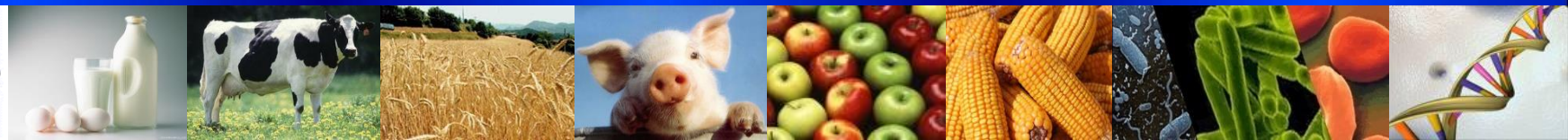
Incontro tecnico-scientifico sulle nuove tecniche di miglioramento genetico in agricoltura

Roma, 22 febbraio 2018

Le NBT e la valutazione del rischio per la salute umana ed animale

marzia.degiacomo@iss.it

https://www.genome.gov/Images/content/plants-crispr.jpg



Sommario

- **Valutazione del Rischio: origini e ruolo della ricerca europea**
- **EFSA: Sicurezza d'uso delle piante GM per il loro uso come alimenti e mangimi**
- **Effetti Non Intenzionali/ principali sorgenti di incertezza delle NBTs**
- **Tecnologie Emergenti per la Valutazione del Rischio**

Valutazione del Rischio: biotecnologie

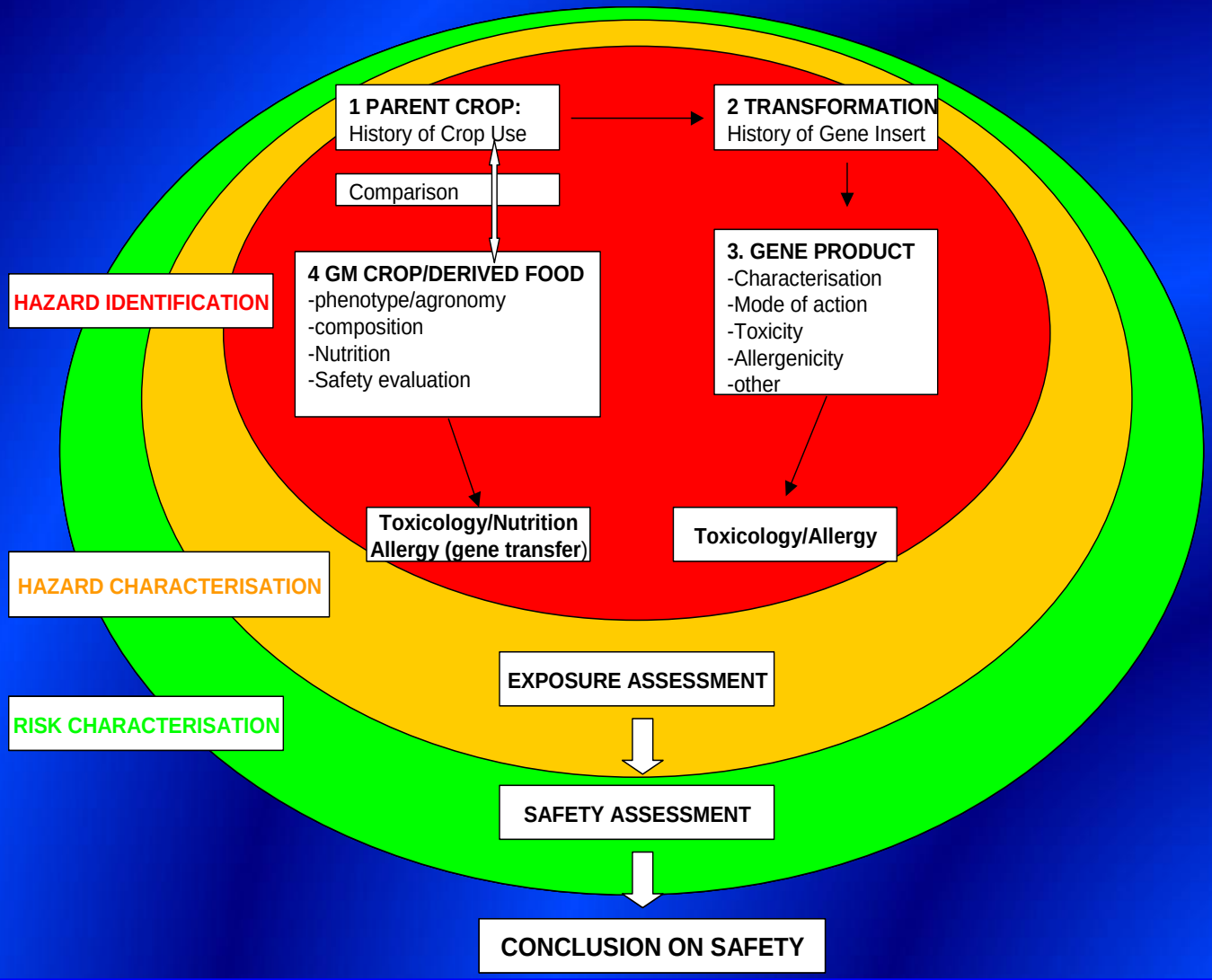
- Dibattito nel1990=>

  FAO, WHO, OECD, Nordic Council of Ministers, ILSI
- Argomento: Come valutare i novel food compresi gli alimenti biotech?
- Focus sull'ingegneria genetica e su "gli effetti non intenzionali"

- **PRINCIPLES FOR THE RISK ANALYSIS OF FOODS DERIVED FROM MODERN BIOTECHNOLOGY**

  CAC/GL 44-2003 (Adopted 2003. Amendments 2008, 2011)

New methods for the safety testing of transgenic food: step-wise approach



Le NBT e la valutazione del rischio per la salute umana ed animale, 22 Febbraio 2018

Valutazione del rischio

Identificazione del pericolo (origine)

Caratterizzazione del pericolo (natura e portata: meccanismo d'azione e relazione dose/risposta)

Valutazione dell'esposizione (incidenza di contaminazione e dati di consumo)

Caratterizzazione del rischio (probabilità e gravità dei danni alla salute se si è esposti ad un pericolo)

BASI SCIENTIFICHE

GUIDANCE DOCUMENT
OF THE SCIENTIFIC PANEL
ON GENETICALLY MODIFIED
ORGANISMS FOR THE RISK
ASSESSMENT OF GENETICALLY
MODIFIED PLANTS AND
DERIVED FOOD AND FEED

Adopted on 24 September 2004
Updated on 7 December 2005
Final, edited version of 28 April 2006

May 2006

Adottato 24 Settembre 2004

Aggiornato Dicembre 2005 (PMEM)

Pubblicato Maggio 2006

Aggiornato Dicembre 2006 (Rinnovo)

Marzo 2007 (Stacked events)

Last updated: 24 May 2011

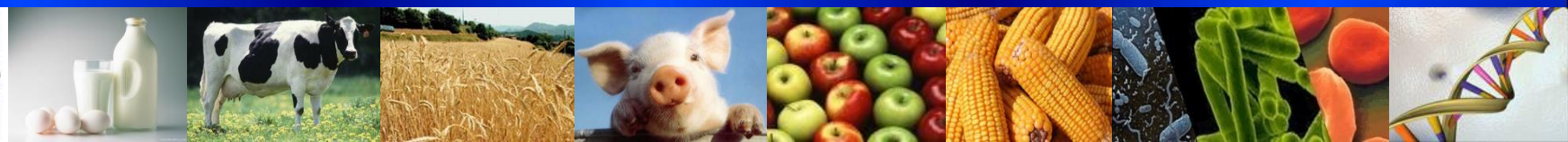
http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/99.htm

EQUIVALENZA SOSTANZIALE

- I concetti di familiarità e di equivalenza sostanziale furono sanciti nel 1993 dall' OECD e successivamente sviluppati da WHO/FAO nel 2000 come metodologia per la valutazione della sicurezza d'uso per l'ambiente e per l'impiego alimentare degli OGM;

- Il concetto di equivalenza sostanziale si basa sul presupposto che un organismo caratterizzato da tradizione di sicurezza alimentare, può essere utilizzato come elemento di paragone per la valutazione della sicurezza d'uso di alimenti e mangimi OGM;

- Questo approccio permette di valutare se le differenze ottenute intenzionalmente o non intenzionalmente alterino il livello di rischio o ne determinino l'innalzamento.



Pianta GM Controparte tradizionale

caratterizzazione molecolare | **genotipo** | **analisi composizionale** | **fenotipo**

identificazione delle differenze

geni inseriti | **proteine espresse** | **metaboliti** | **alimento in toto**

valutazione successiva

trasferimento genico | **allergenicità** | **tossicità** | **analisi nutrizionale**

stima reale dell‘esposizione del consumatore al pericolo

VALUTAZIONE DEL RISCHIO PIANTA GM

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 503/2013 DELLA COMMISSIONE

del 3 aprile 2013

relativo alle domande di autorizzazione di alimenti e mangimi geneticamente modificati in applicazione del regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica i regolamenti (CE) n. 641/2004 e n. 1981/2006

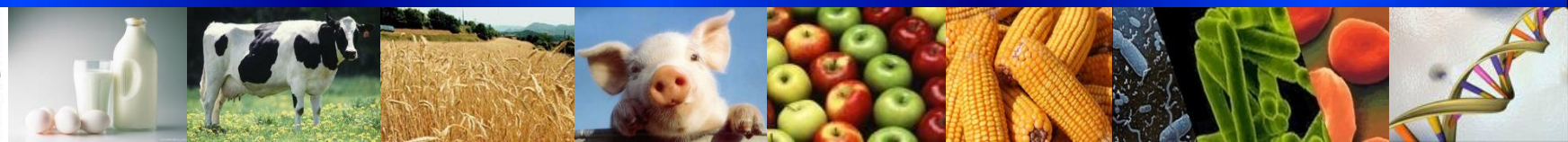
Aspetti da considerare per la caratterizzazione dei rischi

3.2.1. *Caratterizzazione molecolare*

La valutazione delle caratteristiche e degli usi precedenti della pianta donatrice e della pianta ricevente è essenziale per determinare se sono necessarie analisi specifiche per individuare la presenza di particolari tossine o allergeni nella pianta ricevente non modificata, il cui aumento può essere la conseguenza non intenzionale della modificazione genetica.

I protocolli di trasformazione, le strategie di caratterizzazione molecolare, la specificità e la sensibilità dei metodi utilizzati devono essere illustrati dal richiedente in relazione all'inserzione e all'espressione, intenzionali o eventualmente non intenzionali, di sequenze di geni.

Se l'analisi delle sequenze ha identificato un potenziale pericolo, il richiedente deve dimostrare in che modo approcci come l'analisi bioinformatica, l'analisi composizionale/agronomica ed eventualmente studi sull'alimentazione di animali con alimenti o mangimi geneticamente modificati interi contribuiscono alla valutazione della sicurezza. Il valore dei risultati ottenuti deve essere valutato alla luce delle conoscenze disponibili sulla struttura e sulla funzione delle basi dati genomiche delle specie di colture in questione o di specie connesse.

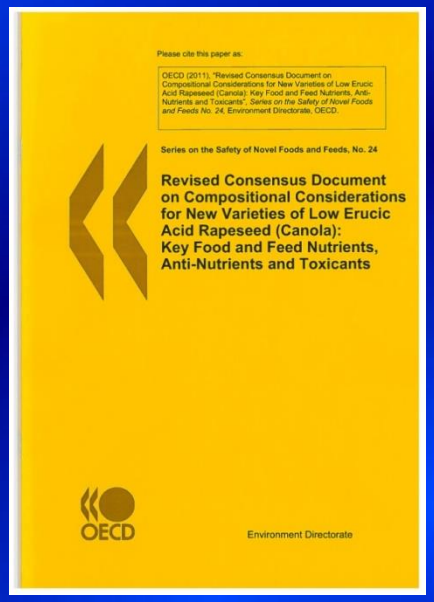


Analisi composizionale

- L'analisi dovrebbe essere effettuata sul prodotto agricolo non processato.
- I composti da analizzare dovrebbero essere selezionati in accordo con il Consenus Document dell'OECD (considerazioni composizionali su nuove varietà di piante)

  - **umidità, proteine, lipidi, carboidrati, ceneri, macro e micro nutrienti, composti anti-nutrizionali, tossine naturali ed allergeni.**

  - **metaboliti caratteristici della specie analizzata.**



Caratterizzazione Agronomica e Fenotipica

Anche gli aspetti relativi alla biologia della pianta dovrebbero essere valutati:

Resa, morfologia della pianta, tempo di fioritura, grado di maturazione, vitalità del polline, risposta della pianta ai patogeni e agli insetti nocivi, sensibilità agli stress abiotici (freddo, caldo, carenza idrica).

Differenze agronomiche tra pianta GM e comparatore, al di là dell'effetto intenzionale, potrebbero fornire indicazioni **sugli effetti non intenzionali**, valutabili tramite caratterizzazione molecolare e composizionale.

Analisi Statistica

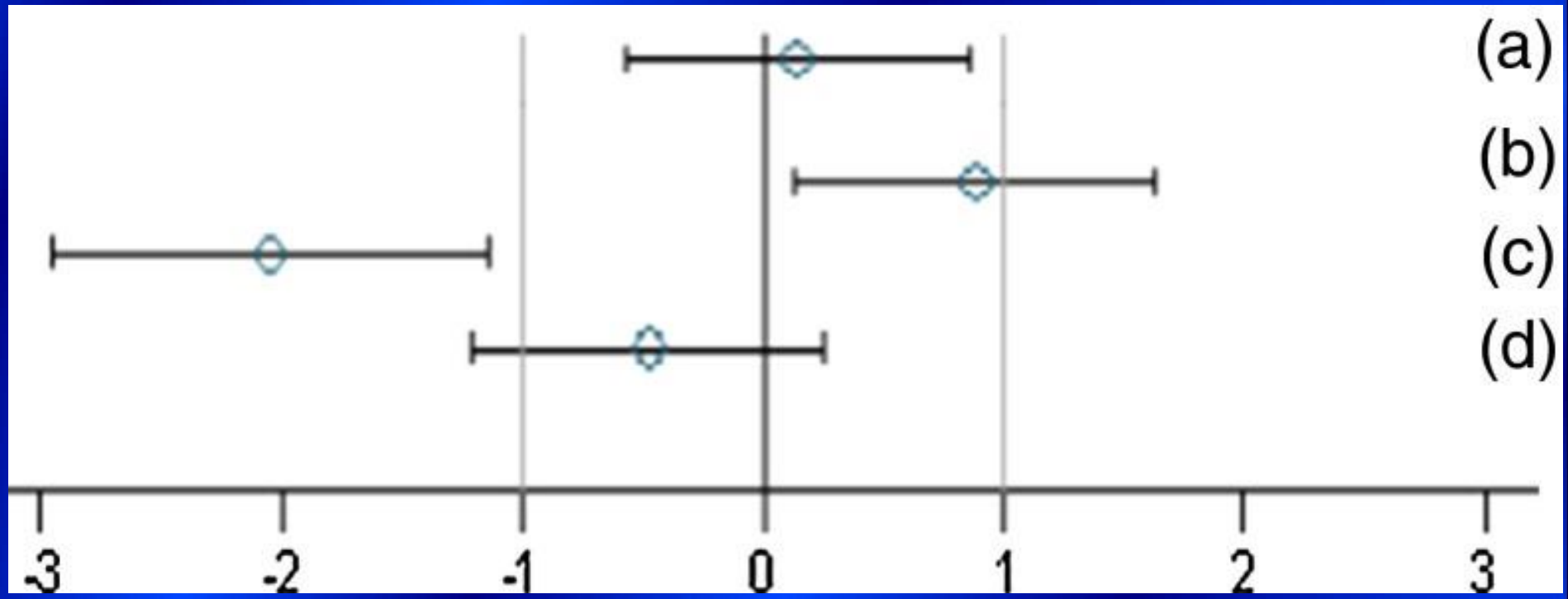
L'analisi statistica segue due approcci:

- **Un test della differenza** per verificare se la pianta GM è diversa dal suo comparatore e quindi potenzialmente essere considerata un pericolo (rischio potenziale)

- **Un test della equivalenza** per verificare se la pianta GM è equivalente o no alle varietà non-GM con una storia consolidata di sicurezza d'uso.

Valutazione della rilevanza biologica delle differenze e/o non equivalenze

Visualizzazione grafica della significatività statistica e della rilevanza biologica delle differenze tra gruppi



La linea nera verticale indica "*nessun effetto*" (zero differenze), mentre le 2 linee grigie indicano una supposta rilevanza biologica (tossicologica). ±1.0 DS.

Le conclusioni della valutazione comparativa dovrebbero chiaramente evidenziare se:

- Ci sono differenze composizionali tra pianta GM e suo comparatore;
- Ci sono differenze agronomiche e fenotipiche tra pianta GM e suo comparatore. In tal caso, si dovranno prendere in considerazione le variazioni naturali;
- Queste differenze sono dovute ad **effetti intenzionali o non intenzionali.**

Pianta GM

?

Controparte tradizionale

Effetti intenzionali /non intenzionali delle tecniche di breeding

Effetti intenzionali

Gli effetti che rispondono agli obiettivi della modificazione genetica

Effetti non intenzionali

L' effetto non intenzionale di per sé non è un problema sanitario.

Possiamo distinguere:

- **quelli prevedibili a seguito dell'introduzione dell'inserto; (biologia della pianta, network metabolici);**
- **quelli inaspettati.**

È ormai evidente che gli effetti non intenzionali si manifestano in ogni tipo di programma di breeding, incluse convenzionale e NBTs

Effetti non intenzionali

Integrazione random del gene esogeno

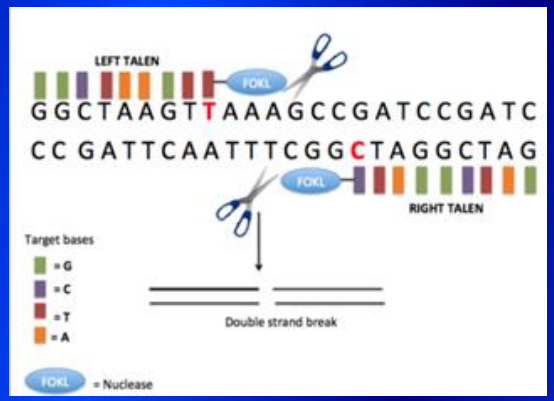
⇒ mutagenesi inserzionale

⇒ disfunzione di gene/i endogeni

- attivazione/ disattivazione

- produzione di nuove proteina

⇒ cambiamenti/alterazioni a livello di:



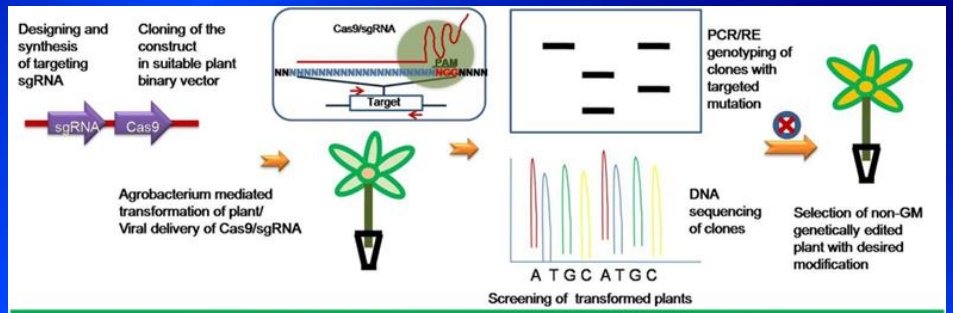
- **enzimi**
- **metaboliti**
- **fenotipo**
- **nutrienti/antinutrienti**

Perché gli effetti non intenzionali possono essere irrilevanti?

- Abbiamo una storia consolidata di breeding con pochissimi esempi di effetti avversi.
- Chi si occupa di breeding sviluppa nuove varietà sicure, ed è improbabile che una varietà sicura si trasformi in una insicura a seguito di effetti non intenzionali.

Perché gli effetti non intenzionali possono essere rilevanti?

- Nuove e potenti tecniche (genome editing, biologia sintetica), permettono di introdurre nuove proteine, RNA, metaboliti secondari nella filiera alimentare.



Basic strategy of plant genome editing with Cas9/sgRNA system

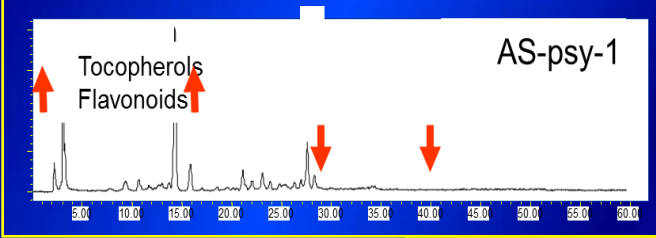
Analisi composizionale per valutare gli effetti (non)intenzionali

Analisi Composizionale

Targeted analysis di singoli composti

Spettro dei pathways fisiologici

Selezione dei composti



Non-targeted Profiling Methods

Genomica

Trascrittomica

Proteomi

Metabolomica

- **Valutazione di un ampio spettro di composti**
- **Interconnettività dei pathways**
- **Aumentata probabilità di rivelare effetti non intenzionali**

L'EFSA ha pubblicato linee guida integrative per rafforzare ulteriormente la valutazione del rischio da piante geneticamente modificate. I documenti tengono conto di nuovi sviluppi scientifici e normativi, e integra le raccomandazioni contenute nella regolamentazione e nelle linee guida esistenti

EFSA Journal

SCIENTIFIC OPINION

ADOPTED: 18 May 2017

doi: 10.2903/j.efsa.2017.4862

Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO),
Hanspeter Naegeli, Andrew Nicholas Birch, Josep Casacuberta, Adinda De Schrijver, Mikolaj Antoni Gralak, Philippe Guerche, Huw Jones, Barbara Manachini, Antoine Messéan, Elsa Ebbesen Nielsen, Fabien Nogué, Christophe Robaglia, Nils Rostoks, Jeremy Sweet, Christoph Tebbe, Francesco Visioli, Jean-Michel Wal, Philippe Eigenmann, Michelle Epstein, Karin Hoffmann-Sommergruber, Frits Koning, Martinus Lovik, Clare Mills, Francisco Javier Moreno, Henk van Loveren, Regina Selb and Antonio Fernandez Dumont

Abstract

This document provides supplementary guidance on specific topics for the allergenicity risk assessment of genetically modified plants. In particular, it supplements general recommendations outlined in previous EFSA GMO Panel guidelines and Implementing Regulation (EU) No 503/2013. The topics addressed are non-IgE-mediated adverse immune reactions to foods, *in vitro* protein digestibility tests and endogenous allergenicity. New scientific and regulatory developments regarding these three topics are described in this document. Considerations on the practical implementation of those developments in the risk assessment of genetically modified plants are discussed and recommended, where appropriate.

© 2017 European Food Safety Authority. *EFSA Journal* published by John Wiley and Sons Ltd on behalf of European Food Safety Authority.

efsa European Food Safety Authority

EFSA Journal 2015;13(6):4128

SCIENTIFIC OPINION

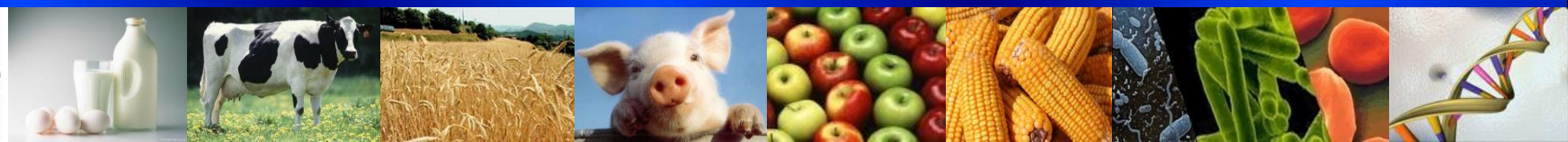
Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants[1]

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)[2,3]

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

Abstract

This document provides guidance for the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified (GM) plants and clarifies the EFSA GMO Panel's view on how agronomic and phenotypic data support the risk assessment of GM plants. Specific recommendations are given on (1) the selection of sites and test materials; (2) the quality and design of field trials; (3) the selection of relevant agronomic and phenotypic endpoints; and (4) data analysis. The guidance proposes a comprehensive and harmonised approach for the agronomic and phenotypic characterisation of GM plants, which should ensure the best use of agronomic and phenotypic data for the comparative analysis of GM plants and derived food and feed products, and for their food and feed and environmental risk assessment.



WHAT HAS EFSA DONE SO FAR

Outputs of the EFSA GMO Panel

January 2012

- Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis

www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2561.pdf

October 2012

- Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function

www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2943.pdf

Output of the EFSA GMO Unit

October 2015

- EFSA letter providing technical assistance to EC with regard to issues related to the legal analysis of new plant breeding techniques

European Food Safety Authority
EFSA Journal 2012;10(2):2561

SCIENTIFIC OPINION

Scientific opinion addressing the safety assessment of p
through cisgenesis and intragenesis[1]

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (G

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Ita

ABSTRACT

The European Commission requested that the EFSA Panel on Genetically Mo
scientific opinion related to risk assessment of cisgenic and intragenic plants. The E
that the *Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified pla*
environmental risk assessment of genetically modified plants are applicable for the
products derived from cisgenic and intragenic plants and for performing an enviro
do not need to be developed further. It can be envisaged that on a case-by-case ba
specific data are needed for the risk assessment. The EFSA GMO Panel compared
plants produced by cisgenesis and intragenesis with those obtained either by c
techniques or by transgenesis. The Panel concludes that similar hazards can be a
conventionally bred plants, while novel hazards can be associated with intragenic
Panel is of the opinion that all of these breeding methods can produce variable f
unintended effects. The frequency of unintended changes may differ between br
occurrence cannot be predicted and needs to be assessed case by case. Independe

Le NBT e la valutazione del risch

European Food Safety Authority
EFSA Journal 2012;10(10):2943

SCIENTIFIC OPINION

Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function[1]

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)[2, 3]

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

ABSTRACT

The European Commission requested that the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms deliver a scientific opinion related to risk assessment of plants developed using the zinc finger nuclease 3 technique (ZFN-3) which allows the integration of gene(s) in a predefined insertion site in the genome of the recipient species. Since other nucleases with a similar function to ZFN are considered in this opinion the term site-directed nuclease 3 (SDN-3) is used to describe the technique rather than ZFN-3 specifically. The EFSA GMO Panel considers that its guidance documents are applicable for the evaluation of food and feed products derived from plants developed using the SDN-3 technique and for performing an environmental risk assessment. However, on a case-by-case basis lesser amounts of event specific data may be needed for the risk assessment of plants developed using the SDN-3 technique. The EFSA GMO Panel compared the hazards associated with plants produced by the SDN-3 technique with those obtained by conventional plant breeding techniques and by currently used transgenesis. With respect to the genes introduced, the SDN-3 technique does not differ from transgenesis or from the other genetic modification techniques currently used, and can be used to introduce transgenes, intragenes or cisgenes. The main difference between the SDN-3 technique and transgenesis is that the insertion of DNA is targeted to a predefined region of the genome. Therefore, the SDN-3 technique can minimise hazards associated with the disruption of genes and/or regulatory elements in the recipient genome. Whilst the SDN-3 technique can induce off-target changes in the genome of the recipient plant these would be fewer than those occurring with most mutagenesis techniques. Furthermore, where such changes occur they would be of the same types as those produced by conventional breeding techniques.

EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT

A foresight study on emerging technologies: State of the art of omics technologies and potential applications in food and feed safety[1]

REPORT 1

Review on the state of art of omics technologies in risk assessment related to food and feed safety

Pielaat A[1], Barker GC[2], Hendriksen P[3], Hollman P[3], and Peijnenburg A[3], Ter Kuile BH[4]

[1]*RIVM*, National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands
[2]*IFR*, Institute of Food Research, United Kingdom
[3]*DLO, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek*, part of Wageningen University and Research Center, the Netherlands
[4]*UvA*, University of Amsterdam, the Netherlands

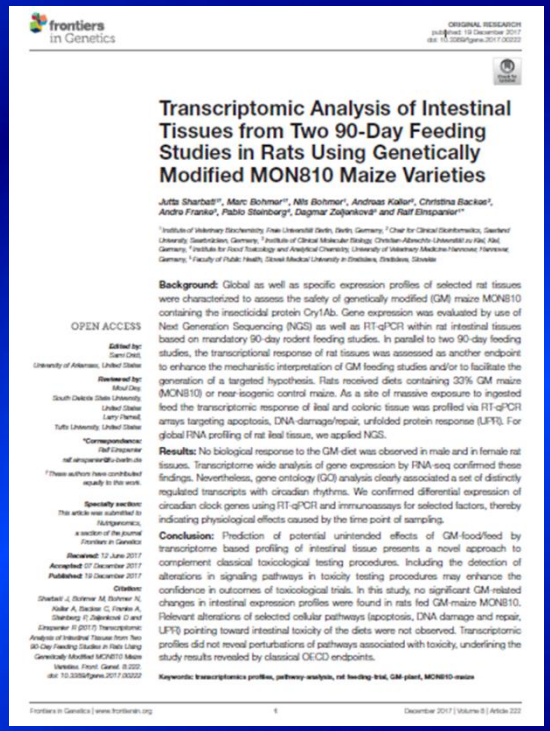
ABSTRACT

This report consists of a review of the available scientific evidence on the state of art of omics technologies with a particular focus on applications in the area of food and feed safety. The report gives a description of the different types of omics technologies with respect to recent progresses made on the application of these techniques in chemical and microbiological risk assessment. Hereto, case studies were selected in order to cover different areas under the remit of EFSA. In this review each case study has been investigated with respect to its hazard, experimental methodologies, (statistical) data analysis and its link to food/feed safety risk assessment. Finally, the added value of omics technologies as compared to classical risk assessment and current limitations of omics technologies for their application in chemical and microbiological food safety risk assessment has been discussed. This investigation shows that most of the studies on chemical agents focus on mode of action identification and a search for biomarkers using transcriptomics. As for microbial food safety, omics have not yet been successfully applied often. When applied, they never target the host, but focus on aspects of the pathogen, e.g. in detection or source attribution.

Effetti non intenzionali

Identificazione del pericolo sulla base di:

- ❑ **Caratterizzazione molecolare**
- ❑ **Analisi fenotipica**
- ❑ **Performance agronomica**
- ❑ **Analisi composizionale (analisi mirata)**
- ❑ **Studi di alimentazione su animali con alimento in toto**



frontiers in Genetics

ORIGINAL RESEARCH

published: 19 December 2017

doi: 10.3389/fgene.2017.00222

Transcriptomic Analysis of Intestinal Tissues from Two 90-Day Feeding Studies in Rats Using Genetically Modified MON810 Maize Varieties

Jutta Sharbati[1†], Marc Bohmer[1†], Nils Bohmer[1], Andreas Keller[2], Christina Backes[3], Andre Franke[3], Pablo Steinberg[4], Dagmar Zajankova[5] and Ralf Einspanier[1]*

[1] Institute of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, [2] Chair for Clinical Bioinformatics, Saarland University, Saarbrücken, Germany, [3] Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany, [4] Institute for Food Toxicology and Analytical Chemistry, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, [5] Faculty of Public Health, Slovak Medical University in Bratislava, Bratislava, Slovakia

Background: Global as well as specific expression profiles of selected rat tissues were characterized to assess the safety of genetically modified (GM) maize MON810 containing the insecticidal protein Cry1Ab. Gene expression was evaluated by use of Next Generation Sequencing (NGS) as well as RT-qPCR within rat intestinal tissues based on mandatory 90-day rodent feeding studies. In parallel to two 90-day feeding studies, the transcriptional response of rat tissues was assessed as another endpoint to enhance the mechanistic interpretation of GM feeding studies and/or to facilitate the generation of a targeted hypothesis. Rats received diets containing 33% GM maize (MON810) or near-isogenic control maize. As a site of massive exposure to ingested feed the transcriptomic response of ileal and colonic tissue was profiled via RT-qPCR arrays targeting apoptosis, DNA damage/repair, unfolded protein response (UPR). For global RNA profiling of rat ileal tissue, we applied NGS.

Results: No biological response to the GM-diet was observed in male and in female rat tissues. Transcriptome wide analysis of gene expression by RNA-seq confirmed these findings. Nevertheless, gene ontology (GO) analysis clearly associated a set of distinctly regulated transcripts with circadian rhythms. We confirmed differential expression of circadian clock genes using RT-qPCR and immunoassays for selected factors, thereby indicating physiological effects caused by the time point of sampling.

Conclusion: Prediction of potential unintended effects of GM-food/feed by transcriptome based profiling of intestinal tissue presents a novel approach to complement classical toxicological testing procedures. Including the detection of alterations in signaling pathways in toxicity testing procedures may enhance the confidence in outcomes of toxicological trials. In this study, no significant GM-related changes in intestinal expression profiles were found in rats fed GM-maize MON810. Relevant alterations of selected cellular pathways (apoptosis, DNA damage and repair, UPR) pointing toward intestinal toxicity of the diets were not observed. Transcriptomic profiles did not reveal perturbations of pathways associated with toxicity, underlining the study results revealed by classical OECD endpoints.

Keywords: transcriptomics profiles, pathway-analysis, rat feeding-trial, GM-plant, MON810-maize

OPEN ACCESS

Edited by:
Sami Dixit,
University of Arkansas, United States

Reviewed by:
Moul Dey,
South Dakota State University, United States
Larry Parnell,
Tufts University, United States

**Correspondence:*
Ralf Einspanier
ralf.einspanier@vu-berlin.de

†These authors have contributed equally to this work.

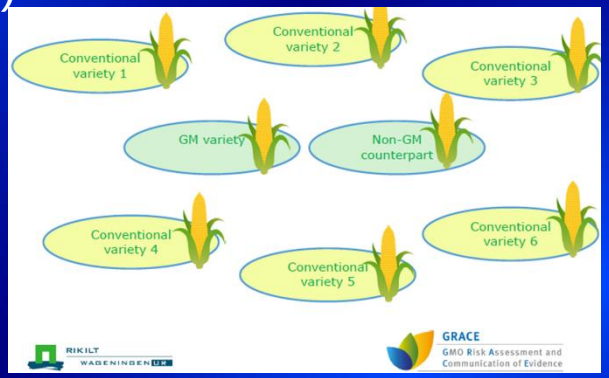
Specialty section:
This article was submitted to Nutrigenomics, a section of the journal Frontiers in Genetics

Received: 12 June 2017
Accepted: 07 December 2017
Published: 19 December 2017

Citation:
Sharbati J, Bohmer M, Bohmer N, Keller A, Backes C, Franke A, Steinberg P, Zajankova D and Einspanier R (2017) Transcriptomic Analysis of Intestinal Tissues from Two 90-Day Feeding Studies in Rats Using Genetically Modified MON810 Maize Varieties. Front. Genet. 8:222. doi: 10.3389/fgene.2017.00222

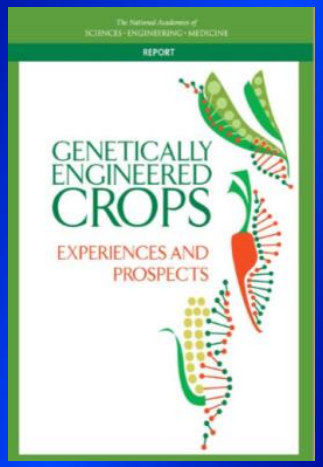
Nel progetto GRACE sono stati effettuati:

- ❑ Studi di alimentazione su animali (90 giorni, 1 anno)
- ❑ Analisi composizionale dettagliata (‘omics) del mais utilizzato negli studi di feeding

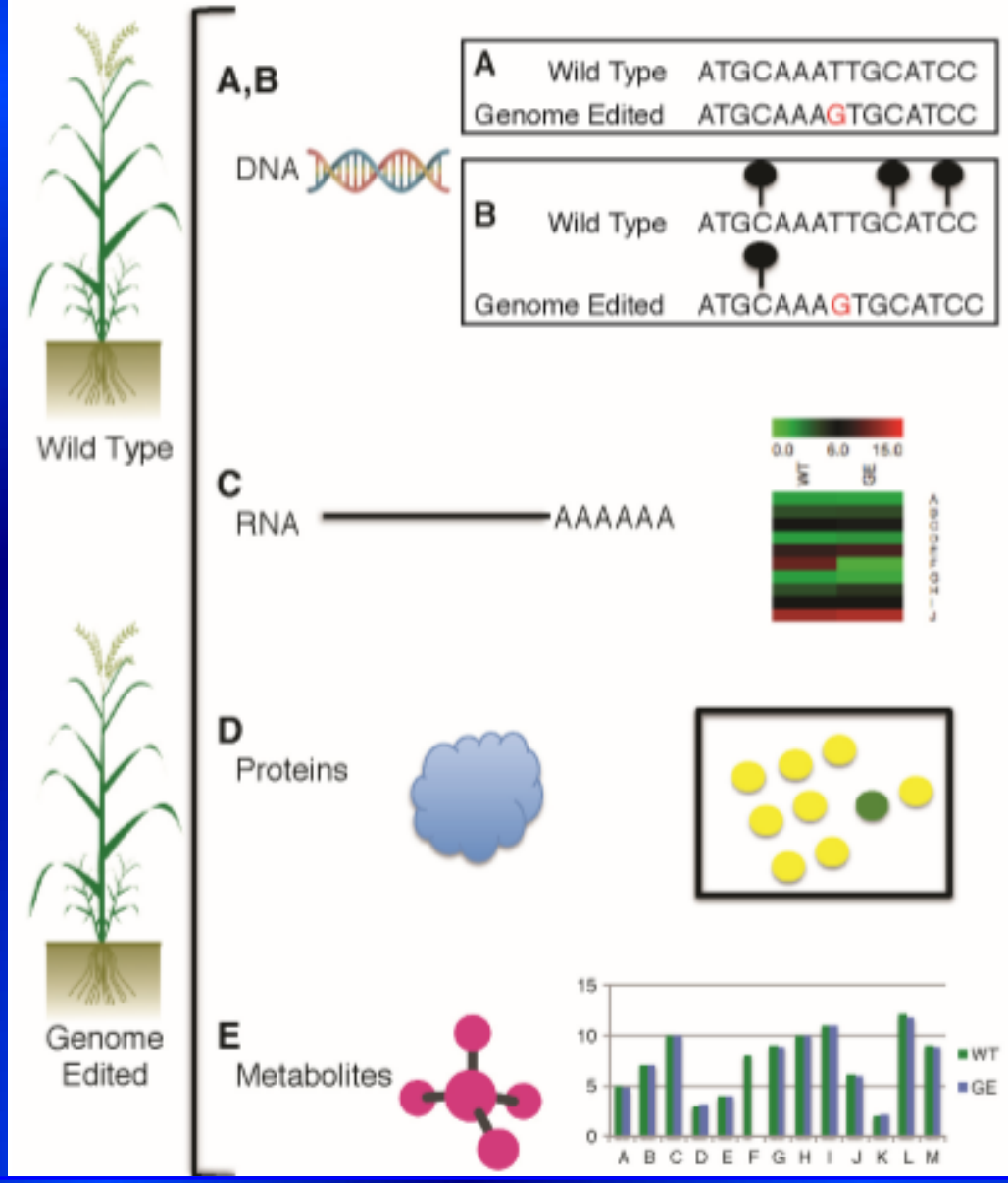


APPROCCIO OMICS alle NBT

National Academy of Sciences 2016

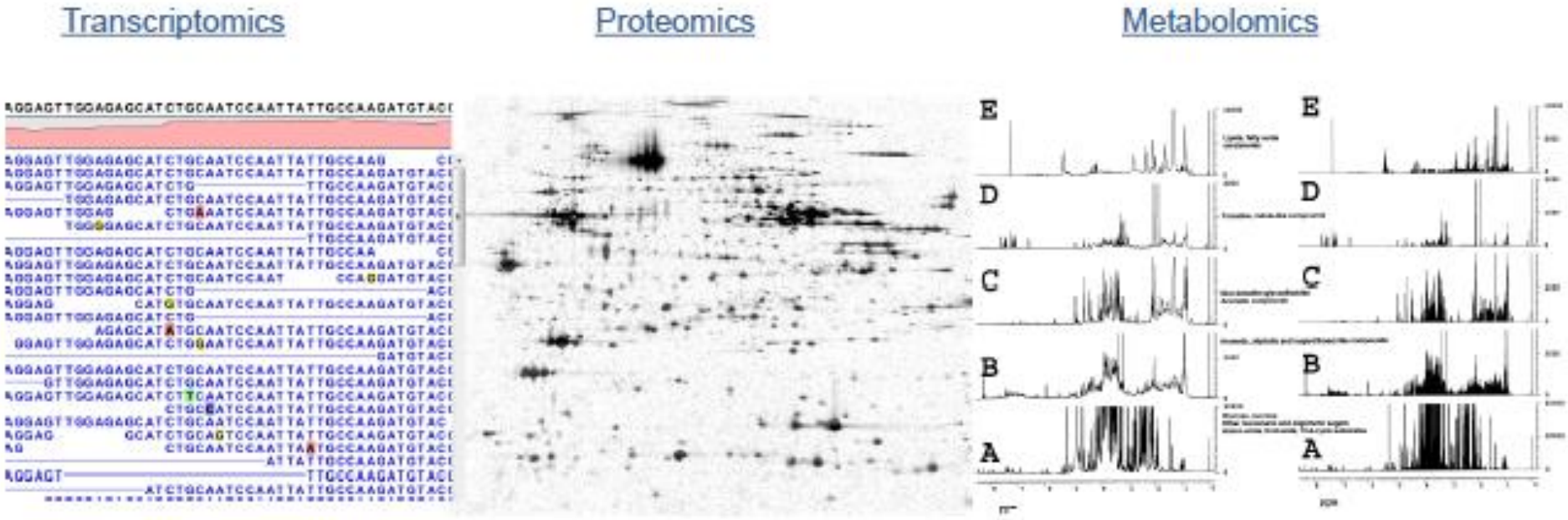


ISBN 978-0-309-43738-7 | DOI 10.17226/23395



Le NBT e la valutazione del rischio per la salute umana ed animale, 22 Febbraio 2018

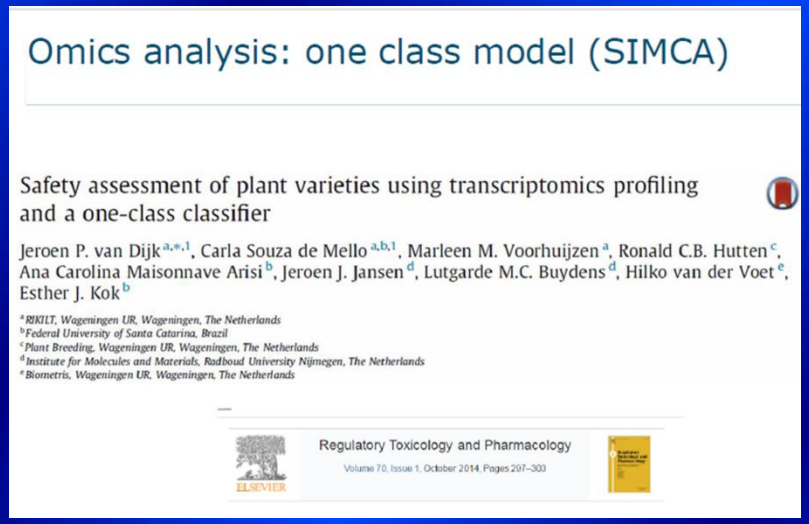
Approccio ‘omics’



La domanda è : come valutare le differenze significative nei profili omics, considerando che molte delle variazioni naturali dipendono dal genotipo e/o dalle condizioni di crescita (condizioni climatiche, suolo…….) ?

Modello ONE-CLASS

sviluppato da Wageningen UR e dalla Università Nijmegen

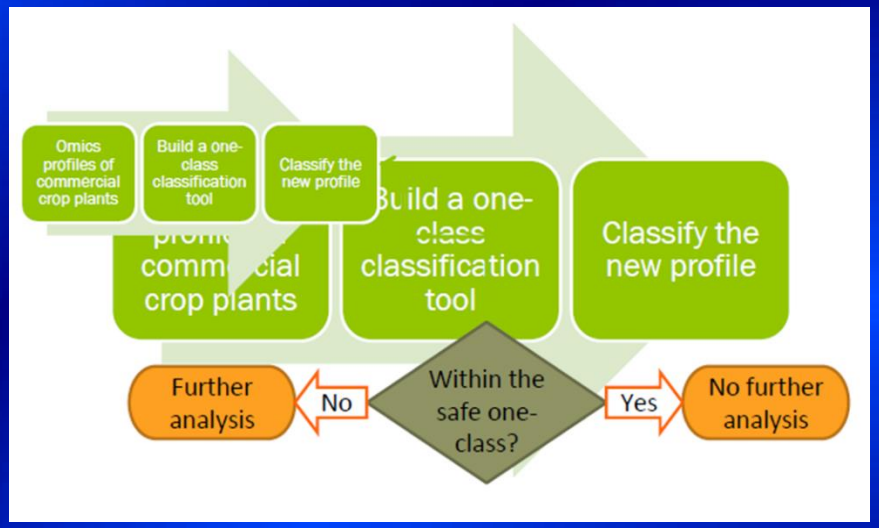

Omics analysis: one class model (SIMCA)

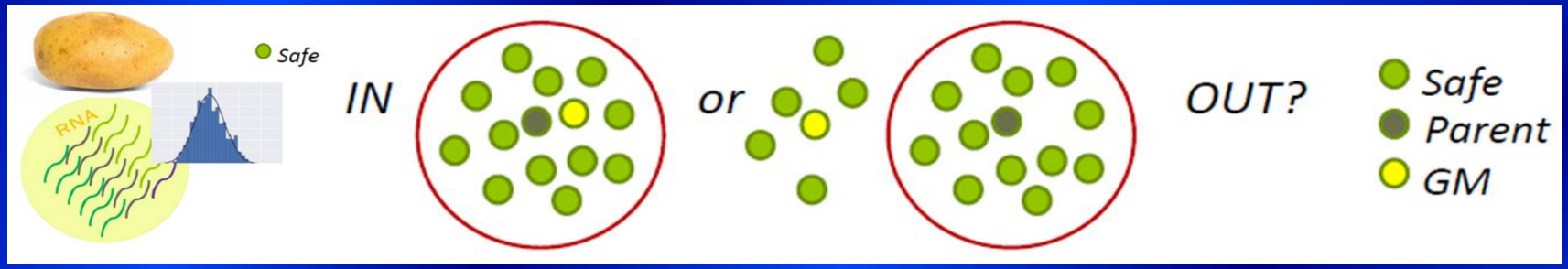
Safety assessment of plant varieties using transcriptomics profiling and a one-class classifier

Jeroen P. van Dijk[a,*,1], Carla Souza de Mello[a,b,1], Marleen M. Voorhuijzen[a], Ronald C.B. Hutten[c], Ana Carolina Maisonnave Arisi[b], Jeroen J. Jansen[d], Lutgarde M.C. Buydens[d], Hilko van der Voet[e], Esther J. Kok[b]

[a] RIKILT, Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands
[b] Federal University of Santa Catarina, Brazil
[c] Plant Breeding, Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands
[d] Institute for Molecules and Materials, Radboud University Nijmegen, The Netherlands
[e] Biometris, Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands

Regulatory Toxicology and Pharmacology
Volume 70, Issue 1, October 2014, Pages 297–303





- Il modello esclude una buona parte delle varietà utilizzabili per il consumo umano, ma più distanti geneticamente dalle varietà consumate correntemente, dalla one-class Safe ⟹ **approccio conservativo**
- Tutti i mais utilizzati negli studi a 90 giorni sono rientrati nella One-class Safe
- Mais contaminato da micotossine non è rientrato nella One-class Safe

CONCLUSIONI/RACCOMANDAZIONI

- L'applicazione delle tecnologie -omics ha il potenziale di rilevare le modificazioni/alterazioni attribuibili al breeding convenzionale e all' applicazione dell'ingegneria genetica (GM e NBTs).

- Per poter utilizzare a pieno le loro potenzialità nella valutazione del rischio è necessario sviluppare database specifici e esaurienti che comprendano dati relativi a genotipi coltivati in diverse condizioni ambientali.

- Indispensabile quindi , la conoscenza 'completa' della biologia delle piante (DNA, RNA, proteine e metaboliti).

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

marzia.degiacomo@iss.it