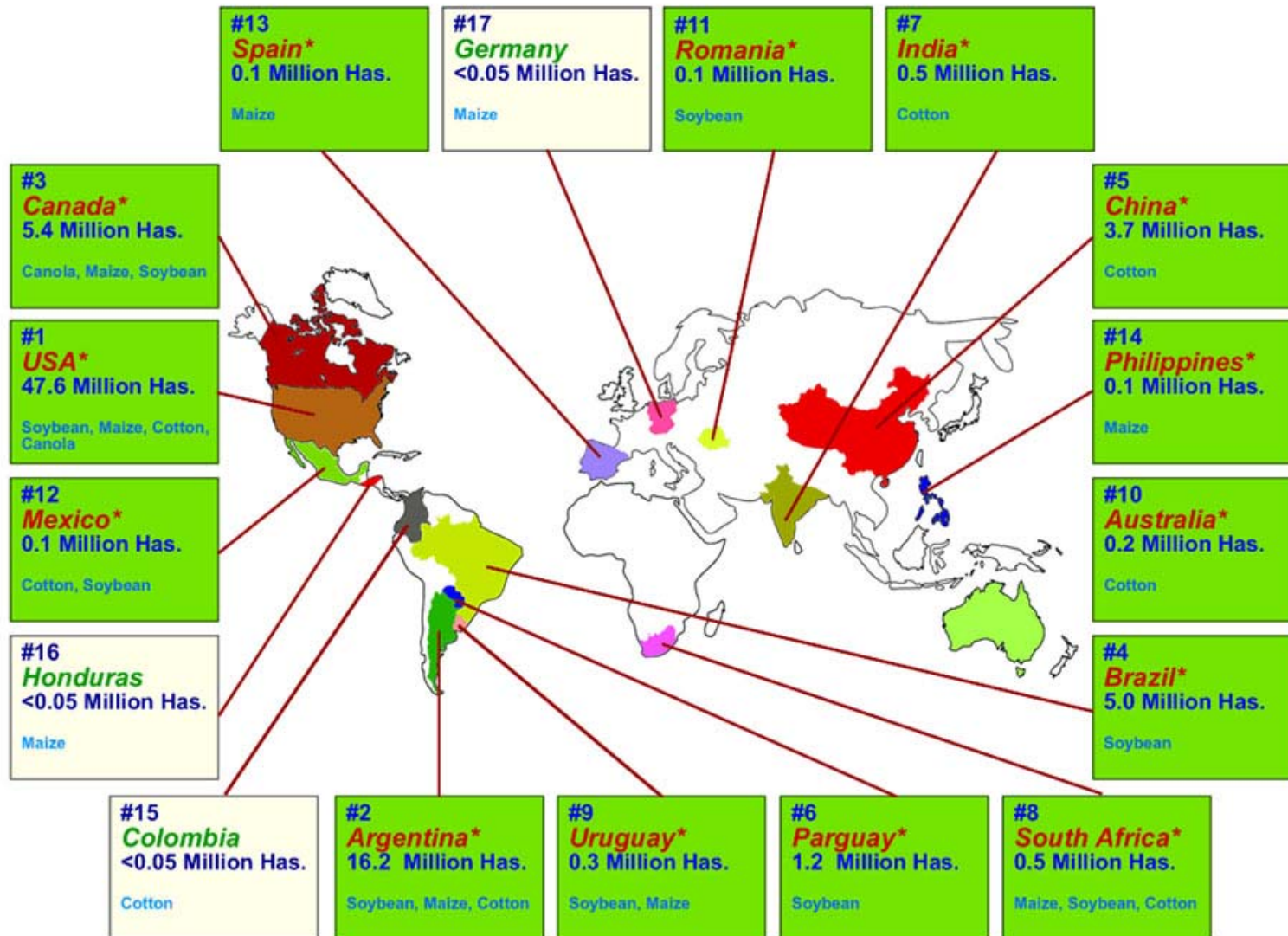
Source: Clive James, 2004

Dominant Biotech Crops, 2004

	Million Hectares	% Transgenic
Herbicide Tolerant Soybean	48.4	60
Bt Maize	11.2	14
Bt Cotton	4.5	6
Herbicide Tolerant Maize	4.3	5
Herbicide Tolerant Canola	4.3	5
Bt/Herbicide Tolerant Maize	3.8	4
Bt/Herbicide Tolerant Cotton	3.0	4
Herbicide Tolerant Cotton	1.5	2
Total	81.0	100

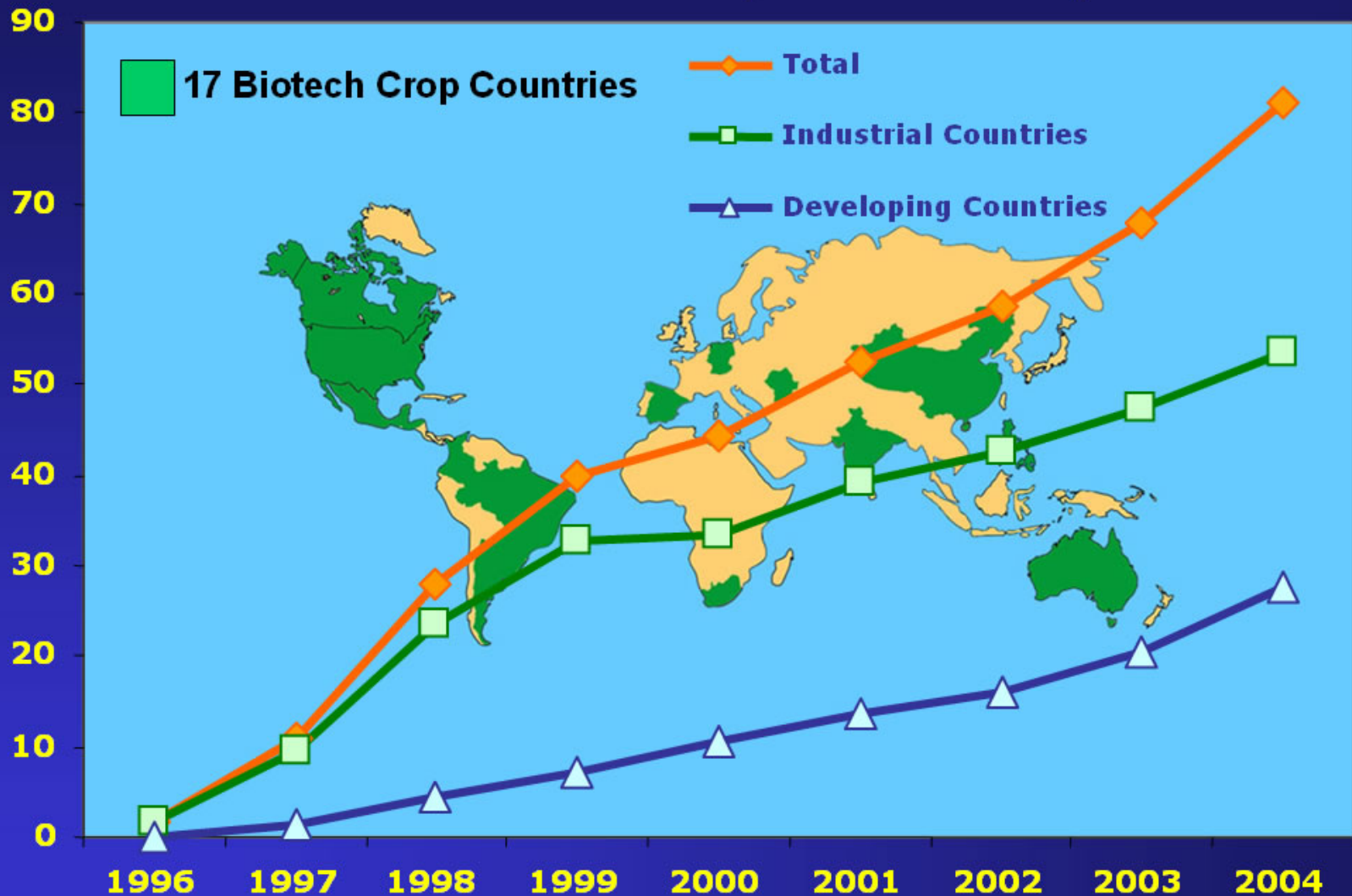
Source: Clive James, 2004

Biotech Crop Countries and Mega-Countries*, 2004



* 14 biotech mega-countries growing 50,000 hectares or more of biotech crops.

Global Area of Biotech Crops Million Hectares (1996 to 2004)



Increase of 20%, 13.3 million hectares of 32.9 million acres between 2003 and 2004

Source: Clive James, 2004