

L E T T E R E I N R E D A Z I O N E

La valutazione del rischio biologico nella manipolazione di cellule

Il rischio biologico è un rischio difficilmente percepibile, essendo gli agenti biologici invisibili e presenti sia in ambienti di lavoro che non lavorativi e, analogamente a quello da radiazioni o da sostanze genotossiche, provoca un danno difficilmente associabile ad una esposizione lavorativa ben definita nello spazio e nel tempo. Inoltre, non esistono dosi-soglia di esposizione ed è complesso valutare con precisione l'entità dell'esposizione, anche in conseguenza delle possibili molteplici risposte immunitarie dell'ospite.

Nel caso degli operatori delle "cell culture", cioè di coloro che sono addetti alla manipolazione di colture cellulari, la valutazione del rischio biologico deve essere effettuata sia tenendo conto delle proprietà intrinseche delle cellule stesse che delle manipolazioni effettuate, tra cui le modificazioni genetiche indotte (10). Per quel che riguarda le caratteristiche proprie delle cellule vanno identificate:

- la specie di origine delle cellule stesse, poiché più la specie è vicina all'uomo, tanto maggiore sarà il rischio della contaminazione, in quanto le barriere contro i patogeni sono spesso specie-specifiche (3);
- la provenienza delle cellule: quando cellule o tessuti provengono da una fonte certificata, come una banca cellulare nota (ad es. DSMZ o ATCC), la documentazione a corredo delle cellule è sufficiente per la valutazione del rischio (4);
- il tipo cellulare, poiché cellule terminalmente differenziate, come fibroblasti o cellule dell'epitelio, comportano un rischio minore rispetto a cellule staminali, specie se del compartimento ematopoietico;
- il tipo di coltura, poiché le linee cellulari ben caratterizzate comportano un rischio minore rispetto ad una coltura primaria derivante da una biopsia;
- lo stato di salute del donatore e la sua sierologia per HIV, HBV e HCV.

A causa del potenziale rischio che il sistema immunitario non sia in grado di proteggere l'operatore dagli effetti conseguenti alla manipolazione di proprie cellule modificate tramite procedure *in vitro*, è assolutamente sconsigliato trattare cellule o tessuti derivati da se stessi o da colleghi.

Inoltre, bisogna valutare la possibile contaminazione da agenti patogeni. La contaminazione da batteri e funghi è facilmente verificabile (visibile all'osservazione al microscopio per l'intorbidimento del terreno) e semplice da prevenire e trattare (antibiotici-antimicotici).

Le cellule umane o di altri primati possono consentire la replicazione di virus potenzialmente patogeni per l'uomo, ma anche cellule non umane non sono esenti da rischi e vanno, pertanto, sempre trattati come potenzialmente infetti (8). Inoltre, la contaminazione da virus è difficile da diagnosticare: i virus non sono visibili al microscopio ottico e alcuni di essi possono essere latenti o avere effetti tali da non essere visualizzabili nel breve periodo in microscopia.

Tra i più comuni contaminanti delle colture cellulari si annovera il micoplasma, di cui è sempre opportuno verificare la presenza nella coltura: trattasi di un batterio intracellulare, veicolato da siero o cellule (infettate per contaminazione crociata) o dall'uomo (dall'operatore). Le conseguenze della contaminazione da micoplasma sono evidenti solo in tempi lunghi: ridotta proliferazione cellulare, eventuale sviluppo di aberrazioni cromosomiche, alterazioni del metabolismo degli aminoacidi e degli acidi nucleici.

Oltre al micoplasma, nella valutazione dei rischi bisogna tenere in considerazione anche la possibile contaminazione da parte di prioni che rappresentano la causa delle encefalopatie spongiformi trasmissibili. Al momento non risultano infezioni da prioni acquisite in laboratorio, ma questi agenti sono molto difficili da inattivare, in quanto estremamente resistenti ad alte dosi di radiazioni ionizzanti e ultraviolette.

Negli ultimi anni è stato dimostrato che il DNA permanente sia nella bocca (8) che nell'apparato digerente dei mammiferi (12), può facilmente superare le barriere difensive della pelle e penetrare nelle cellule (6) di molti organismi e può essere somministrato anche attraverso il cuoio capelluto (5), via iniezione intramuscolare (1), tramite applicazioni locali agli occhi (9) e attraverso l'orecchio interno (15). Nei laboratori di ricerca biotecnologica, nelle cellule sono introdotti o eliminati geni d'interesse (frammenti di DNA) at-

traverso l'uso di vettori plasmidici o virali, tramite procedure di *trasfezione* (attraverso l'uso di reagenti come il cloruro di calcio o la lipofectamina) o *infezione*.

I vettori plasmidici sono piccoli frammenti di DNA esogeno a doppia elica, capaci di replicazione autonoma, nei quali è presente un gene per la resistenza agli antibiotici che consente la selezione delle cellule trasfettate e nel quale può essere clonato il gene d'interesse, tramite l'uso di enzimi di restrizione.

I vettori virali più utilizzati invece derivano da retrovirus, lentivirus ed adenovirus e per essere usati per il trasferimento genico devono essere trasfettati in cellule "packaging": mancando però di alcuni geni necessari per la replicazione virale, vengono utilizzati in cellule che completano per tale difetto (11).

La maggior parte dei vettori che si producono sono difettivi per replicazione ovvero possono infettare una sola volta e non possono moltiplicarsi dentro la cellula bersaglio, a meno di una "ricombinazione genica" accidentale, ma possono essere fonte di danno tramite l'inserimento casuale nel genoma ospite (mutagenesi inserzionale).

Per la valutazione delle proprietà acquisite come risultato della modificazione genetica, bisogna considerare che le cellule ricombinanti possono avere maggiore o minore capacità di causare malattia rispetto alla controparte normale. Le cellule in cui, tramite l'uso di vettori virali, sono stati inseriti o eliminati geni d'interesse così come le cellule contenenti materiale genetico virale possono rappresentare un serio rischio per i lavoratori (2).

Anche linee umane tumorigeniche rappresentano un rischio potenziale per l'operatore, nel caso di contaminazione accidentale ed in passato è stato riportato un caso di sviluppo di tumore dopo puntura accidentale con ago infetto (14).

Il personale di laboratorio che utilizza i vettori sopra descritti è esposto a rischio nel momento in cui i dispositivi di protezione individuale o collettiva non vengano utilizzati adeguatamente o quando non vengono seguite le procedure di lavoro volte a proteggere l'operatore dal contatto con tali microrganismi. Il rischio è acuito qualora si utilizzino virus in grado di infettare le cellule umane.

In conclusione, nella manipolazione di cellule bisogna valutare il rischio biologico proprio del tipo di cellule manipolate, quello correlato al tipo di manipolazione effettuata, alle condizioni di coltura e alla quantità manipolata.

Gaia Scafetta

Dipartimento di Scienze e Biotecnologie
Medico-Chirurgiche, Università "Sapienza", polo pontino
E-mail: gaiasca@gmail.com

Raffaella Giovinazzo

INAIL, Direzione Generale – Consulenza Tecnica
Accertamento Rischi e Prevenzione (CONTARP)

BIBLIOGRAFIA

1. Budker V, Zhang G, Danko I, et al: The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther* 1998; 5: 272-276
2. Caputo JL. Safety procedures. In: Freshney RI, Freshney MG (eds): *Culture of immortalized cells*. New York: Wiley-Liss, 1996
3. Doblhoff-Dier O, Stacey G: Cell lines: applications and biosafety. In Fleming DO, Hunt DL (eds): *Biological Safety-Principles and Practices*. Washington DC: ASM Press, 2000: 221-241
4. Frommer W, Archer L, Boon B, et al: Recommendations for safe work with animal and human cell cultures concerning potential human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993; 39: 141-147
5. Hoffman RM: The hair follicle as a gene therapy target. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 20-21
6. Khavari PA, Krueger GG: Cutaneous gene therapy. *Dermatol Clin* 1997; 15: 27-35
7. Mahy BW, Dykewicz C, Fisher-Hoch S, et al: Virus zoonoses and their potential for contamination of cell cultures. *Dev Biol Stand* 1991; 75: 183-189
8. Mercer DK, Scott KP, Bruce-Johnson WA, et al: Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 6-10
9. Noisakran S, Campbell IL, Carr DJ: Ectopic expression of DNA encoding IFN-alpha 1 in the cornea protects mice from herpes simplex virus type 1-induced encephalitis. *J Immunol* 1999; 162: 4184-4190
10. Pauwels K, Herman P, Van Vaerenbergh B, et al: Animal Cell Cultures: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Applied Biosafety* 2007; 12: 27-39
11. Sossai D, Miele M, Bet P: *Manuale di sicurezza per il personale dei laboratori di ricerca biotecnologica*. ERGA edizioni, 2001
12. Schubbert R, Lettmann C, Doerfler W: Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol Gen Genet* 1994; 242: 495-504
13. Vonesch N, Tomao P, Di Renzi S, et al: La biosicurezza nei laboratori per gli esposti ad agenti biologici. *G Ital Med Lav Ergon* 2006; 28: 444-456
14. Weiss RA: Why cell biologists should be aware of genetically transmitted viruses. *Natl Cancer Inst Monogr* 1978; 48: 183-189
15. Yamasoba T, Yagl M, Roessler BJ, et al: Inner ear transgene expression after adenoviral vector inoculation in the endolymphatic sac. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 769-747