

IDI - SANITÀ

Direttore Scientifico: Pietro Puddu

LAVORARE SICURI



elementi di informazione per il personale
dei laboratori di ricerca dell'IDI-IRCCS
sull'uso dei microrganismi geneticamente modificati (MOGM)
(Ai sensi dell'art. 21 del D.Lgs. 626/94)



PROVINCIA ITALIANA DELLA
CONGREGAZIONE DEI FIGLI DELL'IMMACOLATA CONCEZIONE

ISTITUTO DERMOPATICO DELL'IMMACOLATA

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (I.R.C.C.S.)
00167 Roma - Via dei Monti di Creta, 104 Tel. 06.66.461

PROGETTO QUALITÀ

LAVORARE SICURI

elementi di informazione per il personale
dei laboratori di ricerca dell'IDI-IRCCS
sull'uso dei microrganismi geneticamente modificati (MOGM)
(Ai sensi dell'art. 21 del D.Lgs. 626/94)

A. Sacco e P. Ballesio
Servizio di Prevenzione e Protezione

A. Mastrogiacomo e G. Zambruno
Lab. di Biologia Molecolare e Cellulare

INDICE

1. I MOGM	5
2. Il D.Lgs. 206/01: filosofia della nuova normativa	6
3. Procedure per il corretto uso dei MOGM	
3.1. Introduzione	8
3.2. Classi di contenimento	8
3.3. I MOGM all'IDI-IRCCS	9
3.4. La manipolazione	14
3.5. La registrazione dei MOGM	16
3.6. Lo smaltimento dei rifiuti	17
3.7. Procedure in caso di incidente	18
4. Procedure per la valutazione del rischio	
4.1. Introduzione	19
4.2. Valutazione del rischio	20
4.2.1. <i>Fase 1</i>	
4.2.1.1. Identificazione delle caratteristiche nocive (rischio) del MOGM	21
4.2.1.2. Valutazione dell'incidenza del MOGM ottenuto sulla salute umana e sull'ambiente	23

Con la collaborazione di:

C. Gaetano

Realizzazione:

Direzione Scientifica - IDI

SIM – Communication & Media Systems

Responsabile

M.C. Secci

Progetto Grafico

A. Mari

M.C. Secci

Finito di stampare nel mese di giugno 2003

4.2.1.3.	Classificazione iniziale del MOGM	25
4.2.1.4.	Valutazione della probabilità con cui gli effetti nocivi possono verificarsi	25
4.2.2.	<i>Fase 2</i>	
4.2.2.1.	Classificazione definitiva e determinazione delle misure di contenimento	30
4.2.2.2.	Conferma dell'adeguatezza delle misure di contenimento definitive	31
4.3.	Riesame della valutazione del rischio	31

1. I MOGM

Un microrganismo è un'entità microbiologica cellulare o non cellulare (inclusi i virus, i batteri e le cellule animali o vegetali in coltura) capace di replicarsi o di trasferire materiale genetico.

Ricadono quindi, nell'ambito di questa definizione, oltre alle cellule eucariotiche e procariotiche, anche i vettori virali, pur se difettivi per la replicazione, compresi quelli proposti per la terapia genica.

Un MOGM è un microrganismo geneticamente modificato capace di replicarsi o di trasferire geni; più esaurientemente, per MOGM s'intende un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura per incrocio e/o ricombinazione naturale. Nell'ambito di tale definizione, l'allegato I del D.Lgs. 206/01, elenca le tecniche che sono considerate di modificazione genica e quelle che non lo sono.

2. IL D.LGS. 206/01: FILOSOFIA DELLA NUOVA NORMATIVA

Con il Decreto Legislativo 12 aprile 2001 n. 206 viene data attuazione in Italia alla direttiva 98/81/CE. Il nuovo Decreto supera, abrogandolo, il Decreto Legislativo 3 Marzo 1993 n. 91 che aveva recepito la Direttiva 90/219/CE sull'impiego confinato di MOGM.

Il Decreto 206/01 stabilisce le misure per l'impiego confinato dei microrganismi geneticamente modificati volte a tutelare la salute dell'uomo e l'ambiente; la normativa impone l'adozione d'accorgimenti tecnici e di procedure, basate su attente valutazioni di rischio, aventi lo scopo di impedire la diffusione e moltiplicazione nell'ambiente e negli organismi viventi di detti MOGM.

Dalla lettera della legge, si evince l'ampia responsabilità dell'utilizzatore¹ nel porre in essere l'attività di valutazione della classe d'impiego confinato necessaria per un efficace contenimento e controllo dei MOGM. Le classi d'impiego sono 4, 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, in analogia con i gruppi di rischio biologico 1-4 previsti dall'art. 75 del D. Lgs. 626/94.

La valutazione ha un ruolo centrale nella normativa e comporta l'analisi dei rischi collegati agli effetti potenzialmente nocivi per ciascuna attività, tenendo conto sia della natura sia della portata delle operazioni, al fine di stabilire quali siano le attrezzature di contenimento appropriate. Le procedure necessarie per la valutazione del rischio sono descritte in

¹ Utilizzatore : responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato

dettaglio nel paragrafo 4 del presente documento. La valutazione della classe dell'impiego confinato rappresenta l'elemento essenziale per procedere alla notifica degli impianti e degli impieghi, così da ottenere la relativa autorizzazione. Come disposto dal Decreto Legislativo 206/01, le notifiche, sia di impianto sia di impiego, vengono presentate al Ministero della Salute.

La valutazione del rischio deve essere raccolta in un apposito documento, conservato presso l'impianto dal titolare (datore di lavoro), così da poterlo mettere sempre a disposizione delle autorità competenti.

3. PROCEDURE PER IL CORRETTO USO DEI MOGM

3.1. Introduzione

Per operare in conformità con quanto disposto dalla legislazione di riferimento e per la buona pratica di laboratorio ogni persona, che svolga attività di ricerca caratterizzata dall'impiego di microrganismi geneticamente modificati, deve essere informata sulle norme, sulle procedure e sugli accorgimenti da seguire per un corretto confinamento e per una corretta manipolazione dei MOGM. Le indicazioni contenute nel presente documento hanno la finalità di fornire le informazioni base in ordine all'uso dei MOGM; notizie più dettagliate sull'argomento possono essere ricavate dalla lettura diretta del D.Lgs. 206/01. Per qualsiasi ulteriore chiarimento si può prendere contatto con il Direttore del proprio Laboratorio, con la Direzione Scientifica o con il Servizio di Prevenzione e Protezione.

3.2. Classi di contenimento

Le classi di contenimento previste dal D.Lgs. 206/01 sono quattro:

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.

Nel caso in cui sussista un dubbio sull'assegnazione dell'impiego confinato tra due delle classi sopraindicate, l'assegnazione va fatta alla classe che prevede le misure di protezione più rigorose. Inoltre, è necessario chiarire, come d'altronde risulta dai punti 6 e 7 dell'allegato XI del D.Lgs. 626/94, che per alcuni agenti biologici di gruppo 3 possono essere adottate misure di contenimento richieste per gli agenti del gruppo 2; per tali agenti si può parlare di una diminuzione del rischio d'infezione che può essere motivata dal fatto che nelle condizioni d'utilizzo:

- a) Il patogeno non è veicolato dall'aria;
- b) Il patogeno è manipolato in stadi del suo ciclo vitale che non sono infettivi per l'uomo;
- c) Il patogeno è stato attenuato ovvero reso parzialmente inattivo, o ha perso geni notoriamente virulenti.

Si può affermare che non sempre al gruppo di appartenenza dell'agente biologico deve essere associato il corrispondente livello di contenimento. L'utilizzatore deve procedere ad una valutazione dell'impiego confinato al fine di evitare i rischi per la salute umana e per l'ambiente che tale impiego potrebbe comportare, utilizzando gli strumenti atti ad un'efficace operazione di valutazione forniti dal Decreto Legislativo 206/01. L'attività di valutazione deve tenere in particolare considerazione il problema dello smaltimento dei rifiuti e degli effluenti.

3.3. I MOGM all'IDI-IRCCS

L'Istituto Dermatologico dell'Immacolata è autorizzato dal Ministero della Salute all'utilizzo di quattro impianti da destinarsi ad attività implicanti l'uso di microrganismi geneticamente modificati. Due dei quattro impianti sono siti presso la sede centrale dell'Istituto Dermatologico dell'Immacolata; i restanti nei locali dei laboratori di ricerca dell'IDI-IRCCS ubicati presso l'IDI Farmaceutici S.p.A..

Gli impianti presso la sede centrale sono uno di classe 1 e l'altro di classe 2. L'impianto di classe 1 è composto dalle seguenti sezioni: Biologia Molecolare e Cellulare, Farmacologia, Immunologia, Patologia Vascolare ed Oncogenesi Molecolare. Quello di classe 2 esclusivamente da quella di Patologia Vascolare.

Gli impianti ubicati presso l'IDI Farmaceutici S.p.A. sono uno di classe 1 e l'altro di classe 2, ed entrambi afferiscono al laboratorio di Ingegneria dei Tessuti. In merito ai MOGM di classe 1 in uso nei laboratori dell'IDI-IRCCS è possibile asserire che:

- ▶ E' altamente improbabile che il microrganismo ricevente o quello parentale provochino malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante;
- ▶ La natura del vettore e dell'inserito è tale da non conferire al MOGM un fenotipo in grado di provocare malattie per gli esseri umani, gli animali o le piante, o di avere effetti nocivi sull'ambiente;
- ▶ E' altamente improbabile che il MOGM provochi malattie per gli esseri umani, gli animali, le piante o abbia effetti nocivi sull'ambiente.

Per quanto attiene ai microrganismi geneticamente modificati di classe 2 utilizzati presso l'IDI-IRCCS si rileva che:

- ▶ Non sono in grado di replicarsi autonomamente e, pur essendo potenzialmente patogeni per l'uomo e gli animali, sono responsabili solo di fenomeni infettivi a scarsa virulenza;
- ▶ Raramente inducono lievi reazioni allergiche;
- ▶ La natura del vettore e degli inserti che vengono in esso inseriti sono tali da non conferire al MOGM fenotipi in grado di causare malattie agli uomini, agli animali o alle piante ed avere effetti nocivi sull'ambiente.

Nel rispetto della normativa di riferimento l'IDI-IRCCS ha effettuato le notifiche d'impianto e d'impiego presso il Ministero della Salute, dopo aver compiuto la valutazione del rischio.

I locali destinati all'utilizzo dei MOGM 1 dispongono di livelli di contenimento di classe 1 e quelli destinati ai MOGM 2 di livelli di contenimento di classe 2.

L'attività posta in essere dai laboratori dell'Istituto Dermopatico dell'Immacolata è un'attività di ricerca; le colture sono di scala sperimentale (1 litro max per coltura) e la natura delle attività riguarda sostanzialmente la produzione di sostanze biologiche, come le proteine ricombinanti, ed il clonaggio di materiale genetico specifico.

Di seguito vengono riportate le misure di contenimento previste per le attività di laboratorio, mentre per le caratteristiche complete delle classi di contenimento si rimanda all'allegato IV del D.Lgs. 206/01.

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

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

(1) Isolamento = il laboratorio è separato dalle altre zone dello stesso edificio o si trova in un edificio separato

ATTREZZATURE

3	Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminati e facili da pulire	Necessario (bancone)	Necessario (bancone)	Necessario (bancone, arredo pavimento)	Necessario (bancone, arredo pavimento soffitto, pareti)
4	Accesso al laboratorio attraverso zona filtro (2)	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
5	Pressione negativa rispetto alla pressione nelle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Necessario ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario
6	L'aria immessa nel ed emessa dal laboratorio deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA) (3)	Non necessario	Non necessario	Necessario per aria emessa ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario per aria immessa ed emessa. Quando si impiegano virus che non sono trattenuti da filtri HEPA si renderanno necessari requisiti supplementari per l'aria emessa
7	Cappa/box di sicurezza microbiologica	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
8	Autoclave	Nel sito	Nell'edificio	Sul piano (4)	In laboratorio = a doppia entrata
9	Presenza di strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale	Necessari apparati di lavaggio	Necessario	Necessario	Necessario
10	Deposito sicuro per MOGM, nonché per attrezzatura e materiali di laboratorio contaminati	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

(2) Zona filtro (air lock): l'accesso deve avvenire attraverso una zona filtro che è un ambiente separato dal laboratorio. Il lato esente da contaminazione della zona filtro deve essere separato dalla parte ad accesso limitato da uno spogliatoio o da impianti doccia e, preferibilmente, da porte interbloccanti

(3) HEPA = High Efficiency Particulate Air

(4) In base a procedure convalidate che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio e che forniscano un livello di protezione equivalente

MODALITÀ DI FUNZIONAMENTO

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

RIFIUTI

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

ALTRE MISURE

22	Il laboratorio deve contenere la propria attrezzatura	Non necessario	Non Necessario	Se Necessario	Necessario
23	Deve essere presente una finestra di osservazione, o una soluzione alternativa, che consenta di vedere gli occupanti	Se necessario	Se Necessario	Se Necessario	Necessario

3.4. La manipolazione

Nel caso di utilizzo di MOGM, anche quelli di classe 1, si deve lavorare in modo pulito, evitando quelle operazioni che possano favorirne la dispersione nell'ambiente. A questo scopo è sempre importante usare le apposite misure di protezione (es. camice, guanti, occhiali, mascherina, dispositivi di protezione dall'aerosol, ecc.) e di confinamento (es. benchcoat, contenitori idonei, disinfezione delle aree di lavoro, aree confinate di stoccaggio e di lavoro, cappe biologiche, ecc.).

I MOGM di classe 1 necessitano delle seguenti misure di contenimento:

- ▶ Spazi confinati di manipolazione (bancone) che siano resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti e agenti decontaminanti e che siano facili da pulire;
- ▶ Indumenti protettivi adeguati;
- ▶ Disinfezione del piano di lavoro prima e dopo la manipolazione;
- ▶ Smaltimento dei materiali utilizzati nella manipolazione secondo le procedure di inattivazione dei MOGM descritte nei successivi paragrafi;
- ▶ Autoclavaggio dopo l'uso (20 min. a 120°C) dei materiali da riutilizzare (es. vetreria come beute, tubi, piastre, ecc.) così da inattivare i MOGM residui.

Per quanto attiene alle misure di contenimento per i MOGM 2 la legge dispone che:

- ▶ Gli spazi confinati di manipolazione (bancone) siano resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti e ad agenti decontaminanti e facili da pulire;
- ▶ Una cappa/box di sicurezza microbiologica sia presente nel laboratorio, se necessario;
- ▶ L'autoclave sia collocata nello stesso edificio dell'impianto;
- ▶ Adeguate strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale siano a disposizione dello stesso;

- ▶ Un deposito sicuro per i MOGM, nonché per le attrezzature ed i materiali di laboratorio contaminati, sia presente, se necessario;
- ▶ Al personale non addetto sia interdetto l'accesso alle zone di manipolazione e conservazione dei MOGM e sia chiaramente esposto il segnale di pericolo biologico sulle porte delle suddette zone;
- ▶ Il personale addetto, venga sottoposto ad una formazione specifica, indossi indumenti di protezione adeguati comprensivi, se necessario, di guanti protettivi e disponga di attrezzature che minimizzino la formazione di aerosol;
- ▶ L'ambiente di lavoro sia sottoposto a specifiche procedure di disinfezione e permetta un adeguato controllo e confinamento di ogni possibile vettore di MOGM (come ad esempio roditori ed insetti);
- ▶ I materiali utilizzati nella manipolazione siano smaltiti secondo le procedure di inattivazione dei MOGM descritte nei successivi paragrafi;
- ▶ I materiali che vengono riutilizzati (es. vetreria come beute, tubi, piastre, ecc.) siano autoclavati dopo l'uso (20 min. a 120°C) per inattivare i MOGM residui;
- ▶ Si prevedano e si utilizzino tutti gli accorgimenti e le procedure atti a minimizzare la diffusione dei MOGM;
- ▶ Gli stabulari siano isolati, dotati di porte munite di serratura ed idonei per un'agevole decontaminazione con riguardo particolare ai pavimenti e pareti; i locali in questione, se necessario, dovrebbero essere dotati di filtri per gli isolatori o camere isolate. Inoltre, gli animali dovrebbero essere tenuti in installazioni adeguate (quali gabbie, recinti o acquari).

In conclusione e più in generale si può affermare che per la manipolazione di MOGM di classe 2 è necessario:

- ▶ Procedere all'inattivazione delle colture prima dell'eliminazione dal sistema chiuso;

3.7. Procedure in caso di incidente

In caso d'incidente durante il compimento di operazioni implicanti l'uso di microrganismi geneticamente modificati è necessario e doveroso adottare le procedure di sicurezza e darne tempestiva informazione, così da poter compiere gli adempimenti previsti dalla legge, a:

- ▶ Direttore di Laboratorio – Utilizzatore;
- ▶ Direttore Scientifico
(dirscient@idi.it – tel. 06/6646 4457);
- ▶ Servizio di Prevenzione e Protezione
(a.sacco@idi.it - tel. 06/6646 4212).

4. PROCEDURE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO

4.1. Introduzione

La normativa di riferimento prevede che l'utilizzatore, identificabile con il Direttore del Laboratorio, valuti gli effetti potenzialmente nocivi, sulla salute umana e sull'ambiente, del MOGM utilizzato. Tale attività deve essere posta in essere, oltre che dal Direttore del Laboratorio, anche dal ricercatore che, lavorando in concreto con il microrganismo geneticamente modificato, deve verificare costantemente l'appropriatezza della classe di contenimento assegnata. Nel caso in cui egli ritenga che le misure assegnate siano inadeguate, deve sospendere ogni tipo di attività e avvisare tempestivamente il Direttore del Laboratorio.

In questo paragrafo sono fornite delle note orientative per effettuare in modo corretto la valutazione del rischio. Scopo di detta attività è quello di analizzare i rischi collegati alle operazioni poste in essere.

In seguito alla valutazione del rischio si assegna l'impiego confinato ad una delle quattro classi previste dal D.Lgs. 206/01. A seconda della classe in cui viene inserito il MOGM discendono diverse misure di contenimento, che devono sempre essere adottate per permettere delle lavorazioni sicure.

Il grado di rischio connesso agli impieghi confinati ed ai processi di costruzione dei MOGM è collegato agli effetti potenzialmente nocivi che queste attività possono avere per la salute umana o l'ambiente ed alla possibilità che questi effetti accadano realmente. In sede di valutazione

del rischio si deve considerare l'esposizione di soggetti umani e/o dell'ambiente durante le normali operazioni e in caso di dispersione accidentale. Il livello di classificazione ottenuto in seguito alla valutazione del rischio permette di individuare le misure di contenimento necessarie per lavorare in sicurezza con i MOGM.

4.2. Valutazione del rischio

Il processo di valutazione del rischio è costituito da due fasi distinte. Attraverso la fase 1 si arriva a:

- ▶ Identificare le caratteristiche potenzialmente nocive del MOGM (rischio);
- ▶ Attribuire al MOGM una classe iniziale (classi da 1 a 4) sulla base degli effetti nocivi potenziali;
- ▶ Valutare la probabilità con cui gli effetti nocivi possono verificarsi sia su soggetti umani sia sull'ambiente, tenendo conto della natura e della portata del lavoro svolto e delle misure di contenimento adottate sulla base della classificazione iniziale del MOGM.

La fase 2 permette di:

- ▶ Classificare definitivamente il MOGM;
- ▶ Individuare le misure di contenimento concrete per porre in essere, in sicurezza, l'attività implicante l'uso di microrganismi geneticamente modificati.

4.2.1. Fase 1

4.2.1.1. Identificazione delle caratteristiche nocive (rischio) del MOGM

Il processo di valutazione del rischio implica l'identificazione di tutte le caratteristiche potenzialmente nocive del MOGM, dovute alla modificazione genetica o ad eventuali cambiamenti degli elementi tipici dell'organismo ricevente. Dette caratteristiche si ricavano dall'esame dell'organismo ricevente, dell'organismo donatore, delle caratteristiche e dell'ubicazione del materiale genetico inserito e di eventuali vettori. È necessario rilevare che la modificazione genetica di un microrganismo può influire sulla sua capacità di causare danni alla salute umana e all'ambiente: infatti, può diminuire, aumentare o lasciare inalterato il potenziale dannoso di un MOGM.

Qui di seguito sono elencati gli aspetti che, se pertinenti, debbono essere presi in considerazione durante la fase di identificazione delle caratteristiche nocive (rischio) del MOGM.

- a) Per quanto attiene all'Organismo ricevente vanno esaminati:
 - ▶ La patogenicità e virulenza, infettività, allergenicità, tossicità e possibilità di fungere da vettore di agenti patogeni;
 - ▶ La natura dei vettori indigeni e degli agenti avventizi laddove sussiste il rischio di una mobilitazione del materiale genetico inserito;
 - ▶ La frequenza della mobilitazione del materiale genetico inserito, se presente;
 - ▶ La natura e stabilità delle eventuali mutazioni disabilitanti;

- ▶ Le eventuali modificazioni genetiche precedenti;
- ▶ La gamma degli organismi ospiti, se pertinenti;
- ▶ Gli eventuali tratti fisiologici significativi che potrebbero essere alterati nel MOGM finale o la relativa stabilità, se pertinenti;
- ▶ L'habitat naturale e la distribuzione geografica;
- ▶ La partecipazione significativa in processi ambientali naturali (ad es. fissazione dell'azoto, regolazione del pH);
- ▶ L'interazione con altri organismi nell'ambiente e gli effetti su di essi, incluse le eventuali caratteristiche di competitività, patogenicità o simbiosi;
- ▶ La capacità di formare strutture di sopravvivenza (ad es. spore o sclerozi).

b) Le caratteristiche dell'Organismo donatore che debbono essere prese in considerazione sono (per esperimenti di fusione o esperimenti "shotgun" dove l'inserito non è ben caratterizzato):

- ▶ La patogenicità, virulenza, infettività, tossicità e possibilità di fungere da vettore di agenti patogeni;
- ▶ La natura dei vettori indigeni:
 - sequenza;
 - frequenza di mobilizzazione e specificità;
 - presenza di geni che conferiscono resistenza a sostanze antimicrobiche compresi gli antibiotici;
- ▶ La gamma degli organismi ospiti;
- ▶ Gli altri tratti fisiologici di rilievo.

c) Gli aspetti dell'Inserito da analizzare sono:

- ▶ L'identità e le funzioni specifiche dell'inserito (geni);
- ▶ Il livello di espressione del materiale genetico inserito;
- ▶ L'origine del materiale genetico, l'identità dell'organismo o degli organismi donatori e loro caratteristiche, se pertinenti;
- ▶ La storia di eventuali modificazioni genetiche precedenti;
- ▶ L'ubicazione del materiale genetico inserito (possibilità di

attivazione/disattivazione di geni dell'organismo ospite a seguito dell'inserzione).

d) In merito al Vettore va verificata:

- ▶ La natura e l'origine dei vettori;
- ▶ La struttura e la quantità dell'acido nucleico del vettore e/o del donatore che rimane nel costrutto finale del microrganismo modificato;
- ▶ La frequenza di mobilizzazione del vettore inserito (se presente nel MOGM finale) e/o la capacità di trasferimento di materiale genetico.

Inoltre, altro aspetto fondamentale da esaminare durante la prima fase della valutazione del rischio è il MOGM ottenuto.

4.2.1.2. Valutazione dell'incidenza del MOGM ottenuto sulla salute umana e sull'ambiente

Per quanto attiene al microrganismo geneticamente modificato ottenuto è necessario valutare gli effetti potenzialmente nocivi che può avere sulla salute umana e sull'ambiente.

Gli aspetti che vanno presi in considerazione in ordine alla salute umana sono:

- ▶ Gli effetti tossici o allergenici attesi correlati al MOGM e/o ai suoi prodotti metabolici;
- ▶ Il confronto della patogenicità del MOGM con quella del ricevente oppure, se pertinente, dell'organismo parentale;
- ▶ La capacità di colonizzazione attesa;
- ▶ La possibilità che il microrganismo sia patogeno per soggetti umani immunocompetenti;
- ▶ Le malattie provocate dal MOGM e i meccanismi di trasmissione;

- ▶ Il livello di invasività e la virulenza;
- ▶ La dose infettiva;
- ▶ I possibili cambiamenti della via di infezione o della specificità tissutale;
- ▶ La possibilità di sopravvivenza del MOGM al di fuori di un organismo umano;
- ▶ La stabilità biologica;
- ▶ Lo spettro di resistenze agli antibiotici;
- ▶ L'allergenicità;
- ▶ La tossinogenicità;
- ▶ La disponibilità di terapie e misure profilattiche adeguate.

L'incidenza del MOGM ottenuto sull'ambiente deve essere valutata prendendo in considerazione i seguenti aspetti:

- ▶ Gli ecosistemi nei quali il microrganismo in questione potrebbe essere involontariamente rilasciato dalla struttura di impiego confinato;
- ▶ L'attesa circa la capacità di sopravvivenza e moltiplicazione e la portata della disseminazione del microrganismo modificato negli ecosistemi identificati;
- ▶ L'anticipazione delle conseguenze dell'interazione tra il microrganismo modificato e gli organismi o i microrganismi che potrebbero entrare in contatto in caso di immissione accidentale nell'ambiente;
- ▶ Gli effetti noti o prevedibili sulle piante e sugli animali quali patogenicità, tossicità, allergenicità, trasmissione di agenti patogeni, modificazione nella resistenza agli antibiotici, alterazione del tropismo o della specificità per organismi ospiti, colonizzazione;
- ▶ Il coinvolgimento noto o prevedibile in processi biogeochimici.

4.2.1.3. *Classificazione iniziale del MOGM*

Il processo di valutazione del rischio, in prima istanza, deve consentire l'identificazione delle potenziali caratteristiche nocive del MOGM, analizzando i rischi associati al ricevente, all'organismo donatore se pertinente, al vettore ed all'eventuale inserto; a questa attività deve seguire una prima classificazione dell'impiego confinato.

Per stabilire il livello di rischio dei danni dovuti alle proprietà nocive del MOGM occorre valutare:

1. La gravità del danno;
2. Le altre caratteristiche biologiche (ad esempio le mutazioni disabilitanti) suscettibili di limitarne la probabilità di accadimento.

In questa fase la gravità degli effetti nocivi deve essere stimata a prescindere dalla probabilità con cui essi si potrebbero verificare realmente. Per determinare la gravità dei possibili danni occorre valutare le eventuali conseguenze in modo distinto dalla probabilità del verificarsi del danno. Ad esempio, nel caso di un agente patogeno occorre stimare la gravità della malattia partendo dal presupposto che la specie suscettibile sia stata effettivamente infettata. L'attribuzione del MOGM ad una classe iniziale implica una valutazione della gravità in questo senso. Gli schemi di classificazione, come quello contenuto nella direttiva 90/679/CEE, tengono conto della gravità delle conseguenze. Tuttavia molti schemi sono basati solo su considerazioni relative o alla salute umana o all'ambiente, invece occorre valutare la gravità degli effetti nocivi del MOGM in questione, tenendo conto di entrambe le dimensioni.

4.2.1.4. *Valutazione della probabilità con cui gli effetti nocivi possono verificarsi*

Gli elementi fondamentali per determinare il grado di probabilità del verificarsi di un evento dannoso sono il livello e la natura dell'esposizione

di soggetti umani o dell'ambiente ad un determinato MOGM. In molti casi l'esposizione è di importanza fondamentale ai fini della valutazione del rischio, poiché spesso determina se un effetto nocivo possa o meno verificarsi. La probabilità di esposizione di soggetti umani o dell'ambiente al MOGM in questione dipende dal tipo di operazioni effettuate (ad esempio la portata di tali operazioni), applicate le condizioni di contenimento corrispondenti alla classificazione iniziale.

Occorre inoltre valutare la natura e la portata dell'attività per poter stimare la probabilità di un'esposizione di soggetti umani o dell'ambiente al microrganismo in questione, senza dimenticare che tali elementi influiscono anche sulla scelta delle procedure di gestione del rischio.

Gli elementi delle operazioni che possono influire sulla valutazione del rischio e che devono dunque essere presi in considerazione, riguardano anche le attività vere e proprie da svolgere, le pratiche di lavoro e il tipo e la portata delle misure di contenimento utilizzate. La valutazione deve tenere in particolare conto il problema relativo allo smaltimento dei rifiuti e degli effluenti.

a) Natura delle attività da svolgere

Il grado di rischio e l'adozione di misure di protezione necessarie a ridurlo ad un livello adeguato dipendono dalla natura delle attività da svolgere, poiché essa determina l'esposizione di soggetti umani e dell'ambiente al rischio e dunque la possibilità che si verifichi un danno.

In funzione della natura delle attività da svolgere il D.Lgs. 206/01 detta le misure adeguate di contenimento e di protezione.

Per i lavori svolti in laboratorio, dove l'influenza delle procedure standard sull'esposizione è ben nota, è improbabile che venga richiesta una valutazione dettagliata del rischio di ogni singola procedura, a meno che non si utilizzi un organismo estremamente pericoloso. Tuttavia potrebbero essere necessarie considerazioni più specifiche per procedure non routinarie o per procedure che

potrebbero avere implicazioni significative per il livello di rischio, per esempio in caso di processi in cui viene generato aerosol.

b) Concentrazione e portata

La densità di una coltura può comportare il rischio di esposizione ad alte concentrazioni di un MOGM in particolare, soprattutto nelle fasi a valle di un processo.

Occorre dunque valutare attentamente gli effetti della concentrazione del MOGM sulla probabilità del verificarsi di un evento dannoso.

Anche la portata delle operazioni è un fattore da considerare in sede di valutazione del rischio. Tale fattore può essere espresso in termini di volume assoluto di un'unica operazione oppure in termini di frequenza di un determinato processo ripetitivo, poiché entrambi possono concorrere ad aumentare la possibilità di esposizione e dunque influire sulla probabilità del verificarsi di un evento dannoso.

Sebbene le operazioni su vasta scala non comportino necessariamente un livello di rischio più elevato, esse potrebbero comunque aumentare la possibilità di esposizione sia in termini di numero di soggetti umani che di quantità di esposizione dell'ambiente.

Sulla base della portata delle operazioni da effettuare la legge indica le misure di contenimento e protezione da adottare.

c) Condizioni relative alle colture

In molte attività ad impiego confinato le colture sono mantenute in ambiente rigorosamente controllato, così da proteggere il lavoro svolto; il tipo e la configurazione dei contenitori o di altre attrezzature utilizzate per la crescita delle colture influisce sul grado di rischio per la salute umana e l'ambiente. L'uso di contenitori per la fermentazione sigillati ed estremamente sofisticati permette di ridurre significativamente sia l'esposizione, sia i rischi collegati alla manipolazione di MOGM.

Risulta necessario anche prendere in considerazione l'affidabilità oppure l'incidenza di possibili anomalie delle attrezzature, poiché eventuali disfunzioni potrebbero comportare alti livelli di esposizione a MOGM dannosi; a tal proposito è possibile prescrivere ulteriori misure di contenimento quando la probabilità di eventuali disfunzioni è elevata.

Le procedure operative standard relative al personale che svolge lavori a contatto con le colture di MOGM, quali la centrifuga o la sonicazione, hanno una notevole influenza sull'efficacia delle misure di contenimento utilizzate.

Nel caso in cui le condizioni delle colture fungono da misure di contenimento fisico, anche le misure biologiche e chimiche utilizzate per proteggere i lavori svolti in laboratorio possono contribuire in maniera significativa al rafforzamento delle misure di contenimento. Una possibile misura biologica di contenimento è l'uso di mutanti auxotrofi per i quali occorrono fattori di crescita specifici. Esempi di misure di contenimento chimico sono le soluzioni disinfettanti mantenute in sistemi di drenaggio.

Quando si valuta la possibilità che si verifichino effetti nocivi e la loro gravità, conformemente a quanto indicato dalla normativa di riferimento, occorre esaminare anche le caratteristiche dell'ambiente potenzialmente esposto e l'incidenza che queste possono avere sul prodursi di possibili gravi effetti. L'intensità e la natura dell'esposizione dell'ambiente e l'eventuale presenza di bioti, che possono subire effetti negativi se esposti al MOGM, sono elementi ambientali importanti.

In giusta considerazione vanno anche tenuti i fattori elencati qui di seguito, se pertinenti, quando si valuta come le caratteristiche dell'ambiente ricevente possano influire sulla probabilità del verificarsi dell'effetto potenzialmente nocivo e dunque sul livello di rischio e sulla scelta delle misure di protezione.

d) Ambiente potenzialmente esposto

Nella maggior parte dei casi l'ambiente potenzialmente esposto è individuabile con il luogo di lavoro e con l'area ad esso immediatamente circostante. Tuttavia, in funzione delle caratteristiche specifiche dell'impiego confinato e dell'impianto in cui si svolgono i lavori, potrebbe essere necessario prendere in considerazione un ambiente più vasto.

L'ampiezza dell'ambiente potenzialmente esposto può dipendere dalla natura e dalla portata dell'attività svolta, ma non bisogna dimenticare tutte le possibili modalità di trasmissione nell'ambiente circostante, come le modalità fisiche (tubature di scarico locali, corsi d'acqua, smaltimento dei rifiuti, movimenti delle correnti d'aria) o come i vettori biologici (movimento di animali e insetti infettati).

e) Presenza di specie suscettibili

La possibilità che si verifichi effettivamente un danno dipende anche dall'eventuale presenza di specie suscettibili nell'ambiente potenzialmente esposto, compresi soggetti umani, animali o piante.

f) Ambiente favorevole alla sopravvivenza del MOGM

La possibilità che il MOGM possa sopravvivere e continuare a mantenersi nell'ambiente è un fattore determinante in sede di valutazione del rischio. La possibilità che si verifichi un danno è significativamente ridotta se un MOGM non può sopravvivere nell'ambiente al quale potrebbe accedere.

g) Effetti sull'ambiente fisico.

Occorre valutare anche gli effetti dannosi diretti connessi a un MOGM e quelli indiretti dovuti ad un'alterazione significativa delle caratteristiche fisico-chimiche e/o dell'equilibrio ecologico delle componenti del suolo o dell'acqua nell'ambiente esposto.

necessario per l'attività svolta e di conseguenza sarà opportuno procedere ad una classificazione inferiore e adottare le relative condizioni di contenimento.

4.2.2. Fase 2

4.2.2.1. *Classificazione definitiva e determinazione delle misure di contenimento*

Dopo aver esaminato tutte le potenziali caratteristiche dannose dell'impiego confinato, in termini di gravità e di probabilità, in relazione con le misure di contenimento e di protezione adottate sulla base della classificazione iniziale, si può procedere alla classificazione definitiva e alla determinazione delle misure di contenimento per il MOGM oggetto di valutazione. Per classificare il MOGM e determinare le relative misure di confinamento in via definitiva occorre rivedere la classificazione iniziale per stabilirne la correttezza, tenendo presente le attività e le caratteristiche delle operazioni proposte. Un confronto tra la classificazione iniziale e le relative misure di contenimento da un lato e la classe e le misure di contenimento definitive dall'altro può dare luogo a tre differenti risultati:

- ▶ Si constatano effetti negativi che non sono stati presi adeguatamente in considerazione nella classificazione iniziale e che non sarebbero opportunamente limitati dalle misure di contenimento provvisorie stabilite durante la prima fase della valutazione del rischio. Sarà quindi necessario applicare ulteriori misure di contenimento e rivedere la classificazione iniziale dell'attività;
- ▶ La classificazione iniziale è corretta e le misure di contenimento che ne derivano sono adatte a prevenire o minimizzare i danni alla salute umana o all'ambiente;
- ▶ La classificazione iniziale è di livello superiore rispetto a quanto

4.2.2.2. *Conferma dell'adeguatezza delle misure di contenimento definitive*

Una volta stabilite la classificazione e le condizioni di contenimento definitive, occorre rivalutare il livello dell'esposizione di soggetti umani e dell'ambiente (Fase 1 della procedura di valutazione del rischio). Da tale attività dovrebbe risultare una conferma dell'accettabilità del grado di probabilità degli effetti nocivi, vista la natura e la portata delle operazioni e le condizioni di contenimento proposte. A questo punto il processo di valutazione del rischio può dirsi concluso.

4.3. *Riesame della valutazione del rischio*

Conformemente a quanto espresso dall'art. 6, comma 2 del D.Lgs. 206/01, se la natura o la portata dei lavori da svolgere cambiano in misura significativa, oppure se sono disponibili nuovi dati scientifici o tecnici tali da inficiare la valutazione del rischio iniziale, quest'ultima deve essere rivista alla luce dei cambiamenti subentrati. Per tutelare la salute umana e l'ambiente occorre modificare immediatamente, sospendendo temporaneamente l'attività scientifica posta in essere, le condizioni di contenimento rispondenti alla nuova valutazione del rischio.

L'utilizzatore è comunque tenuto a riesaminare periodicamente, almeno ogni tre anni per gli impieghi confinati delle classi 1 e 2 e annualmente per gli impieghi confinati di classe 3 e 4, la valutazione del rischio e a redigere il consequenziale documento.