



Master di II Livello in “*PROTEZIONE DA EVENTI CBRN-e*”

**Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento Ingegneria Industriale**

TESI DI MASTER

**IL CAMPIONAMENTO E L’ANALISI BIOLOGICA IN
SCENARI OPERATIVI IN CONDIZIONI DI EMERGENZA
PROCEDURE SPERIMENTALI**

Candidato:

SALVATORE MINGHETTI
Ministero dell’Interno - Dip. Dei Vigili del Fuoco
del Soccorso Pubblico e della Difesa Civile
Comando VVF di Venezia

Relatore: Prof. Dott. Roberto Fiorito
Università di Roma “Tor Vergata”
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dip. Di Biomedicina e Prevenzione

Correlatore: Dott.ssa Lina Di Giamberardino
Ministero dell’Interno - Dip. Dei Vigili del Fuoco
del Soccorso Pubblico e della Difesa Civile
Dir. Centrale per la Formazione

Anno Accademico 2013/2014

A Elena

Ai miei genitori Clara e Giacinto

A mio fratello Marco

INDICE

CAPITOLO 1	6
INTRODUZIONE	6
CAPITOLO 2	9
AGENTI BIOLOGICI E ASPETTI MEDICO-SANITARI	9
2.1 ASPETTI MEDICO-SANITARI	11
2.2 BATTERI	16
2.3 VIRUS	17
2.3.1 <i>Virus nudi</i>	17
2.3.2 <i>Virus con involucro</i>	18
2.3.3 <i>Il ciclo riproduttivo virale</i>	19
2.4 TOSSINE (BIOTOSSINE)	20
2.5 FUNGHI (FUNGI-MYCOTA)	21
2.6 AGENTI IN CLASSE "A"	21
2.6.1 <i>Batterio del carbonchio o antrace (Bacillus anthracis)</i>	24
2.6.2 <i>Batterio della peste (Yersinia pestis)</i>	27
2.6.3 <i>Batterio della tularemia (Francisella tularensis)</i>	30
2.6.4 <i>Virus del vaiolo (Variola major)</i>	31
2.6.5 <i>Virus delle febbri emorragiche</i>	33
2.6.6 <i>Tossina botulinica (Chlostridium botulinum)</i>	35
2.7 ALTRI AGENTI DI INTERESSE	36
2.7.1 <i>Brucella spp (categoria "B")</i>	37
2.7.2 <i>Tossina ricinica</i>	39
2.7.3 <i>O.G.M. (organismi geneticamente modificati)</i>	39
2.8 LE VIE DI PENETRAZIONE DEGLI AGENTI BIOLOGICI	40
CAPITOLO 3	44
IL CAMPIONAMENTO BIOLOGICO	44
3.1 METODICHE DI CAMPIONAMENTO	44
3.1.1 <i>Cenni di teoria del campionamento</i>	44
3.1.2 <i>Il campione di controllo "bianco"</i>	46
3.2 IL CAMPIONAMENTO NELLE DIVERSE MATRICI	46
3.2.1 <i>Campionamento in matrice aerea/gassosa</i>	46
3.2.2 <i>Campionamento in matrice liquida</i>	49
3.2.3 <i>Campionamento in matrice solida</i>	51
3.2.4 <i>Campionamento in matrici particolari</i>	54
3.2.5 <i>Strumentazione - Equipaggiamento</i>	56
3.3 TRATTAMENTO E TRASPORTO DEI CAMPIONI	62
3.3.1 <i>I dati del campione</i>	62
3.3.2 <i>Confezionamento per il trasporto e spedizione dei campioni</i>	63
3.3.3 <i>Controllo campione</i>	65
CAPITOLO 4	66

L'ATTIVITA' DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI DEI VIGILI DEL FUOCO	66
4.1 DISPOSTO NORMATIVO	71
4.1.1 <i>Procedure per il campionamento biologico</i>	72
4.1.2 <i>Indumenti di protezione biologica</i>	73
4.2 LA SQUADRA DI CAMPIONAMENTO CBRNe.....	75
4.2.1 <i>Team Leader</i>	76
4.2.2 <i>Uomo Sporco</i>	77
4.2.3 <i>Uomo Pulito</i>	77
4.2.4 <i>Compilatore/Trasmettitore</i>	78
4.2.5 <i>L'Area di campionamento – La zonazione</i>	79
4.3 L'INTERVENTO DI CAMPIONAMENTO BIOLOGICO	81
4.4 IL CAMPIONAMENTO DEI VIGILI DEL FUOCO NUOVE PROSPETTIVE	83
4.5 LA SCHEDA DI CAMPIONAMENTO.....	84
4.6 LA DECONTAMINAZIONE	84
4.7 L'ANALISI SUL CAMPIONE	85
4.7.1 <i>Trattamento del campione e metodologie di analisi</i>	85
4.7.2 <i>Estrazione del DNA</i>	87
4.7.3 <i>La tecnica P.C.R. (polymerase chain reaction)</i>	89
4.7.4 <i>Test di identificazione immunologica (biostrips)</i>	98
4.7.5 <i>Prove di rivelazione di tossina ricinica</i>	99
4.7.6 <i>Ulteriori approcci analitici</i>	101
4.7.7 <i>Problematiche (comparabilità e riproducibilità)</i>	102
4.7.8 <i>Collaborazioni con altri enti e progetti</i>	103
CAPITOLO 5	105
IL LABORATORIO BIOLOGICO MOBILE SPERIMENTALE DEL NUCLEO NBCR VVF DI VENEZIA	105
5.1 IL SISTEMA INTEGRATO DI GLOVE-BOXES	109
5.2 L'APPARATO FILTRANTE	112
5.3 LA DECONTAMINAZIONE DELLE CAMERE A GUANTI.....	114
5.4 LA PRECAMERA	117
5.5 LA SEZIONE CENTRALE	117
5.6 LA SEZIONE DI ALLOGGIO AUTOCLAVE	118
5.7 PARETI SUPERIORI E PANNELLI DI CONTROLLO	119
5.8. MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE	120
5.9 LA STERILIZZAZIONE	121
CAPITOLO 6	125
DISCUSSIONE.....	125
6.1 CONSIDERAZIONI.....	125
CAPITOLO 7	128
CONCLUSIONI	128
7.1 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	128
RIFERIMENTI NORMATIVI	131
BIBLIOGRAFIA.....	132

SITI WEB DI INTERESSE133

FASCICOLO ALLEGATO (fuori testo)

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Un numero incredibilmente grande di organismi patogeni è in grado di attaccare l'uomo causando malattia e morte, sia direttamente che attraverso il rilascio di potenti *tossine*.

Molti di tali organismi sono stati oggetto di numerosi trattati e lavori scientifici e naturalmente, sia in passato che attualmente, hanno catalizzato l'attenzione da parte di medici, biologi, immunologi ed in generale di tutta la comunità scientifica internazionale.

Alcuni di questi organismi hanno la capacità di generare epidemie e in alcuni casi addirittura pandemie.

Si tratta di *virus*, *batteri*, *funghi*, *protozoi*, *alghe*, *prioni* ed altri organismi, appartenenti a differenti *regni* e *phyla*, che si trovano ad interfacciarsi con la specie *Homo sapiens sapiens*, sia in stadi diversi del loro ciclo biologico che della loro storia filogenetico/evolutiva. Alcuni di questi *microrganismi* sono in grado di trasmettersi da alcuni animali vertebrati all'uomo e viceversa causando malattie note come “*zoonosi*”.

La rapidità con cui, molti di essi si riproducono e quindi la possibilità che nuovi geni, frutto di mutazioni e ricombinazione, si fissino all'interno di una popolazione generando ceppi muniti di caratteristiche di resistenza ai farmaci, accresciuta virulenza e patogenicità, risulta dunque aumentata in maniera esponenziale.

E' In tale quadro che, anche in considerazione delle mutate condizioni socio politiche a livello mondiale e delle sempre più numerose minacce ed atti terroristici con armi non convenzionali, il Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco, sulla base di precise disposizioni, è chiamato ad occuparsi del primo intervento in caso di eventi, in ambito civile che comportino rischi di tipo nucleare, chimico e biologico a seguito di rilascio accidentale ovvero intenzionale di materiali/sostanze potenzialmente pericolose, primo intervento che ricomprende le

azioni di campionamento, messa in sicurezza del sito e soccorso alle persone, analisi in tempi brevi e decontaminazione di sito e personale.

Il Campionamento e la successiva identificazione degli agenti patogeni di tipo biologico costituiscono un punto cruciale nella catena operativa caratterizzante l'attività di intervento del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco che si trova a dover affrontare una molteplicità di scenari e situazioni meritevole di una più attenta considerazione.

Lo scopo del presente lavoro è anche quello di ottimizzare la catena che partendo dal campionamento passa per l'identificazione e si chiude con la messa in sicurezza e decontaminazione del sito, comprendendo infine anche la gestione dal punto di vista sanitario delle persone coinvolte.

La possibilità di sperimentare diverse modalità di campionamento/analisi attraverso studi mirati e prove pratiche sul campo, anche col supporto di altri enti, non può che aumentare la professionalità che, peraltro, già contraddistingue ogni operazione effettuata dalle squadre VF, sia in ambito di soccorso tecnico urgente che di protezione e sicurezza civile.

Le tecniche di base, oltre a quelle che sono in via di sperimentazione, verranno considerate nel presente lavoro, anche allo scopo di delineare una serie di linee guida da poter utilizzare in ambito internazionale (moduli europei di intervento in emergenza). Nei capitoli successivi verranno considerate le differenze tra i vari tipi di campionamento e analisi, che saranno valutate in maniera critica e mirata agli sviluppi funzionali. E' d'altra parte intuitiva la valenza del campionamento ed il grande peso che ha nella rapida risoluzione dell'intervento che vede coinvolte sostanze pericolose di tipo convenzionale e non. Un buon campionamento può influire in maniera positiva sulle analisi successive quanto un cattivo campionamento può essere direttamente responsabile di mancata identificazione ovvero di risultati non attendibili.

Il trattamento del campione in sicurezza è un altro punto cruciale ed importante. Con l'ideazione e lo sviluppo di nuovi sistemi di contenimento si è fissato un modello di possibile gestione del problema.

Alla base della pianificazione delle operazioni sul campo devono esserci seri studi sulle modalità, le tecniche e, non ultima, la catena di conservazione dei campioni.

Per ultima, ma non in ordine di importanza, c'è l'analisi biologica veloce in condizioni di emergenza per l'identificazione di sostanze ed organismi patogeni, che deve essere effettuata per dare risposte in tempi brevi rispetto alle classiche analisi di laboratorio, sia di tipo microbiologico che di biologia molecolare e risolvere l'intervento,

Questo lavoro, lungi dal voler fornire indicazioni restrittive e vincolanti e ancor meno di voler esaurire la trattazione di una materia così complessa, si prefigge invece una valutazione obiettiva delle grandi possibilità di sviluppo legate all'uso di strumentazione sempre più idonea ed alla migliore preparazione del personale specializzato (*first responders*).

CAPITOLO 2

AGENTI BIOLOGICI E ASPETTI MEDICO-SANITARI

Nel presente capitolo si tratterà in maniera sommaria dei principali agenti biologici patogeni di interesse sanitario, potenzialmente utilizzati come armi non convenzionali e di possibile impiego ai fini di terrorismo (*bioterrorismo*).

Gli agenti biologici denominati anche BWA (*Biological Warfare Agents*), sono *batteri*, *virus*, *protozoi*, così come presenti in natura o geneticamente modificati, e *tossine*. Sono in grado di causare *malattia* e morte nell'uomo.

Sono in genere rilasciati sotto forma di aerosol (sospensione di minutissime particelle di una sostanza solida o liquida nell'aria o in un mezzo gassoso).

I BWA sono

invisibili

inodori

insapori

difficili da rilevare dopo il rilascio

Al contrario degli attacchi effettuati utilizzando agenti chimici, il loro rilascio può, nella maggior parte dei casi, non causare reazioni o sintomi immediati nei soggetti colpiti, passando così totalmente inosservato.

Comunque utili indicatori di presenza di BWA sono i seguenti:

Aumento dell'incidenza di una particolare *malattia/patologia*;

Aumento della mortalità;

Comparsa improvvisa di una *malattia infettiva*;

Manifestazioni epidemiche a spot;

Manifestazioni epidemiche extra stagionali.

Alcuni sistemi di difesa passivi, nei loro confronti, possono essere i vaccini, il miglioramento generale delle condizioni di igiene e l'uso di sostanze repellenti per insetti, l'utilizzo di particolari DPI, è da considerare che tutte queste operazioni possono effettivamente diminuire gli effetti dei BWA.

Gli agenti biologici possono essere dispersi in diversi stati fisici. Possono essere *microrganismi* viventi o forme *sporiche*. Anche la loro stabilità in ambiente risulta alquanto varia.

Possono essere diffusi mediante artropodi vettori, contatto con animali infetti, cibi ed acqua contaminati, ed anche come aerosol. L'unico requisito è quello che devono essere sufficientemente stabili in ambiente così da poter agevolmente sopportare il trasporto e la dispersione.

Per quanto riguarda le armi biologiche vere e proprie, quelle presenti presso gli arsenali militari, sono state in genere studiate per la diffusione attraverso il mezzo aereo.

Il potenziale degli agenti biologici risulta invero essere sensibilmente aumentato negli ultimi anni, in seguito alle tecnologie ed all'ingegneria genetica ed inoltre sono oggetto di studio metodi sempre più efficienti di dispersione e rilascio in ambiente.

Peraltro *la malattia* e la possibile epidemia causate da BWA sono difficili da controllare e gestire, molto più di un attacco con armi chimiche che è piuttosto confinato e non provoca fenomeni di diffusione epidemica.

Alcuni agenti sono particolarmente pericolosi perché *sporigeni*, la fase *sporigena* è caratteristica di diverse specie *batteriche* che se ne avvalgono come difesa dal mutamento delle condizioni ambientali esterne e dalla carenza di nutrienti. La forma *sporica* di resistenza è difficile da debellare ed ha notevolissima resistenza e persistenza in ambiente esterno, una volta penetrata all'interno dell'organismo umano germina producendo di nuovo il *batterio* e quindi provoca *infezione* e, in alcuni casi, *intossicazione mediante le tossine* prodotte.

BWA attualmente utilizzati
AGENTI PATOGENI NATURALI
TOSSINE NATURALI (in numero limitato)
AGENTI DI ORIGINE BIOLOGICA
BWA del futuro
AGENTI PATOGENI MODIFICATI
NUOVI TIPI DI TOSSINE (ORGANO-TOSSINE)
FRAZIONI PROTEICHE
AGENTI DI ORIGINE BIOLOGICA

Tabella 1 BWA (liberamente tratta da Field Manual NO. 4-02.7 (8-10-7)HDA)

2.1 ASPETTI MEDICO-SANITARI

Quindi, gli agenti biologici precedentemente citati sono in grado di provocare nell'uomo la *Malattia*, ovvero la perdita del normale stato di salute, con comparsa di sintomi clinici che indicano alterazioni a carico di uno o più organi o distretti dell'organismo, e provocano tale effetto attraverso *L'Infezione*, ossia la penetrazione dell'agente all'interno dell'ospite e la sua successiva replicazione oppure mediante *L'Intossicazione*, che è l'interazione tra la *tossina* e l'ospite, con conseguente alterazione della sua normale fisiologia, le *Tossinfezioni* sono poi *infezioni* con successivo rilascio di una sostanza chimica tossica all'interno dell'organismo a seguito di secrezione o dissoluzione del *microrganismo*.

Le *Malattie Infettive* sono *malattie* di origine biologica, causate dall'introduzione e successivo sviluppo all'interno dell'organismo di *microrganismi* cosiddetti patogeni.

Diamo qui di seguito qualche definizione:

CONTAGIO E' il passaggio da un individuo all'altro di una *malattia infettiva*;

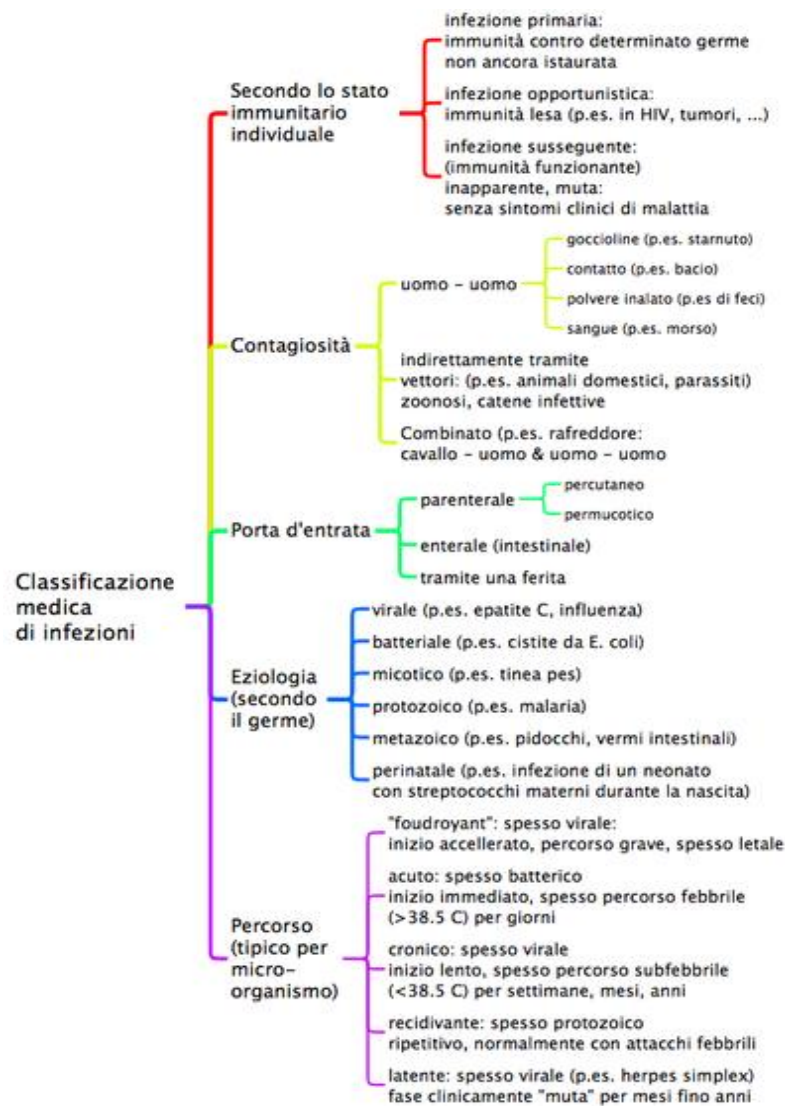
EPIDEMIA E' la diffusione a livello di una comunità di individui di una particolare *malattia infettiva* che colpisca un numero di individui superiore a quello prevedibile per quel tipo di *malattia*. E' limitata nello spazio e nel tempo;

PANDEMIA forma di *epidemia* che interessa più popolazioni ed aree geografiche a livello mondiale (es. Spagnola);

INFEZIONE Con il termine *infezione* si intende la penetrazione e la moltiplicazione (propagazione) di *microrganismi* patogeni (*virus, batteri, miceti, protozoi, metazoi*) in un *macrorganismo* (*pianta, animale, uomo*). La *malattia* è il risultato della complessa interazione tra il sistema immunitario e l'organismo estraneo, molto importante è l'*immunorispota* da parte dell'organismo attaccato, determinata dalla sua immuno-resistenza.

L'*immunodeficienza* determina la suscettibilità ad un dato agente patogeno mentre la *refrattarietà* è data da una corretta ed efficace risposta immunitaria da parte del soggetto attaccato.

Affinché una *malattia* venga definita come *infettiva*, essa deve rispondere a determinati criteri epidemiologici.



L'evoluzione di un'infezione in una *malattia infettiva* dipende da vari fattori: sistema immunitario, caratteristiche ambientali e dalle caratteristiche dell'agente eziologico (*microrganismo*) come:

- **patogenicità**
- **virulenza**
- **tossinogenicità**
- **diffusione**
- **infettività**
- **contagiosità**
- **dannosità**
- **carica microbica**
- **velocità di riproduzione**

Di queste caratteristiche andiamo di seguito a dare una sintetica descrizione:

Patogenicità: è la capacità potenziale di alcuni microrganismi di causare malattia, si tratta di un rapporto unicausale;

Virulenza: è l'aggressività di un microrganismo, la capacità di produrre malattia superando le difese dell'organismo ospite. Presenta diversi livelli di gravità (alta – media – bassa), la virulenza di un agente è inversamente proporzionale alla concentrazione del microrganismo. Rappresenta la severità relativa della malattia, ceppi diversi dello stesso agente possono causare malattie con un differente grado di severità;

Tossinogenicità: è la capacità di un organismo di produrre tossine, le tossine si dividono in **endotossine** che si sviluppano all'interno di un organismo, in genere si tratta di molecole polisaccaridiche e vengono rilasciate in seguito alla lisi dell'organismo che le produce; ed **esotossine** che sono invece, in genere, sostanze proteiche che vengono prodotte dall'organismo per il rilascio in ambiente esterno con fini di difesa o di aggressione. In genere, quando si parla di endo o esotossine si parla di sostanze prodotte dai batteri;

Diffusione (facilità di diffusione): è la possibilità più o meno facile di dispersione in ambiente di un organismo ovvero la sua dispersione sul territorio, tanto più è alta e tanto più l'agente in questione è dannoso;

Infettività: è la capacità degli organismi patogeni o non patogeni di colonizzare gli organismi ospiti ovvero di dare inizio ad una infezione; si esprime come

rapporto tra soggetti esposti e soggetti infettati (maggiore è il grado di infettività e minore è il numero di microrganismi necessari a provocarla), è indice della dannosità di un agente infettivo opportunist.

Si tratta del processo di ingresso dell'organismo all'interno della cellula, a seguito del quale si ha radicamento, moltiplicazione, resistenza ed evolve in alcuni casi in infezione dando un quadro clinico differente a seconda delle caratteristiche dell'agente e dell'ospite. Se un agente non è infettivo può dare origine a malattie non infettive unicasi e multifattoriali e pluricausali. Per gli agenti infettivi si ha un diverso andamento della malattia nella popolazione colpita: sporadicità, endemia, epidemia, pandemia, alcune di queste sono state precedentemente descritte;

Contagiosità: è la capacità di un organismo di trasmettersi da un ospite ad un altro;

Dannosità: potenziale di un microrganismo di causare danni diretti o indiretti (attraverso le tossine), più o meno rilevanti, alle cellule e all'intero organismo dell'ospite;

Carica Microbica: è il numero di organismi presenti per unità di volume, per la sua determinazione si semina su piastra di Petri un volume noto del campione e si contano successivamente le colonie formatesi;

Velocità di Riproduzione: è caratteristica delle varie specie di organismi ma oltre ad essere tipicamente specie specifica e geneticamente determinata, può essere influenzata da fattori esterni come carenza/abbondanza di nutrienti e dalla variazione dei parametri ambientali.

Periodo di Incubazione: è il tempo che intercorre tra l'esposizione ad un agente infettivo e la comparsa dei primi sintomi di malattia. Dipende da diverse variabili come il tipo di agente la via di ingresso, la dose e le caratteristiche biologiche specifiche dell'ospite.

Mortalità: esprime la capacità di un agente patogeno di causare la morte all'interno della popolazione infettata. Il tasso di casi fatali è la proporzione dei pazienti, clinicamente riconosciuti possedere una specifica patologia, che muoiono come risultato di tale malattia all'interno di uno specifico lasso temporale (ad esempio durante l'insorgenza di una malattia acuta).

La patologia che può essere causata dall'agente biologico, dipende dall'interazione multifattoriale tra l'agente biologico, l'ospite (incluso il suo stato immunologico e nutrizionale) e l'ambiente (temperatura, qualità dell'acqua, densità di popolazione).

Agente/malattia	Dose infettante	Tempo di Incubazione (giorni)	Vaccino/antidoto
carbonchio	8.000-50.000 spore	1-5	disponibile*
brucellosi	10-100 organismi	5-60 (anche alcuni mesi)	non disponibile
peste	100-500 organismi	2-3	non disponibile
tularemia	10-50 organismi	2-10	non disponibile
vaiolo	10-100 organismi	7-17	disponibile
encefalite virale	10-100 organismi	2-14 (a seconda del tipo)**	non disponibile
febbre Q	1-10 organismi	10-40	non disponibile
febbre virale emorragica	1-10 organismi	4-21	non disponibile
botulino	0,001 µg/kg (tipo A)	1-5	non disponibile
enterotossina stafilococcica	30 mg (incapacitante) 1,7 µg (letale)	1-6 ore	non disponibile
saxitossina		30min-2 ore	non disponibile
* usato per proteggere i conciatori di pelle. Sussistono dubbi sulla sua efficacia in presenza di alte concentrazioni di spore. ** encefalite equina venezuelana 2-6 giorni; encefalite giapponese B (per questa è disponibile il vaccino) ed encefalite equina occidentale 7-14 giorni			

Tabella 2 caratteristiche degli agenti biologici

2.2 BATTERI

I *Batteri* (*Bacteria*) sono organismi *procarioti*, unicellulari (al massimo possono formare colonie), le loro dimensioni sono dell'ordine di pochi micrometri (risultano visibili al microscopio ottico).

Sono muniti di *parete cellulare* esterna alla membrana. Si riproducono per scissione binaria ed hanno tempi di riproduzione molto veloci (all'incirca ogni 15-30 min a seconda delle condizioni ambientali).

Presentano un metabolismo di tipo *eterotrofo* differente da quello degli *eucarioti* (es.: fermentazioni). Per quanto riguarda il movimento, alcuni di essi si muovono mediante *flagelli*.

E' interessante la produzione da parte di alcuni *batteri*, di *Capsule* e *Spore di resistenza*, in risposta a condizioni ambientali avverse, come temperatura, umidità o carenza di nutrienti.

I *batteri* sono sensibili agli *Antibiotici*.

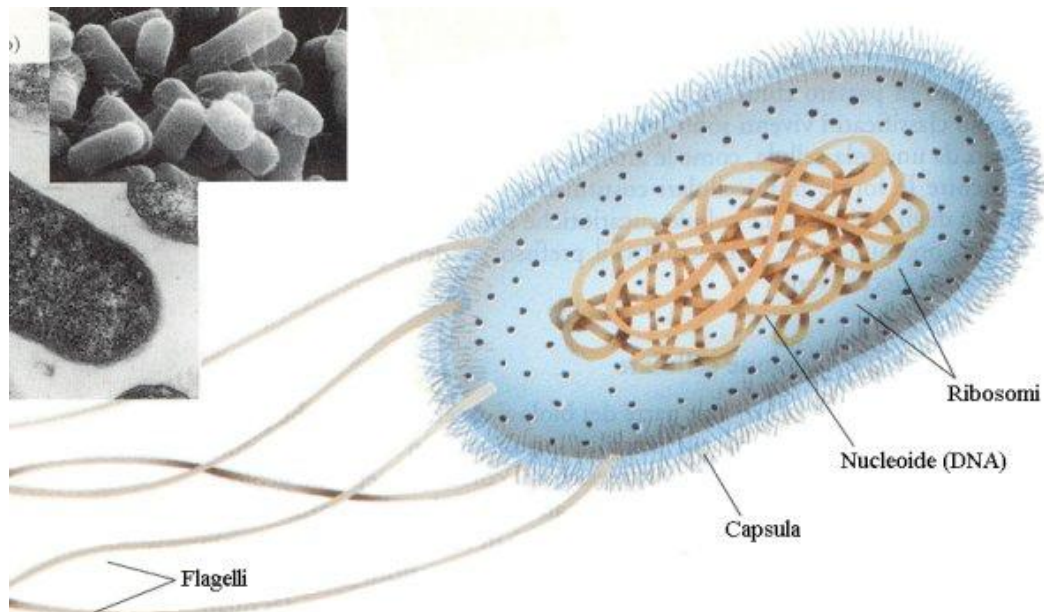


Figura 1 alcune forme batteriche

2.3 VIRUS

I *Virus* hanno struttura *acellulare*, non sono altro che del materiale genetico (DNA o RNA) circondato da un rivestimento proteico sintetizzato a spese della cellula ospite (*capside*), non sono provvisti quindi di metabolismo proprio e rappresentano una forma estremizzata di parassitismo, sono parassiti endocellulari obbligati di *batteri*, *pianze* ed *animali* ed è proprio sulla scorta di ciò che i virologi, peraltro ancora incerti riguardo alla loro origine filogenetica, ne ipotizzano comunque una origine da organismi cellulari.

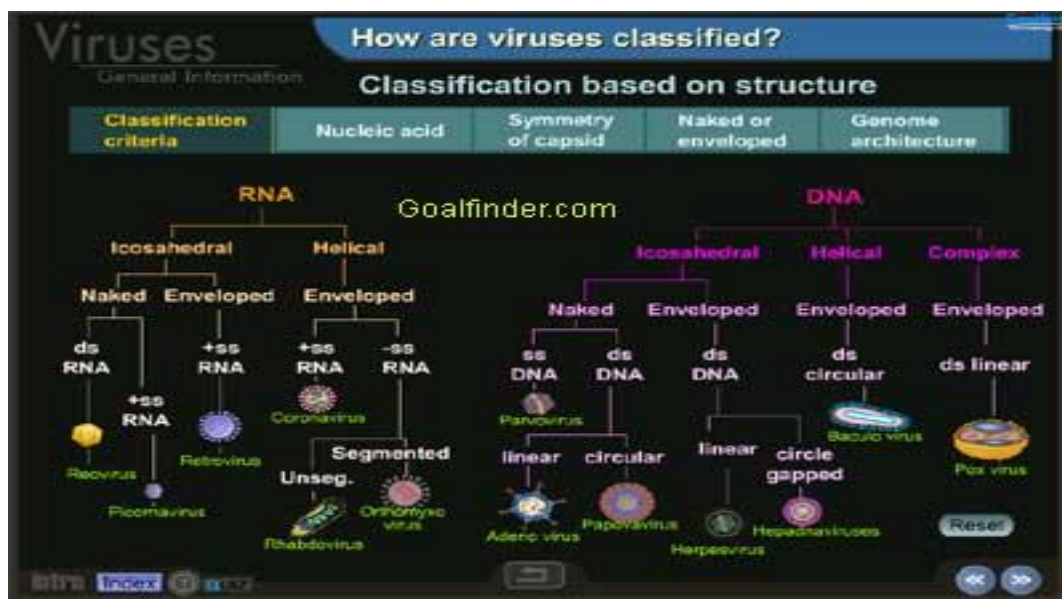


Figura 2 classificazione dei virus in base alla struttura

I *virus* hanno dimensioni che variano dai 20 ai 400 nm, non sono quindi visibili al microscopio ottico. Hanno forma variabile, simmetria cubica, elicoidale o complessa e la forma è carattere distintivo per la loro classificazione.

I *virus*, sono anche suddivisi, in base al rivestimento esterno in:

2.3.1. VIRUS NUDI

formati da acidi nucleici in quantità variabile e da un rivestimento proteico (*capside*). Il complesso di genoma e *capside* prende il nome di *virione*. Le proteine che formano il *capside* sono chiamate *capsomeri* e sono presenti in quantità variabile a seconda del tipo di *virus*.

2.3.2 VIRUS CON INVOLUCRO

I *virus con involucro* presentano una struttura di base simile a quella dei *virus nudi* con l'aggiunta a livello del rivestimento esterno di uno o più strati lipidici. In questi strati sono presenti *glicoproteine*.



Figura 3 schema di un *virus*

Avian Influenza Virus (H5N1)

Virus particles are budding from the cell surface. The length of the virus are usually 120nm, but some are longer several times.

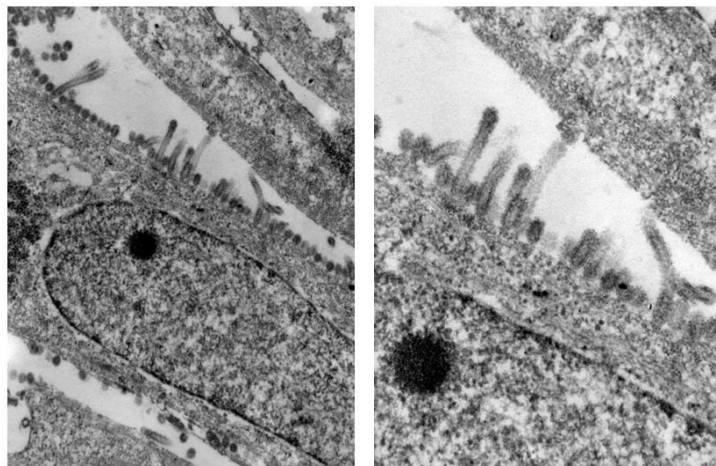


Figura 4 fasi dell'*infezione virale*

2.3.3 IL CICLO RIPRODUTTIVO VIRALE

I *virus*, come già accennato, sono endoparassiti obbligati di altri organismi *animali, vegetali e batteri*.

Per replicarsi hanno dunque bisogno di parassitare altri organismi viventi. Una volta entrati all'interno della cellula ospite i *virus* ne utilizzano il sistema di replicazione e dopo la lisi (rottura) della cellula i nuovi *virus* sono pronti ad infettare altri ospiti.

Possono però rimanere all'interno dell'ospite per periodi indeterminati (latenza) come fanno ad esempio gli *Herpes virus*.

L'insensibilità dei *virus* agli *antibiotici* è causa di numerose difficoltà nei trattamenti sanitari, esistono comunque dei farmaci *antivirali* che agiscono sostanzialmente impedendone la replicazione.

Caratteristica particolare dei *virus* è il cosiddetto “salto di specie” cioè il passaggio da una specie parassitata all'altra mai parassitata prima, a causa di complesse modifiche genetiche di natura spontanea. Il *virus* deve conservare il potere infettivo anche nel nuovo ospite e potersi trasmettere.

In tale maniera, malattie degli uccelli o di altri vertebrati superiori, possono essere trasmesse ad organismi appartenenti a diversi gruppi sistematici come ad esempio all'uomo. I *virus* a RNA sono quelli in grado di effettuare il “salto di specie”, tale salto è reso possibile dal fatto che le proteine di membrana del nuovo ospite sono simili a quelle del vecchio ospite.

Tipici salti di specie:

Maiale Uomo

Uccello Uomo

Quando avviene questo passaggio è possibile che il nuovo ospite sia completamente sprovvisto di difese immunitarie specifiche e può anche accadere che il *virus* non abbia fatto in tempo a modificarsi in varianti meno letali determinando situazioni di infezioni gravi nel nuovo ospite.

2.4 TOSSINE (*BIOTOSSINE*)

Le *Tossine* biologiche sono sostanze chimiche nocive per l'uomo prodotte da diversi *microrganismi* viventi ovvero costituenti parte di essi.

In passato l'unico sistema di produrre le *tossine* era l'utilizzo su larga scala degli organismi che le producevano, con le moderne tecniche si possono invece produrre grandi quantitativi di queste sostanze in laboratorio. Il loro uso, al posto delle armi chimiche, può rivelarsi vantaggioso a causa della possibilità di coprire la stessa area con minori quantitativi di sostanza. Inoltre possono essere meglio controllate, rispetto agli altri agenti biologici, a causa del fatto che non si riproducono ed hanno quindi effetto solo su base locale.

Non esistono allo stato attuale sistemi di individuazione veloce di un attacco con *tossine* anche se può essere utile effettuare dei test immunologici veloci. Le *tossine* producono, nei oggetti colpiti, degli effetti simili a quelli causati dagli agenti chimici anche se il trattamento dei pazienti risulta essere differente.

Table IX
A List of Select Toxins

Toxins	Natural source	Rate of action*	Stability/persistency	Usual route of entry
Cytotoxins				
Microcystin	Freshwater, blue-green algae (Microcystis)	Rapid	Unstable (depends on purification); sensitive to alkali (STB)	Inhalation
Ricin	Castor bean seeds (Ricinus communis)	Delayed/Rapid	Very stable; stable in water or dilute acids; persistent	Inhalation/ingestion
Staphylococcus enterotoxin (B)	Bacteria (Staphylococcus aureus)	Rapid	Stable in heat, acids, alkali; relatively non-persistent	Ingestion (food poisoning)
Tricothecene mycotoxins	Molds on infected grains (Fusarium)	Rapid	Very stable; resists heat, acids; persistent	Ingestion/inhalation/absorption
Neurotoxins				
Anatoxin A	Freshwater, blue green algae (Anabaena flos algae)	Very rapid	Sensitive to heat, light, and alkali	Ingestion
Batrachotoxin	Skin of South American frog (Phyllobates aurotaenia)	Rapid	Somewhat unstable; sensitive to alkali; relatively nonpersistent	Injection
Botulinum	Bacteria (Clostridium Botulinum)	Delayed	Stable but nonpersistent; stable 7 days in water, 12 hours in air; destroyed by bases or boiling 15 minutes	Ingestion (contaminated foods)
Palytoxin	Soft corals (Palythoa)	Very rapid	Persistent; stable in heat, acids, alkali	Inhalation
Saxitoxin	Contaminated shellfish (dinoflagellates of Gonyaulax)	Rapid	Stable to heat and acids; sensitive to alkali; relatively persistent	Ingestion (contaminated shellfish)
Scorpion Venom/toxins	Cobras, coral snakes, rattlesnakes, copperheads	Delayed	Stable; relatively persistent	Injection
Tetrodotoxin	Liver and ovary of puffer fish (Takifugu)	Rapid	Heat stable; sensitive to strong acids and alkalis	Ingestion/injection

*Rate of Action: Very Rapid = 5 minutes; Rapid = 5 minutes to 1 hour; Delayed = 1 to 12 hours
Source: Chief of Naval Operations, U.S. Navy CBR Defense/U.S. Marine Corps NBC Defense Handbook, April 1995

Tabella 3 le principali biotossine e le loro caratteristiche

2.5 FUNGHI (*FUNGI-MYCOTA*)

A questo regno appartengono organismi ad organizzazione unicellulare o pluricellulare, un tempo classificati nel regno vegetale; la loro cellula, di tipo *eucariotico* possiede numerosi nuclei. I *Funghi* sono molto variabili dal punto di vista morfologico.

Alcuni sono produttori di potenti *tossine*, potenzialmente utilizzabili come arma non convenzionale.

Tra i *funghi* patogeni che possono provocare nell'uomo malattie note come *Micosi*, troviamo numerose specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Trichophyton*, ma soprattutto *Pneumocystis* e *Cryptococcus*.

Alcuni di essi sono tra le principali cause di decesso nei pazienti *immunodepressi*.

2.6 AGENTI IN CLASSE “A”

I CDC (Centers for Disease Control & Prevention) di Atlanta GE-USA, così come l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), classificano gli agenti biologici in tre classi (A – B – C), in base al rischio associato ed al potenziale di infettività.

In classe “A” ci sono gli agenti considerati ad Alta Priorità. La lista include *microrganismi* che possono rappresentare un grave rischio per la sicurezza nazionale ed internazionale per una serie di motivazioni di seguito sommariamente elencate e che si prestano in particolar modo ad essere utilizzati come armi non convenzionali in contesti di guerra biologica e bioterrorismo.

Gli agenti inclusi nella classe “A” possono essere dispersi agevolmente e, trasmessi da persona a persona, causano alta morbosità e mortalità (es: *Variola major*), con potenziale grave impatto sulla sanità e sull'ordine pubblico, anche per il fatto che possono provocare panico e perturbamento sociale.

Al fine di fronteggiarli sono richieste azioni speciali per la preparazione della sanità pubblica e possono provocare effetti dirompenti sul SSN oltre a gravi ripercussioni di carattere psicologico su tutta la popolazione. (Tratto da: Ministero

della Salute - Direzione Generale della Prevenzione, Ufficio III - Malattie infettive e profilassi internazionale - Osservatorio Epidemiologico Nazionale).

La facilità di diffusione di tali organismi può essere migliorata, la loro riproducibilità, anche in grandi quantitativi, risulta essere relativamente facile.

Sono dotati di stabilità e resistenza a luce, temperatura, umidità ed alle sostanze chimiche, ai normali trattamenti sanitari e possono essere conservati in una forma pronta all'utilizzo. Presentano elevata contagiosità ed attività a basso dosaggio (es: *tossina botulinica*).

Gli agenti biologici infettivi sono stati divisi dai CDC di Atlanta sulla base di 4 criteri per ciascun agente biologico:

- 1). Impatto sulla salute pubblica per la capacità di produrre casi di malattia e morte;
- 2) Possibilità di colpire grandi masse di popolazione in quanto *microrganismi* altamente stabili, facilmente ottenibili in grandi quantità, facilmente disseminabili, con capacità di trasmissione diretta da persona a persona;
- 3) Capacità di suscitare allarme e reazioni di panico nella popolazione in quanto percepiti come altamente pericolosi;
- 4). Necessità di approntare speciali misure di sanità pubblica per il loro controllo.

Inoltre sono state assegnate 3 categorie di priorità legate alla pericolosità di questi agenti:

Categoria A: priorità 1- gli agenti più pericolosi

Sono gli agenti che hanno maggiore capacità di creare problemi di salute pubblica e sicurezza nazionale in quanto:

- in grado di produrre infezioni di massa perché possono essere facilmente disseminati su larga scala e, in alcuni casi, si possono trasmettere per contatto diretto da persona a persona;
- causano alta mortalità e morbosità;
- \ • provocano panico nella popolazione e perturbamento sociale;
- richiedono l'adozione di misure speciali per il loro contenimento.

Categoria B: priorità 2

Gli agenti in Categoria “B”, pur essendo in molti casi disseminabili su larga scala, hanno un minore impatto sulla sanità pubblica in quanto:

- causano un numero inferiore di casi di *malattia* e morte;
- non richiedono, contrariamente agli agenti di categoria “A”, la creazione di scorte di presidi terapeutici specifici, anche se possono necessitare di capacità diagnostiche elevate e di un rafforzamento dei sistemi di sorveglianza sanitaria;
- suscitano minore allarme sociale.

In questa categoria vengono classificati anche gli agenti biologici utilizzati per inquinare cibi ed acqua.

Categoria C: priorità 3

Si tratta di *microrganismi* che, allo stato attuale, non sono considerati possibili armi a fini bioterroristici, ma che potrebbero diventarlo in futuro con il progredire delle conoscenze scientifiche, in quanto:

- facilmente disponibili, producibili e disseminabili;
- in grado di provocare alta mortalità e morbosità.

Categoria A

Malattia	Capacità di creare infermità (1)	Mortalità (1)	P-D (disponibilità) (2)	P-P (persona-persona) (2)	Capacità di provocare panico nella popolazione (3)	Necessità di approntare speciali misure di sanità pubblica (4)
Vaiolo	+	++	+	+++	+++	+++
Antrace	++	+++	+++	0	+++	+++
Peste Polmonare	++	+++	++	++	++	+++
Botulismo	++	+++	++	0	++	+++
Tularemia	++	++	++	0	+	+++
Febbri emorragiche virali	++	+++	+	+	+++	++

Tabella 4 gli agenti biologici in classe “A”

2.6.1 BATTERIO DEL CARBONCHIO O ANTRACE (*Bacillus anthracis*)

Il *Bacillus anthracis* è un *bacillo* Gram positivo munito di *capsula*, non dotato di mobilità, *sporigeno*.

E' l'agente eziologico della malattia chiamata *carbonchio*, una *zoonosi*, ovvero una malattia degli animali *vertebrati* potenzialmente trasmissibile all'uomo.

La *spora* di *antrace* è estremamente resistente alle alte e basse temperature, ai raggi UV e può rimanere latente per decenni nel terreno, nell'acqua può ugualmente resistere a lungo, è estremamente resistente, in forma *sporica* all'azione di disinfettanti chimici e fisici. La *germinazione* avviene alla temperatura corporea.

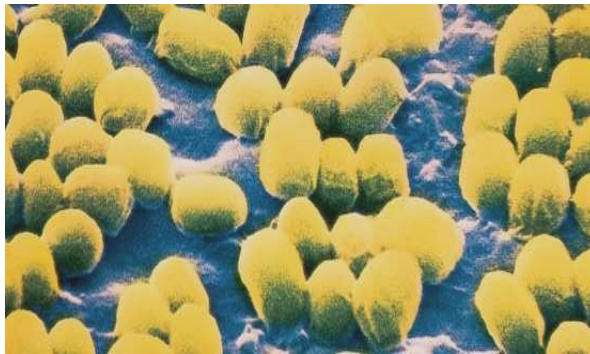


Figura 5 spore di *Bacillus anthracis*

Potrebbe essere diffuso mediante:

- disseminazione ad opera di velivoli di grandi quantità di *spore*, con formazione di aerosol incolore, inodore e assolutamente invisibile;
- impregnazione intenzionale o meno di materiali ed oggetti di uso comune e di diversa natura (es. carta da lettera, pacchi, stoffe, pellami.) sotto forma di polvere;
- aria, terriccio, materiali di diversa natura contaminati da *spore*;
- animali infetti e loro prodotti (alimenti);
- il contagio interumano è da ritenersi eccezionale.

La distruzione delle *spore* avviene alla temperatura di 72-77°C in 4-6 giorni, in 3 ore mediante il riscaldamento a secco alla temperatura di 120-140°C ed in 5 minuti in autoclave a 120°C (purché non siano protette da materiale organico).

Le forme *vegetative* sono molto meno resistenti, termolabili e sensibili all'azione dei comuni disinfettanti; vengono distrutte in 10-15 minuti con l'aumento della temperatura fino a 55-58°C; sono inattivate anche dalla esposizione ai raggi ultravioletti (6-7 ore).

Il malato di *carbonchio* non necessita mai di isolamento. La dose infettante va dalle 8000 alle 20000 *spore* (dose teorica: 1 *spora*), il periodo di incubazione va da 1 a 6 giorni.

Il *carbonchio* si presenta con tre forme di gravità crescente:

Cutaneo

Gastrointestinale

Polmonare

Il ***carbonchio cutaneo*** (95% di incidenza dei casi) è una malattia che insorge a seguito della penetrazione del *batterio* all'interno dell'organismo attraverso ferite e lesioni cutanee; era una malattia professionale che colpiva certe categorie di lavoratori come i conciatori di pelli, gli agricoltori, i tecnici di laboratorio, i veterinari.

Si tratta della forma meno grave della malattia e non ha praticamente mai esito fatale.



Figura 6 il *carbonchio cutaneo* evoluzione dal 3° al 13° giorno

L'*infezione* si manifesta inizialmente con una piccola vescicola sulla pelle che aumenta man mano di dimensioni, mentre al centro si forma una zona più scura dovuta alla *necrosi* dei tessuti. La lesione aumenta dopo due tre giorni fino ad arrivare ad un diametro di quasi due centimetri e continua il processo necrotico, mentre intorno si forma un edema provocato dall'effetto della *tossina* e dall'afflusso massiccio di cellule immunitarie. Contemporaneamente il paziente prova *malessere generale*, *linfadenopatia* locale, *cefalea* e *febbre*. La *tossina* si diffonde poi attraverso la cute e aumenta l'area necrotica. Se l'*infezione* raggiunge poi il sangue può provocare *setticemia* e morte ma, molto più frequentemente, si risolve spontaneamente o con la somministrazione di *antibiotici*. Questa forma di *carbonchio* è letale nel 20% circa dei casi non curati.

Il ***carbonchio gastrointestinale*** si contrae a seguito dell'ingestione di alimenti contenenti le *spore*.

Sintomi: dopo 2-5 giorni si hanno *febbri*, *nausea*, *vomito* e *diarrea* e comparsa di violenti *dolori addominali*. Letalità compresa tra 25-50% nei soggetti non trattati. L'isolamento del malato non è necessario.

La ***forma polmonare***, la più grave, se non curata, ha progressione estremamente rapida con *dispnea*, *cianosi*, *shock settico* e morte in meno di 24h.

Porta alla morte nella grande maggioranza dei casi se non trattati.

Come profilassi preventiva esiste un *vaccino* che conferisce un'efficace protezione ma che può provocare effetti collaterali negativi come forti *reazioni allergiche* e per tale motivo è impiegato attualmente solo per immunizzare soggetti effettivamente a rischio. Il *vaccino* si è dimostrato efficace nel 93% dei casi.

E'importante sottolineare che la fase *sporica* non è sensibile agli *antibiotici*.

Vale in questa sede ricordare che 10 grammi di *spore* di *Bacillus anthracis* sono potenzialmente in grado di causare lo stesso numero di vittime di una tonnellata di *gas nervino Sarin*.

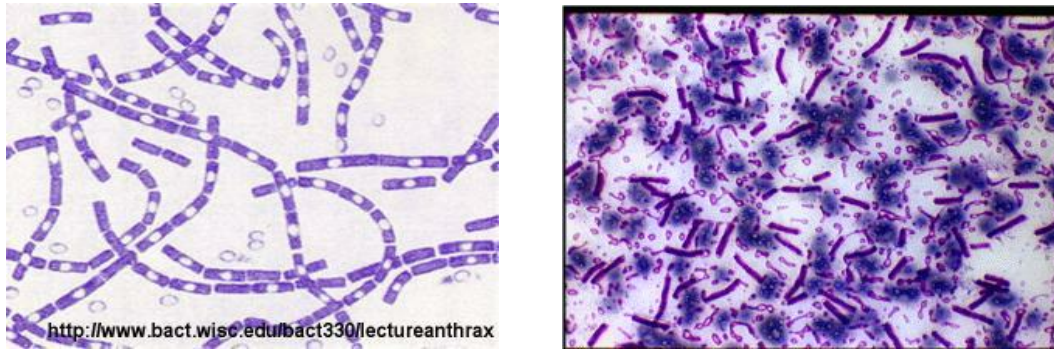


Figura 7 catene di *Bacillus anthracis* e a dx corpi batterici e spore (© Bristol Biomedical Image Archive, University of Bristol)

2.6.2 BATTERIO DELLA PESTE (*Yersinia pestis*)

E' un *bacillo* Gram Negativo *asporigeno*, *aerobio*, facoltativamente *anaerobio*, sensibile all'azione dei comuni disinfettanti chimici e fisici; in natura il ciclo di *infezione* viene mantenuto ad opera di serbatoi animali (*roditori*) e *vettori* (*pulci*) non è dotato di mobilità. Poco resistente all'essiccamento, questo *bacillo* ha altresì poca resistenza nei confronti delle variazioni di temperatura (risultano letali temperature superiori ai 30 ed inferiori a 5°C), è inoltre sensibile all'azione dei raggi ultravioletti, può però resistere per diversi giorni in caso di congelamento.

Per la decontaminazione è utile il ciclo dei 30/45 min in autoclave a 120°C ed 1 atm di pressione.

I possibili mezzi di diffusione da parte di malintenzionati sono i seguenti:

- **Per disseminazione tramite aerosol;**
- **Per contaminazione di oggetti di uso comune (trasmissione indiretta);**
- **Per mezzo di vettori e serbatoi infetti.**

La *malattia* provocata da *Yersinia pestis* si presenta con tre forme tipiche:

PESTE BUBBONICA (dagli ascessi a livello dei linfonodi)

L'ingresso iniziale del *batterio* è di difficile identificazione (puntura di *pulce*). Le *pulci* (vettori della *malattia*) rimangono infette per mesi in condizioni favorevoli. Per quanto riguarda il decorso, dopo 2 giorni circa si ha la comparsa del caratteristico “*bubbone*” che le dà il nome e che è la manifestazione di una

infezione purulenta acuta dei *linfonodi* che drenano la zona in cui è avvenuta la puntura. Si ha febbre, l'aspetto del *bubbone* è edematoso-emorragico.

Se la *malattia* non ha decorso fulminante, il *bubbone* si avvia spontaneamente verso una fase di suppurazione con fuoriuscita di materiale purulento altamente infettivo. Nei casi favorevoli la *malattia* si avvia verso la guarigione nel corso della seconda settimana.

I soggetti colpiti devono essere assolutamente tenuti in isolamento per un periodo di almeno 48 ore a partire dall'inizio delle terapie.

PESTE SETTICEMICA (presenza del batterio nel sangue)

Si ha in seguito all'ingresso dei *batteri* nel sangue dell'individuo colpito, in genere a seguito di complicazione delle forme *bubbonica* o *polmonare*, non sono evidenti ingrossamenti a carico dei linfonodi.

Il soggetto colpito presenta una importante sintomatologia di tipo settico il cui decorso risulta essere particolarmente grave.

PESTE POLMONARE

E' la forma più grave. Nella *Peste polmonare* il *batterio* è trasmesso all'uomo per via aerea. La dose infettante va dai 100 ai 20000 *batteri*, il periodo di incubazione della *malattia* è di 1-6 giorni. Il soggetto colpito presenta *febbre* elevata, *tosse*, *cianosi*, abbondante *espettorato* con presenza di sangue e muore dopo pochi giorni se non trattato. E' necessario lo stretto isolamento dei soggetti colpiti per almeno 4 giorni dall'inizio della terapia e vanno adottate misure idonee a prevenire la trasmissione per via aerea.

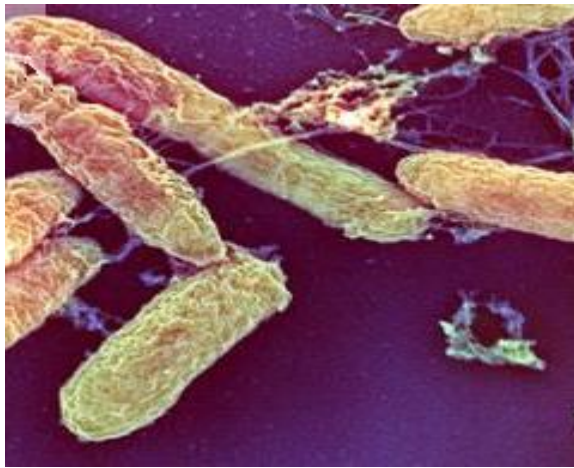


Figura 8 Yersinia pestis



Figura 9 *peste bubbonica* a sn - *peste setticemica* al centro e a dx

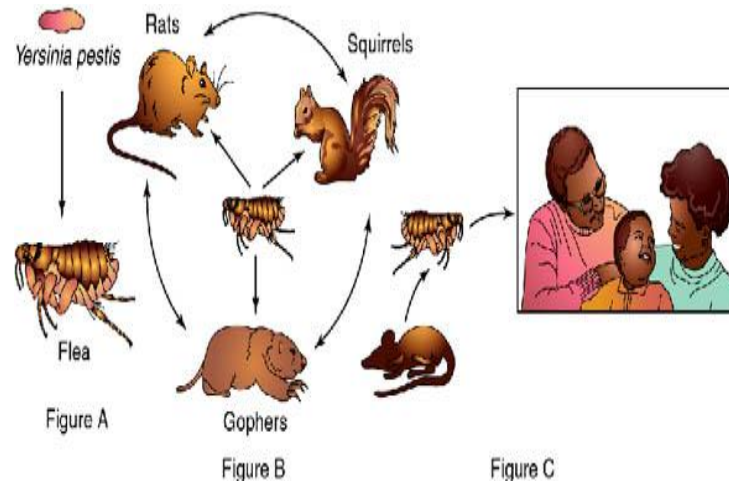


Figura 10 il ciclo di *Yersinia pestis* con serbatoio in popolazioni di roditori

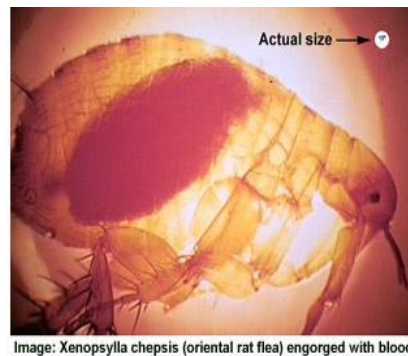


Figura 11 la pulce del ratto artropode vettore di *Yersinia*

2.6.3 BATTERIO DELLA TULAREMIA (*Francisella tularensis*)



Figura 12 effetti visibili della *Tularemia*

Francisella tularensis è un *coccobacillo* Gram negativo, *asporigeno*, *aerobio*, immobile di piccole dimensioni. Presenta un'alta resistenza nel suolo in presenza di umidità. Provoca una *malattia infettiva (Tularemia)* tipica degli animali (conigli, altri *lagomorfi* e *roditori*) che, per contatto diretto, ovvero per puntura da parte di *artropodi vettori (zecche e pulci)*, ingestione ovvero inalazione di materiale/acqua contaminati o contatto diretto con animali e loro feci (il *batterio* è in grado di attraversare la pelle e le mucose sane), può venire occasionalmente trasmessa all'uomo (*zoonosi*).

La dose infettante (inalatoria) è di 10-50 *batteri*. Il periodo di incubazione è di 3-5 giorni (fino ad un max di 21). La letalità è piuttosto bassa se il paziente viene tempestivamente trattato. I sintomi consistono in una *sindrome ulcero ghiandolare* con *lesioni cutanee, febbre, brividi, cefalea, intensa astenia, mialgie* ed *anoressia*. Nelle forme più gravi può evolvere in *ascesso retro faringeo* e *polmonite*.

La *malattia* si presenta con una grande varietà di manifestazioni cliniche legate sia alla via di introduzione che alla virulenza del ceppo. Genera *malattia* in particolari categorie come cacciatori, guardiaparco, agricoltori, pastori, veterinari e tecnici di laboratorio. Le manifestazioni cliniche sono assai variabili e dipendono dalla via di inoculazione, dalla dose e dalla virulenza: *ulceroghiandolare – ghiandolare – oculoghiandolare – orofaringea - tifo-simile – polmonare*. L'isolamento del soggetto colpito non è necessario, la contagiosità interumana non è stata mai dimostrata. In assenza di idonea terapia la può protrarsi per mesi.

In anni recenti ci sono stati focolai in Toscana (fine anni 90).

2.6.4 VIRUS DEL VAIOLO (*Variola major*)

E' un *virus* a DNA di grandi dimensioni, è patogeno soltanto per l'uomo ed altamente diffusibile.

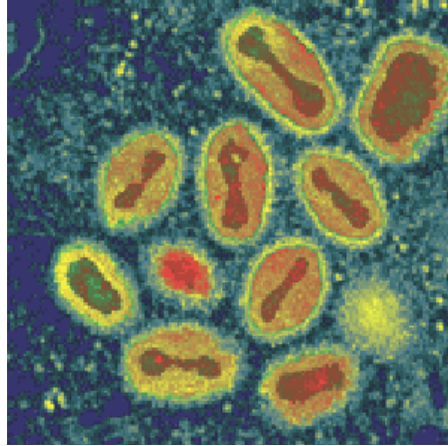


Figura 13 *Variola major*

Il contagio è diretto, interumano, mediante contatti con secrezioni respiratorie o lesioni cutanee e mucose di persone che abbiano *vaiolo* conclamato o in fase pre-eruttiva, ovvero indiretto o semidiretto attraverso il contatto con fomiti o effetti lettereschi di recente contaminazione.

Il periodo di incubazione va dai 7 ai 17 giorni, si tratta di una *malattia esantematica* e la distribuzione dell'*esantema* ha caratteristiche fisse che forniscono un preciso indizio diagnostico, la maggiore concentrazione si ha nella zona del volto, degli arti inferiori e delle braccia.

Intorno al 20° giorno di *malattia* le croste cadono lasciando un'area cicatriziale depigmentata altamente deturpante, specie nella zona del volto.



Figura 14 paziente con *rash* cutaneo tipico di *Variola major* **Figura 14bis** l'*esantema* a carico degli arti inferiori

Il periodo di contagiosità va dalla comparsa della febbre alla caduta delle croste ma la maggiore contagiosità si ha tra il 2° ed il 9° giorno.

Prima dell'eradicazione, questa *malattia*, era responsabile di altissima morbosità e mortalità, con tasso di attacco tra le popolazioni non vaccinate che raggiungeva circa il 50%.

MEZZI DI POSSIBILE DIFFUSIONE:

- disseminazione mediante velivoli, per mezzo di aerosol incolore, inodore ed invisibile;
- contaminazione di oggetti e materiali di uso comune come carta, stoffe, pellami.

Come tutti i *virus*, quello del *Vaiolo* ha problemi di resistenza in ambiente ma questi possono essere superati liofilizzandolo, conservandolo in glicerina ovvero mediante il congelamento.

Il *virus* del *vaiolo* è notevolmente stabile all'interno delle croste, dove presenta un tempo di persistenza di 3 settimane a 35°C e umidità relativa del 65%, di 8 settimane. a 26°C e di 12 settimane in ambiente molto secco (umidità relativa <10%).

L'inattivazione del *virus* si ottiene mediante riscaldamento a 55°C per 30 min. oppure con l'esposizione diretta ai raggi UV. E' necessario isolare il malato in modo stretto a causa dell'alta contagiosità.

In Italia, negli ultimi anni, non è stata più praticata la *vaccinazione antivaiolosa*. L'Italia ha 5 milioni di dosi del vaccino, come scorta, che, secondo quanto dichiara il Ministero della Salute, potrebbero arrivare fino a 25 milioni.

Oltre 350.000 militari americani sono stati vaccinati col *vaccino antivaioloso* tra il 2002 ed il 2003 ed a seguito della somministrazione, un soggetto su 20.000 ha manifestato problemi infiammatori a livello cardiaco.

2.6.5 VIRUS DELLE FEBBRI EMORRAGICHE

Le ipotesi di possibile impiego a scopo bioterroristico riguardano i *virus* delle famiglie:

- ***Filoviridae*** (*virus* delle febbri emorragiche di Ebola e Marburg);
- ***Arenaviridae*** (*virus* delle febbri emorragiche Lassa, Junin e Machupo);
- ***Bunyaviridae*** (*virus* delle febbri emorragiche Congo-Crimea);
- ***Flaviviridae*** (*virus* della Febbre gialla);
- ***Togaviridae*** (*Alphavirus* delle Encefaliti Venezuelane; equina orientale, equina occidentale).

Sono agenti responsabili di gravi malattie *virali* caratterizzate sintomatologicamente dalla presenza di *piressia* e di importanti *manifestazioni emorragiche cutanee e viscerali*. Spesso si manifestano sintomi come *cefalea*, *vomito e diarrea*. Sono tutti *virus* ad RNA.

I mezzi di possibile diffusione potrebbero essere i seguenti:

- **disseminazione per via aerea;**
- **disseminazione mediante diffusione di vettori infetti (zanzare, zecche);**
- **contaminazione di materiali ed oggetti di uso comune.**

RESISTENZA NELL'AMBIENTE / INATTIVAZIONE:

In generale si tratta di *virus* non eccessivamente resistenti in ambiente, il cui ciclo in natura viene mantenuto ad opera di *vettori* ovvero di serbatoi di infezione ancora non ben identificati, come nel caso dei *Filovirus*.

FONTI DI CONTAGIO:

Nel caso di **infezioni** ad opera di *Filovirus*, *Bunyavirus*, *Arenavirus*, il contagio interumano può avvenire mediante contatti stretti con secrezioni respiratorie ed altri fluidi biologici provenienti da persone malate.

Nel caso di infezioni da *Flavivirus* e *Togavirus*, l'infezione avviene ad opera di *vettori*, anche se non è possibile escludere il contagio interumano (eventualità comunque sempre rarissima). E' possibile invece la trasmissione semidiretta mediante materiali contaminati da fluidi biologici.

Per le persone colpite da questi *virus* sono strettamente necessarie, e vanno in ogni caso applicate, severe misure di isolamento.

Non esiste attualmente nessuna cura e nessun *vaccino*.



Figura 15 il virus Ebola

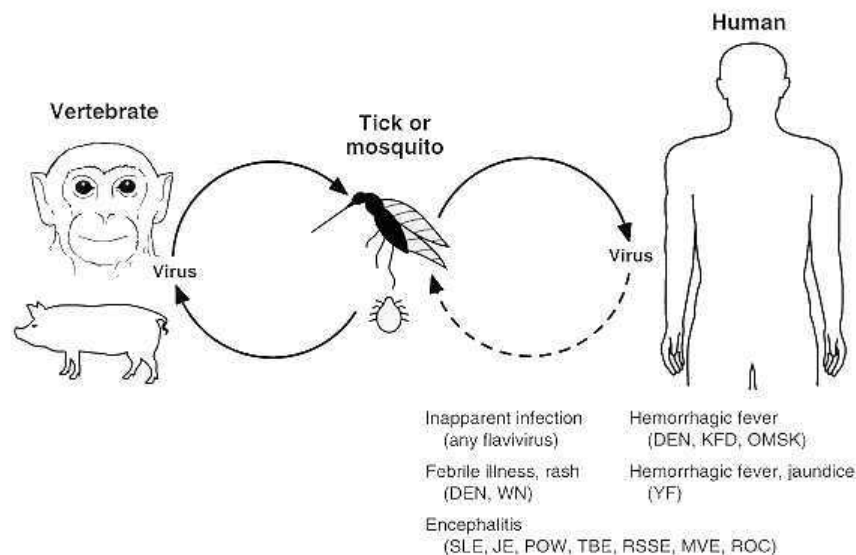


Figura 16 schema del ciclo di trasmissione di alcuni *virus* delle febbri emorragiche

2.6.6 TOSSINA BOTULINICA (*Chlostridium botulinum*)

La *Tossina botulinica* è prodotta da un *batterio*: il *Chlostridium botulinum*, Gram positivo, *anaerobio*, poco mobile, *sporigeno*.

Il nome deriva dal latino *botulus* che significa salciccia, a causa del fatto che fu associato, almeno in principio, al consumo di salsicce preparate in casa.

L'effetto tossico non è dato dal *batterio* stesso ma dalla *tossina* prodotta che è uno dei più potenti veleni esistenti al mondo. Ha natura proteica ed è quindi termolabile, viene distrutta dall'esposizione a temperature superiori a 80°C (10 min) e dalla clorazione dell'acqua (0,2 mg/l).

Esistono 7 tipi antigenici di *tossina botulinica* (A,B,C, D; E; F; G).

Questo potentissimo veleno agisce sul meccanismo di contrazione muscolare provocando paralisi flaccide (si lega alle *vescicole sinaptiche* delle *terminazioni nervose colinergiche* impedendo il rilascio dell'*acetilcolina* nel *nervo periferico*) e quindi provoca la morte per arresto respiratorio.

Agisce a bassissimo dosaggio, un grammo di *tossina* isolata sarebbe in grado di uccidere circa un milione di persone.

Ci sono 4 tipi fondamentali di *botulismo* (sindrome provocata dalla *tossina*):

- **alimentare** ingestione di cibi contaminati (conservate artigianali);
- **pediatrico** ingestione di alimenti contaminati da *spore* (bambini di età inferiore ai 6 mesi);
- **da ferita** o lesione per ferite sporche di terriccio, o con tessuto necrotico in zona contaminata ed assenza di ossigeno (zona tra crosta tessuto vivo);
- **da inalazione** evento accidentale nell'uomo, inalazione di aerosol.

Il suo utilizzo a scopo di guerra biologica o bioterrorismo presenta qualche problema riguardante soprattutto la concentrazione e la stabilizzazione.

Potrebbe essere diffusa per contaminazione di alimenti, sia come *spore* che come *tossina*, e per mezzo di aerosol.

La produzione di *spore* avviene in condizioni di assenza di ossigeno. Le *spore* possono resistere alcune ore (3-5) alla temperatura di 100°C mentre sono inattivate se sottoposte a temperature di 120-121°C per un tempo che va dai 180

secondi ai 5 minuti; in ambiente acido. La presenza di elevate concentrazioni saline/zuccherine ne diminuisce notevolmente la resistenza al calore.

I sintomi si manifestano di solito molto rapidamente, da poche ore a qualche giorno dall'ingestione della *tossina* (6 ore-15 giorni), mediamente, il periodo di comparsa dei sintomi è compreso tra le 12 e le 36 ore.

Il periodo d'incubazione è strettamente legato alla dose, un periodo d'incubazione breve corrisponde infatti ad una prognosi particolarmente grave che, in assenza di trattamento, porta ad un rapido decesso.

La sintomatologia è quella tipica della *paralisi neurale*, inizia con la *paralisi dei nervi facciali, annebbiamento e sdoppiamento della vista* ed altri *disturbi visivi, difficoltà di espressione, fatica nell'ingerire, secchezza delle fauci, disfonia, debolezza muscolare*. La paralisi passa dalla parte superiore del corpo agli arti inferiori (paralisi flaccida simmetrica discendente), con una progressione verso l'insufficienza respiratoria. Può essere necessaria la tracheostomia, l'intubazione e l'assistenza respiratoria. La rapida somministrazione di *antitossina* può prevenire e/o bloccare la progressione verso l'insufficienza respiratoria. Sono disponibili in Italia circa 300 dosi di *antitossina*.

Non esiste la possibilità di trasmissione del *batterio* da persona a persona.

L'Iraq, successivamente alla prima guerra del Golfo ha ammesso di possedere 19.000 litri di *tossina botulinica*

2.7 ALTRI AGENTI DI INTERESSE

Questi Agenti seppure non inclusi nella classe "A", sono comunque degni di particolare attenzione per la possibilità di poter essere utilizzati come armi biologiche. Esistono inoltre numerosi agenti biologici responsabili di patologie animali con potenziale interesse bioterroristico come ad esempio:

Foot and mouth disease (bovini, ovini, suini, ecc.)

Peste suina (suini);

Febbre della Rift valley;

Malattia di Newcastle (volatili);

Influenza aviaria (volatili).

E'qui d'uopo sottolineare che la classe "B" include una serie di agenti abbastanza facili da disseminare, in grado di causare moderata morbosità e bassa mortalità,

ma che richiedono comunque un aumento e perfezionamento dei sistemi diagnostici e dei livelli di sorveglianza sanitaria. In classe “C” sono inclusi agenti patogeni emergenti che potrebbero essere utilizzati a causa della disponibilità, della facilità di riproduzione/diffusione, ed aventi un alto tasso di morbosità/mortalità e dunque in grado di avere gravi ripercussioni sia sulla salute delle persone che sul funzionamento dell’intero SSN.

Passiamo ora a considerare alcuni di questi agenti.

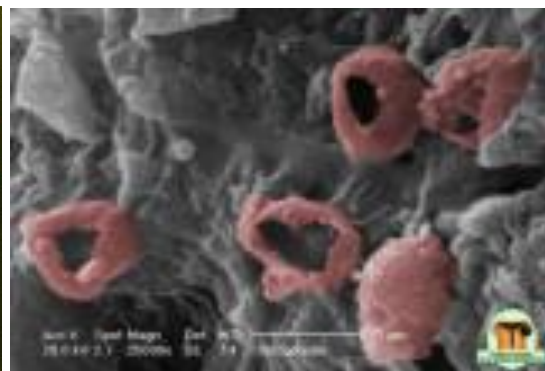
2.7.1 BRUCELLA SSPP (categoria “B”)

Il genere *Brucella* include all'incirca 6 specie, stabilite sia sulla base dell'ospite preferenziale, che delle caratteristiche antigeniche e biochimiche.

Si tratta di *batteri (cocchi)* Gram negativi a metabolismo aerobico, non mobili, parassiti intracellulari che possono infettare diverse specie animali ed anche l'uomo (*zoonosi*).



Figura 17 *Brucella* sp



**Figura 18 *Brucelle* su formaggio carbonizzato
rinvenuto in scavi archeologici**

Le specie del Genere Brucella:

***Brucella melitensis* (agente della febbre mediterranea –capre e pecore)**

Brucella abortus (bovini)

Brucella suis (suini)

Brucella canis (canidi)

Brucella ovis (ovini)

Brucella neotomae (roditori)

A queste si è aggiunta una settima: *Brucella maris* (pinnipedi e cetacei)

Brucella abortus, *Brucella melitensis* e *Brucella suis* possono infettare l'uomo con gravi conseguenze.

La trasmissione all'uomo avviene mediante l'ingestione di latte ed alimenti contaminati (latticini – formaggi) oppure con contatto diretto con secreti o tessuti di animali infetti, attraverso abrasioni e ferite, il contagio per via aerea è assai raro.

Può essere considerata una malattia professionale, colpisce infatti le persone a contatto col bestiame infetto.

Il *batterio*, una volta all'interno dell'organismo umano si replica velocemente e interessa i *linfonodi*, successivamente si dissemina in tutti gli organi dove forma dei *granulomi*.

La *Brucellosi* si manifesta con *febbri* intermittenti ed una lunga e debilitante *malattia* nell'uomo. I sintomi sono estremamente variabili, in genere **parainfluenzali**, con *febbre*, *sudorazione* elevata, *anoressia*, *cefalea*, *dolori muscolari* e *dolori alla schiena*. Nel 5% dei casi poi, possono intervenire problemi neurologici e la *malattia* ha la caratteristica di tendere alla cronicizzazione, infatti si manifesta con due forme principali: **Tipica** (acuta) e **Atipica** (cronica), nelle forme croniche può essere presente *astenia* ed *artriti* oltre a sindromi di tipo **depressivo**.

Non esiste nessuna evidenza di una possibile trasmissione interumana. La dose minima per il contagio non è nota e, ad oggi, non esiste alcun *vaccino*.

Pur non essendo state incluse dai CDC nella classe “A”, le *brucelle* potrebbero essere potenzialmente utilizzate come efficienti armi biologiche soprattutto a causa della loro estrema facilità di trasmissione, alla bassa dose infettiva necessaria, alla manifestazione clinica variabile, alla pericolosità per il personale di laboratorio, al fatto che le manifestazioni polmonari non sono ben conosciute, tutte cose che ne fanno un ottimo “incapacitante”.

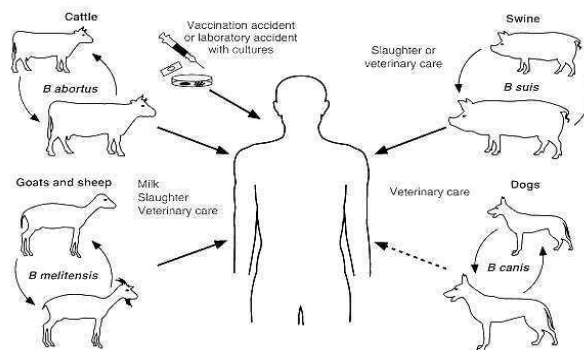


Figura 19 il ciclo delle varie specie del *genus Brucella*

2.7.2 TOSSINA RICINICA

La tossina prodotta dalla pianta *Ricinus communis*, appartenente alla famiglia delle *Euphorbiaceae*, è un veleno molto potente, si tratta di un complesso polipeptidico legato alla membrana interna del seme. La dose letale per un individuo adulto è di 8-10 semi (0.2-1 mg), quella per il bambino da 1 a 4 semi. Non esiste *antidoto*, i *sintomi* vanno dai dolori *addominali*, al vomito, alla *disidratazione*, alla *diminuzione delle urine* e della pressione. La morte, nei casi fatali, sopravviene in 3-5 giorni.

La *tossina ricinica* è un veleno cellulare, è infatti in grado di causare la morte delle cellule bloccando l'attività di sintesi proteica dei *ribosomi*.

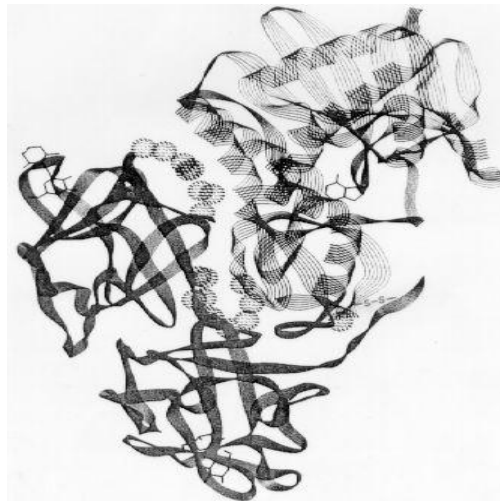


Figura 20 la tossina ricinica

2.7.3 O.G.M.(Organismi Geneticamente Modificati)

Sono organismi che hanno un patrimonio genetico parzialmente modificato mediante tecniche di ingegneria genetica che inducono mutagenesi consentendo l'aggiunta, l'eliminazione o la modifica di elementi genici. Le modifiche possono avvenire anche spontaneamente per modificazioni naturali ma in tale caso gli organismi che ne derivano non possono essere chiamati OGM.

Le modifiche che portano alla formazione degli OGM possono avvenire inducendo mutagenesi in un organismo oppure inserendo in un organismo geni provenienti da altri organismi per conferirgli particolari caratteristiche, in tale caso gli OGM che ne derivano vengono anche detti: “*organismi transgenici*”; tali tecniche possono portare, se utilizzate a scopi malevoli, alla creazione di nuovi BWA con peculiari caratteristiche di resistenza, virulenza, patogenicità. Oppure

hanno lo scopo di mascherarli per rendere molto difficile la rilevazione e quindi la pronta risposta da parte del SSN.

2.8 LE VIE DI PENETRAZIONE DEGLI AGENTI BIOLOGICI

Le **comuni vie di penetrazione** degli agenti biologici sono:

- 1- **Respiratoria** (aerosol);
- 2- **Cutanea** (vettori/contatto);
- 3- **Apparato digerente** (avvelenamento/inquinamento di cibi e bevande).

Non dobbiamo dimenticare che la diffusione a scopo di bioterrorismo o guerra biologica degli agenti in questione, può essere migliorata con l'aerosolizzazione, la formazione di “*droplets*” che includano l'agente ed altre tecniche di manipolazione meccanica (adsorbimento su polveri – microincapsulazione ecc.).

La penetrazione degli agenti aerodispersi avviene attraverso le mucose di naso e bocca e attraverso tutto il tratto del sistema respiratorio fino agli alveoli polmonari.

Le polveri e gli aerosol (*droplets* comprese) possono essere assorbiti attraverso la pelle.

I cibi e l'acqua o le bevande contaminate provocano la penetrazione degli agenti attraverso il tratto digerente. Nel 1985, oltre 170.000 persone negli USA vennero infettate da *Salmonella typhimurium*, a causa di contaminazione del latte vaccino.

E' utile sottolineare che esistono, tuttavia, anche **vie inconsuete di penetrazione** che determinano una maggiore difficoltà di diagnosi con conseguente possibilità di aumento di gravità della *malattia*, un esempio possono fornirlo i solidi micro incapsulati, veicolati attraverso terreni di coltura o liquidi conservanti.

TECNICHE DI DISSEMINAZIONE:

DIRETTA (contatto tra soggetti infetti e non infetti);

INDIRETTA (attraverso materiali contaminati);

VETTORI (insetti ed altri invertebrati).

E' denominato *Vettore* un organismo animale, generalmente un *insetto*, ma anche altro *invertebrato* o *vertebrato*, capace di trasmettere una *malattia* contagiosa o non contagiosa). Il *vettore* deve possedere la capacità di penetrare la barriera cutanea.

La persistenza dell'aggressivo dipende dal ciclo vitale del *vettore* (giorni-mesi), in quanto la difficoltà di controllo del *vettore* è commisurata alla sua capacità di sopravvivenza nei diversi ambienti. E' inoltre correlata alla disponibilità o meno di sostanze chimiche per il controllo delle infestazioni (pesticidi).

Per il controllo dei *vettori* sono necessarie misure di controllo ambientale.



Figura 21 un tipico vettore, il dittero ematofago *Aedes albopictus*

Le più comuni vie di dispersione e disseminazione sono quella per via aerea ed il contatto diretto.

METODI DI DIFFUSIONE:

Aerea/Ambientale: attraverso aerosol /ambienti.

MODALITÀ DI TRASMISSIONE**CONTATTO:**

- MEDIANTE GOCCIOLINE DROPLETS (Distanza < 1-2 m)
- VIA AEREA (PARTICELLE <5 µm)
- VEICOLO COMUNE (ACQUA, CIBO, MATERIALI)
- VETTORI ESTERNI (ZANZARA, MOSCA, ALTRI PARASSITI)

è la modalità più frequente, insieme a quella per via aerea di trasmissione di agenti patogeni

TRASMISSIONE DA CONTATTO DIRETTO:

cioè da contatto fisico diretto con il portatore dell'*infezione* (ad es. contatto fra il sangue di un paziente e la lesione dell'operatore; passaggio dei parassiti della scabbia, sviluppo lesioni erpetiche sulle dita dell'operatore che ha toccato le vescicole del paziente).

TRASMISSIONE DA CONTATTO INDIRETTO:

quando il *microrganismo* passa dalla fonte al suscettibile attraverso oggetti inanimati (strumenti, utensili, ecc.) o dalle mani di un terzo individuo. Esempi di patologie trasmesse per contatto sono le *malattie* a trasmissione oro-fecale, le *infezioni* cutanee, le febbri emorragiche, e le *malattie* da germi multi-resistenti.

TRASMISSIONE PER DROPLET:

si tratta di goccioline $>5 \mu\text{m}$ che originano dalle secrezioni respiratorie e che possono determinare il contagio. Le *droplets* vengono generate tossendo, starnutendo, parlando. La trasmissione si verifica quando goccioline contenenti *microrganismi*, si depositano sulle mucose (congiuntive, naso, bocca) di un soggetto che si trova a breve distanza dalla sorgente ($< 1 \text{ m}$, studi sperimentali su vaiolo e SARS dimostrerebbero la possibilità di trasmissione fino ad una distanza massima di 3 m). Teoricamente si tratta di una trasmissione da contatto e va distinta dalla trasmissione aerea.

Alcuni Esempi di patologie trasmesse tramite *droplet* sono: *meningite meningococcica*, *difterite*, *pertosse*, *rosolia*, *parotite*, *parvovirus B 19*, *influenza*, *H. influenzae*, *pneumococco*, *M. pneumoniae*, *peste polmonare*, *adenovirus*, *SARS*.

VEICOLI

sono cibo, acqua, strumenti chirurgici, macchinari. Per il controllo sui veicoli sono necessarie misure come la corretta conservazione degli alimenti, il controllo di potabilità delle acque, l'applicazione di norme di comportamento in ambiente sanitario.

INGESTIONE:

ambiente cibo ed acqua possono essere contaminati con aerosol, oppure con disseminazione di *tossine* o *microrganismi*, operazioni come la filtrazione, la clorazione dell'acqua oltre agli accurati controlli di potabilità e l'educazione alimentare, sono ottime pratiche preventive.

Gli agenti biologici sono classificati anche per il relativo rischio biologico:

BLS (Biosafety Level):

- **BSL 1** – agenti non patogeni o non conosciuti come tali;
- **BSL 2** – agenti associati a *malattia* umana
(trasmissione: autoinoculazione, ingestione, esposizione delle mucose);
- **BSL 3** – agenti indigeni od esotici associati a *malattia* umana (possono avere conseguenze serie o letali). Trasmissione per aerosol;.
- **BSL 4** – agenti indigeni od esotici altamente patogeni, potenzialmente fatali. Rischio: *infezioni* da laboratorio; trasmissione per aerosol.

CAPITOLO 3

IL CAMPIONAMENTO BIOLOGICO

Si intende per campionamento il prelievo di un materiale o di una parte di esso, di dimensioni sufficienti a rappresentare una realtà più ampia. Ovvero, la selezione di un piccolo gruppo di entità rappresentativo di un più vasto gruppo o insieme.

Il campionamento biologico, in particolare, consiste in una serie di operazioni pianificate e standardizzate volte alla raccolta in ambiente di campioni quanto più significativi possibile, da avviare all'analisi, al fine di determinare la presenza/assenza di eventuali organismi (patogeni) in un'area. Va considerato comunque il fatto che, qualunque sia la scelta delle modalità e delle strategie di campionamento e la precisione della strumentazione, in ogni caso il fattore umano è determinante, infatti operatori diversi determinano differenze di carattere anche quantitativo nel campionamento.

Il tipo di campioni da prelevare varia in funzione del luogo di prelievo, del metodo di disseminazione e del tipo di agente biologico.

3.1 METODICHE DI CAMPIONAMENTO

Andiamo ora ad analizzare le varie metodiche di campionamento premettendo dei cenni riguardo alle teorie che sono alla base delle diverse metodiche e che ne determinano la scelta di volta in volta da parte degli operatori.

3.1.1 CENNI DI TEORIA DEL CAMPIONAMENTO

Scopo della teoria del campionamento biologico è l'individuazione e lo studio di campioni tali da rappresentare, dal punto di vista quantitativo l'oggetto d'indagine, la scelta, quindi, di piccoli gruppi di unità che siano rappresentative di un più grande numero di unità, in ambito pratico si occupa, in particolare, dello

studio delle dimensioni del campione, ovvero dell'ottenimento di unità significative per taglia, numero, superficie, volume e peso.

In ambito teorico/pratico si occupa, in particolare, dello studio delle diverse tipologie di campionamento.

La presenza di agenti biologici e chimici (*tossine*) può essere rilevata in diversi modi attraverso:

Presenza di fumi o aerosol;

Presenza di polveri o liquidi sospetti;

Presenza di odori sospetti;

Presenza di particolari sintomi nelle persone, negli animali, nelle piante.

E' difficile individuare quale sia il campionamento ottimale e comunque, non sempre un campionamento ottimale risulta essere il più efficiente perché un elevato numero di repliche ha generalmente importanti ripercussioni sul costo totale dell'analisi.

L'obiettivo principale del campionatore è l'ottimizzazione del numero di repliche rispetto ai costi dell'analisi, Non è necessario un grande sforzo di campionamento per ottenere una buona precisione del dato.

Uno dei sistemi di ottimizzazione del campionamento è l'aumento della frequenza di prelievo nei momenti di maggior variabilità del parametro.

Andiamo ora ad analizzare brevemente il concetto di *Popolazione* in Biologia, perché è proprio in base a questo che andremo a scegliere le varie metodologie di campionamento.

Popolazione (concetto statistico): gruppo di oggetti di analisi (es. il numero di organismi patogeni presenti all'interno di un organismo).

Popolazione (concetto biologico): gruppo di individui della stessa specie all'interno di una comunità (la natura di una *popolazione* è determinata da fattori quali la densità, il rapporto tra sessi, la natalità e la mortalità, l'emigrazione e l'immigrazione), ovvero, più in generale e su più ampia scala: numero di individui di una data specie o altra categoria di organismi in una data zona (es. la *popolazione* di roditori in Italia).

3.1.2 IL CAMPIONE DI CONTROLLO “BIANCO”

Risulta utile raccogliere un *campione di controllo “bianco”* per ogni tipo di campione potenzialmente contaminato. Per le aree all'aperto bisogna prelevare i campioni di riferimento a circa 500 m dall'area di campionamento ed in zona sopravvento, naturalmente in zona non contaminata. I *campioni di riferimento* devono essere simili qualitativamente e quantitativamente a quelli raccolti successivamente in zona rossa.

Alcuni agenti biologici sono endemici in natura, la rilevazione di questi agenti non deve essere scambiata per un attacco, a questo scopo servono i *campioni di controllo*. Il campione “bianco”, deve essere etichettato, trattato e trasportato come quello prelevato in area di campionamento ma deve essere sempre perfettamente distinguibile da questo.

3.2 IL CAMPIONAMENTO NELLE DIVERSE MATRICI

3.2.1 CAMPIONAMENTO IN MATRICE AEREA/GASSOSA

L'aria è uno dei principali mezzi di dispersione e di trasmissione di patogeni e quindi di *infezioni*, in essa, infatti numerosi agenti biologici possono essere dispersi come aerosol, attraverso l'uso di nebulizzatori (apparati tipo aerosol) e/o atomizzatori ad ultrasuoni. Altri sistemi (ad es. uso di meccanismi di deflagrazione) possono distruggere l'agente biologico ma recentemente si è visto che l'uso di “micro cariche” può preservare intatto l'agente da disperdere. I sistemi di dispersione in aria usano frequentemente un gas sotto pressione (ad es. CO₂ o aria).

Al fine di evitare contaminazioni, gli operatori che effettuano il campionamento d'aria non devono usare profumi, repellenti per insetti, creme o liquidi medicali e neppure sapone particolarmente aromatizzato. Tutte queste sostanze volatili, insieme ai fumi, possono essere assorbite dai filtri durante il campionamento, mascherando la presenza degli agenti ricercati.

Per i locali chiusi è bene campionare, qualora non vi fossero altre evidenze, nei pressi delle griglie di aerazione e degli impianti di condizionamento.

Il campionamento in matrice aerea si può ancora dividere in:

Attivo

Passivo

Il Campionamento Attivo:

in genere si utilizzano degli strumenti portatili che sfruttano pompe d'aria ad alto volume, con quantità di campionamento minimo di 100 lt.

Qualcuno di questi strumenti usa filtri di carta ed altri usano acqua o liquidi per catturare i *microrganismi*.

Vi sono degli strumenti chiamati *collettori inerziali* o “*impactors*”, che sfruttano l'inerzia delle particelle trascinate da una corrente gassosa, raccogliendole su di una superficie o all'interno di un liquido. Gli *impactors* possono essere muniti di filtri di vario tipo per separare fisicamente le particelle dal flusso gassoso.

Esistono diversi tipi di *impactors*: ***rotanti, centrifughi, ad aspirazione, gorgogliatori.***

Il vantaggio dell'impiego dei *gorgogliatori* risiede fondamentalmente nel liquido di raccolta, che, oltre a proteggere i *microrganismi* dalla disidratazione, rende possibile la diluizione del campione prima che venga avviato alle indagini successive.

I Nuclei NBCR dei Comandi Vigili del Fuoco di Venezia e Roma utilizzano un campionatore a concentrazione su matrice liquida (*gorgogliatore*), più avanti meglio descritto.

Campionamento Passivo:

Nel campionamento passivo le particelle si depositano per solo effetto della gravità (*capsule di Petri* con terreni di coltura – filtri ecc.). Ha grande importanza nell'ottimizzazione di questo tipo di campionamento la conoscenza delle dimensioni delle particelle aerodisperse, oltre alla conoscenza della ventilazione/correnti aeree. Questo tipo di campionamento non dà risultati eccessivamente significativi, dando spesso luogo ad errori qualitativi/quantitativi e non fornisce alcuna informazione sull'effettivo volume d'aria campionato, inoltre si rischia di sovrastimare la presenza di organismi o sostanze associate a particelle di maggiori dimensioni o peso. La quantità minima da campionare si aggira sui 100 ml e le dimensioni delle particelle campionabili vanno da 1 a 5 μm

. Le dimensioni ed il tipo di materiale di cui sono costituite le particelle, influiscono infatti sulla velocità di ricaduta al suolo e sulla persistenza in aria per cui, tale metodica risulta utile solo se si presume una contaminazione residua ed a seguito di un riscontro positivo riguardo alla presenza dell'agente.



Figura 22 da dx a sn campionatore su filtro - filtro - capsula di Petri

Potential Airborne Biological Weapons								
Airborne Microbe or Toxin	Type	Disease or Infection	Logmean Diameter μm	UVGI k $\text{cm}^2/\mu\text{W}\cdot\text{s}$	UVGI Ref.	LD50	Incub. Period Days	Average Lethality %
Bacillus anthrax spores	Bacteria	Anthrax	1.118	0.000031	(8)	28,000	2-3	90
Brucella	Bacteria	Brucellosis	0.566	-	-	1300	-	-
Chlamydia pneumoniae	Bacteria	-	0.548	-	-	-	7	-
Clostridium perfringens	Bacteria	Toxicosis	5.000	0.00017	(2)	-	1	-
Corynebacterium diphtheria	Bacteria	Diphtheria	0.698	0.000701	(20)	-	1-2	-
Coxiella burnetii	Bacteria	Q fever	0.283	0.001535	-	1	10-21	1
Francisella tularensis	Bacteria	Tularemia	0.200	-	-	25	1-10	50
Klebsiella pneumoniae	Bacteria	-	0.671	-	-	-	-	-
Legionella spp.	Bacteria	-	0.520	0.00182	(3)	-	2-3	-
Mycobacterium tuberculosis	Bacteria	TB	0.637	0.002132	(5)	-	28	-
Neisseria meningitidis	Bacteria	-	0.775	-	-	-	2-3	-
Pseudomonas mallei	Bacteria	Glanders	0.674	0.000278	(21)	-	-	-
Pseudomonas pseudomallei	Bacteria	-	0.494	0.000278	(21)	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	Bacteria	-	0.707	0.00182	(17)	-	1-5	-
Yersinia pestis	Bacteria	Pneumonic plague	0.707	-	-	3,000	2	-
Coccidioides immitis	Fungi	Coccidioidomycosis	3.464	-	-	1350	28	-
Histoplasma capsulatum	Fungi	Histoplasmosis	2.236	-	-	-	-	-
Stachybotrys atra (charmarum)	Fungi	-	5.623	-	-	-	-	-
Camelpox (GE)	Virus	-	0.223	0.00153	(8)	-	-	-
Crimean hemorrhagic fever	Virus	Hemorrhagic fever	0.120	-	-	-	3-6	26.5
Ebola (GE)	Virus	Hemorrhagic fever	0.039	-	-	-	2-21	72.5
Hantaan virus	Virus	-	0.095	-	-	-	14-21	15.5
Influenza	Virus	Influenza	0.098	0.00119	(12)	-	2-3	-
Junin	Virus	Hemorrhagic fever	0.120	-	-	-	2-6	17.5
Lassa	Virus	Lassa fever	0.122	-	-	-	2-6	3
Marburg	Virus	Hemorrhagic fever	0.039	-	-	-	7	35
Varola	Virus	Smallpox	0.224	0.00153	(8)	-	7-16	20
EEE (VEE, WEE)	Virus	Encephalitis	0.050	-	-	25	5-15	50
Rickettsiae (various)	-	-	0.390	0.000292	(1)	-	-	-
Aflatoxin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	300K n/k	NA	NA
Botulinum	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	0.12 μg	NA	NA
Ricin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	0.1 μg	NA	NA
Trichothecene mycotoxins	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	NA	NA	NA
Abrin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	40 n/k	NA	NA
Staphylococcus aureus	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	50 n/k	NA	NA
Staphylococcal enterotoxin B	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	NA	NA	NA
Batrachotoxin A	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	100 n/k	NA	NA
Diphtheria toxin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	100 n/k	NA	NA
Palytoxin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	150 n/mg	NA	NA
Saxitoxin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	200 n/mg	NA	NA
T2 mycotoxin	Toxin	Toxicosis	2.240	NA	-	NA	NA	NA

NOTES: GE = Genetically enhanced or genetically engineered n/k = ng/kg
 Toxins not listed have lower toxicity than those identified above.
 S. pyogenes UVGI rate constant used for S. pneumoniae
 Pseudomonas aeruginosa UVGI rate constant used for Pseudomonas (aka Burkholderia)
 Variola UVGI rate constant used for Camelpox
 References: See References for general BW references and numbered UVGI References.

Tabella 5 BWA a possibile trasmissione aerea

3.2.2 CAMPIONAMENTO IN MATRICE LIQUIDA

Per i campioni liquidi la quantità minima da prelevare va da: 10-100 ml. Se alla superficie del liquido da campionare si nota la presenza di un film oleoso o di materiale organico, è opportuno campionare questo (i *microrganismi* tendono a trovarsi in superficie a causa della tensione superficiale), ma se non è presente è meglio campionare verso il fondo del recipiente-bacino-raccolta, in quanto è in questa sede che tende a concentrarsi maggiormente un eventuale contaminante.

L'utilizzo di agenti patogeni per la contaminazione di acque ad uso potabile è un'eventualità da considerare, tuttavia i sistemi di potabilizzazione e depurazione fisici (osmosi inversa, UV, ecc.) e/o chimici (clorazione), garantiscono oggi, in larga misura, la sicurezza della salute pubblica, scongiurando tale pericolo.

Per il campionamento di acqua e liquidi sospetti possono essere utilemente utilizzati dispositivi come *pipette* – *siringhe* – *pipettatrici* – *micropipettatrici*, *pompe* - *bottiglie* - *becker*.



Figura 23 uso della *pipettatrice automatica* per il campionamento di liquidi

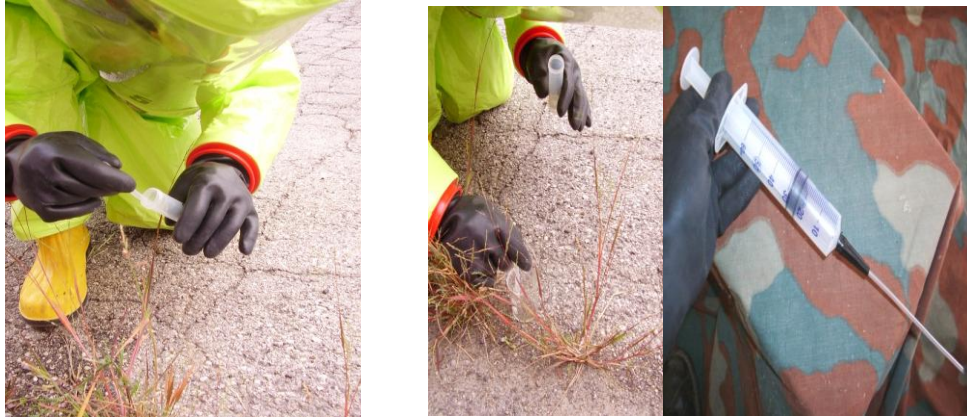


Figura 24 campionamento di liquidi sospetti mediante *pipetta* e *tubo graduato* - a dx *siringa*



Figura 25 provette in vetro e plastica e tubi "Falcon"

Stagni, ruscelli, serbatoi, pozze d'acqua, contenitori o manufatti riempiti da liquido, sono tutte fonti per il campionamento ambientale in matrice liquida. Per i liquidi rinvenuti in contenitori la quantità minima da prelevare è di 10 ml, per il prelievo ambientale la quantità minima è di 100 ml. Temperature di stoccaggio/trasporto 2°- 8°C.

Le *siringhe* per raccolta di acqua e liquidi devono avere capacità di 50-60 ml, in alcuni casi è utile togliere l'ago ed inserire un *filtro per siringhe* per ottenere un campionamento ottimale e può essere aggiunto un tubetto di prolunga così come un manico estendibile per effettuare prelievi in raccolte d'acqua poco accessibili, come spesso accade per bacini lacustri e fiumi. In questi ultimi casi usare necessariamente contenitore da 100 ml. ed una *pompa manuale* oppure forcipi con un piccolo *becker* di vetro.

Tutti i campioni d'acqua devono essere refrigerati per il trasporto e mantenuti ad una temperatura tra 1 e 4°C.

3.2.3 CAMPIONAMENTO IN MATRICE SOLIDA



Figura 26 strumenti per il campionamento di terra, sabbia, ghiaia ed altri materiali solidi

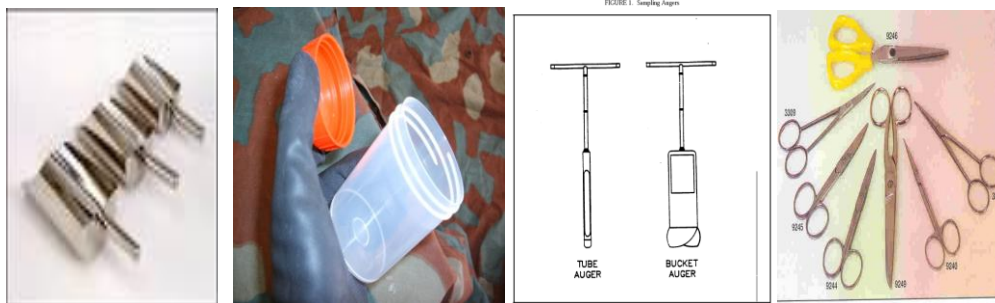


Figura 27 attrezzature per il campionamento di materiali solidi di diversa natura

La raccolta di Polveri:

Dal punto di vista statistico è una delle procedure più ricorrenti nel corso degli interventi biologici.

Si effettua mediante l'ausilio di *spugne* e *swabs* (*handswabs*) o anche mediante *nastri adesivi* o *pennelli*. Per alcune *spugne* da campionamento, all'interno della confezione c'è una provetta con il liquido per inumidirle e facilitare l'operazione di raccolta e/o per conservare il campione (alcuni liquidi di conservazione del campione contenuti nei kit per il campionamento potrebbero però contenere sostanze in grado di interferire con le analisi immunologiche o mediante PCR).



Figura 28 la raccolta di polveri mediante *spugnette*

La *spugnetta* serve per raccogliere polvere/particolato da superfici più ampie.

Il campionamento delle polveri su superfici inerti, all'interno ed all'esterno di edifici, viene effettuato con *spugnette*, *tamponi sterili* o *nastri adesivi*.

In alcuni *nastri speciali* utilizzati per il campionamento delle polveri il campione di polvere aderisce alla superficie adesiva e/o del gel, tale superficie viene successivamente coperta con un foglio di poliestere per il trasporto in laboratorio.



Figura 29 il prelievo delle polveri con *nastro adesivo*

IL PRELIEVO DI POLVERI CON LO SWAB

Gli *swabs* o *handswabs* sono bastoncini di plastica o legno con una estremità ricoperta di cotone o altre fibre.

L'*handswab* raccoglie egregiamente le polveri ed i campioni umidi “wet” su tutte le superfici, si tratta di uno strumento di raccolta da utilizzare a secco ovvero bagnato, imbevuto con acqua distillata o soluzioni fisiologiche.

Il campione di polveri, una volta raccolto va raffreddato e mantenuto ad una temperatura piuttosto bassa al fine di evitare la crescita di *microrganismi*.

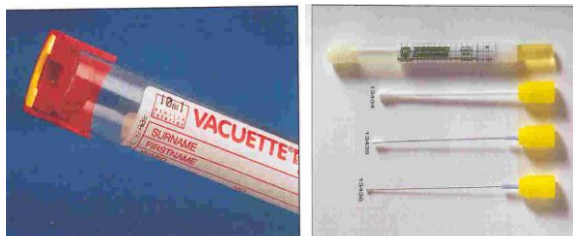


Figura 30 provetta con all'interno l'*handswab*

In emergenza, in carenza di dispositivi idonei, può essere utilizzato un normale “cotton fioc”. Alcuni swabs sono confezionati a secco, uno per uno, in tal caso va rimosso l’involucro prima dell’uso, va intinta, se ritenuto necessario (è sempre buona norma in caso di polveri secche), la punta in un liquido (acqua distillata *dnase-free*) e si procede quindi al prelievo del campione, passando la punta come si vede in figura 34. Altri swabs sono forniti già all’interno di provette con tappo a vite, in alcune di queste potrebbe essere già presente del liquido ovvero della sostanza gelatinosa che hanno il ruolo di fungere da veri e propri terreni di coltura per permettere la sopravvivenza ed impedire la disidratazione di eventuali organismi presenti nel nostro campione.

Una volta effettuato il prelievo delle polveri mediante lo swab, questo si inserisce in una *provetta* che può essere di vetro, oppure in materiale plastico, si chiude quindi ermeticamente il tappo della *provetta* (i tappi migliori sono quelli a vite) e si segnano con pennarello indelebile *water-proof*, il numero del campione e quanti più dati (data, ora, luogo, punto), relativi al luogo del prelievo, direttamente sulla *provetta* ovvero su etichetta autoadesiva, il compilatore avrà modo, nel frattempo, di segnare tali dati per esteso sul foglio di campionamento “*data sheet*”.

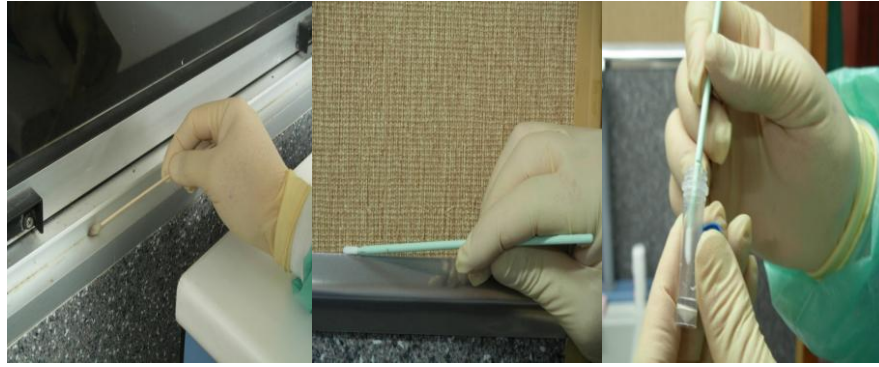


Figura 31 fasi del campionamento di polveri mediante *handswab*

Alcuni tipi di *swabs*, hanno addirittura una tacca a vari livelli del bastoncino, ma generalmente in posizione distale, al fine di poter essere spezzati con facilità agendo contro le pareti della *provetta*.



Figura 32 una pagina del manuale operativo di campionamento del Nucleo di Venezia

La quantità minima di campioni solidi di natura inorganica e di campioni ambientali (pietre, terreno, rocce, sabbia, fango, vegetali, alimenti, tessuti) che possono essere raccolti adoperando *forbici*, *pinzette*, *sessole*, *spatole*, *cucchiai* *forcipi* e *bisturi* va dai 200 ai 300 ml.

3.2.4 CAMPIONAMENTO IN MATRICI PARTICOLARI

Filtri degli impianti di ventilazione e condizionamento aria

L'operazione va effettuata con *guanti* idonei, protezione delle vie aeree e, a impianto acceso o grandi filtri, protezione delle congiuntive.

Il campione deve essere confinato immediatamente e sul posto.

Nel fascicolo “Allegati” del presente lavoro c’è l’esempio di uno schema di campionamento mediante filtri posizionati sulle U.T.A. (unità di trattamento aria) dei siti indoor (palazzetti del ghiaccio), effettuato durante le Olimpiadi Invernali di Torino nel 2006.

Campioni biomedici da incidenti umani

Il campionamento di materiali organici provenienti da soggetti umani può essere effettuato soltanto da personale medico o sanitario addestrato, salvo specifica delega ai *first responders*.

Il prelievo deve essere fatto mediante *bisturi* e *forbici*, nei punti in cui appaiano manifestazioni patologiche esterne (escoriazioni, cicatrici recenti, bubboni), utile, ma non sempre possibile, sarebbe il prelievo di materiali tissutali da particolari organi interni (fegato, milza, polmoni e cervello).

Per le mucose si effettuano campioni tampone sia per quella orale che per le cavità nasali oltre che per le congiuntive degli occhi;

Il sangue deve essere prelevato mediante *siringhe* e messo in 5 differenti contenitori in quantità pari a 10 ml per ogni *provetta*. Va poi mantenuto freddo ma senza congelarlo. Per quanto riguarda il sangue già fuoriuscito dal corpo, può essere prelevato con un *tampone* di garza o cotone e quindi lasciato asciugare all’aria a temperatura ambiente (mai al sole), va quindi refrigerato o congelato ed in tal modo può essere utilizzato anche per analisi di tipo forense.

I campioni ematici vanno comunque portati al laboratorio di riferimento il più possibile rapidamente, un ritardo di 48 ore può impedire l’effettuazione delle analisi.

L’urina va campionata dopo un periodo di tempo (tra le 24-48 ore) in quantità di 100-200 ml utilizzando contenitori sterili di vetro;

Per quanto riguarda la pelle, è bene prelevare quella di colore insolito o con manifestazioni cutanee evidenti o dove si sappia o sia chiaro che sia stata contaminata; è necessario prelevare sempre piccoli quantitativi di pelle umana ed immagazzinarli nel ghiaccio.

I campioni biomedici umani come saliva, vomito, escrementi sono solitamente di poco valore dal punto di vista diagnostico e vanno prelevati soltanto se ci sono precise ragioni per farlo.

L'esame e la sezione di persone decedute andrebbe, a meno di specifiche deleghe, sempre effettuato da personale medico specializzato che successivamente predisporrà un rapporto di autopsia, bisognerebbe inoltre fotografare il viso della persona deceduta per assicurare l'identificazione.

Se il corpo è decomposto, andrebbero prelevate le piccole ossa, campioni di cervello possono essere fatti soprattutto se questo si trova esposto. Il campione diagnostico umano deve essere immagazzinato per il trasporto e la conservazione a 2-8 °C (non congelato).

La scelta dei campioni umani di controllo è piuttosto complicata rispetto a quella per i campioni ambientali. In questi casi è fondamentale tener conto delle differenze razziali, di dieta e socio culturali, che potrebbero provocare notevoli deviazioni dei risultati analitici.

3.2.5 STRUMENTAZIONE - EQUIPAGGIAMENTO

La strumentazione per il campionamento comprende tutti quegli strumenti, utensili e dispositivi, utilizzabili per la raccolta dei campioni di diversa natura e nelle varie matrici.

Un elenco completo sarebbe impossibile, anche perché qualsiasi utensile o dispositivo potrebbe essere utilmente impiegato a seconda dei casi.

Di seguito, comunque, si dà indicazione di alcuni dispositivi di fondamentale importanza utilizzati dal Comando di Venezia.

Prima e dopo il campionamento, l'equipaggiamento va sterilizzato e immagazzinato in borse sterili. I campioni devono essere prelevati utilizzando *forcipi, spatole, pinzette, pipette, sessole* ed altri strumenti di campionamento possibilmente sterili. Tali strumenti dovranno essere quanto più possibile monouso o in quantità tale da poter essere utilizzati ciascuno per raccogliere un singolo campione.

Bisogna sempre avere a disposizione, in quantità elevata, *etichette di pericolo biologico*.

Andiamo dunque a fare un elenco, seppure non completo, di materiali utili al campionamento:

Cassetta da campionamento

La *cassetta da campionamento* serve per il trasporto delle attrezzature in zona operativa. Deve essere in materiale metallico o plastico ma comunque decontaminabile (Il Comando di Venezia ne ha una in alluminio in dotazione anche all'Esercito Italiano).

Possibilmente dovrebbe avere una cinghia per il trasporto ovvero essere spalleggiabile. All'esterno deve riportare la *segnaletica di "pericolo biologico"*.

Telo da campionamento (Drop Sheet)

Il *telo da campionamento*, da stendere in zona contaminata, serve per disporvi la strumentazione.

Deve essere in materiale impermeabile, completamente decontaminabile e, se si usa per aree esterne, possibilmente mimetico.



Figura 33 telo da campionamento biologico

Contenitore rigido per il trasporto dei campioni

Si tratta di un contenitore refrigerante per campioni biologici, il requisito fondamentale è che deve refrigerare ma non congelare, utilizza ghiaccio secco o piastre congelate, deve avere chiusura ermetica ed essere costruito in materiale isolante termico. Su tutti i contenitori, anche quelli per il trasporto della strumentazione e degli strumenti deve essere posizionato l'adesivo col *simbolo di pericolo biologico*, il *contenitore* viaggia sempre accompagnato da un *foglio di ricevuta*, firmato da coloro che la prendono in consegna durante il trasporto, tale foglio costituisce documento legale.



Figura 34 etichetta con logo di pericolo biologico/sostanza infetta2

Di seguito si riporta un modello utilizzato dal Comando di Venezia per il controllo del caricamento attrezzature da campionamento biologico sul mezzo di intervento “*ambientale*”, da tale modello, anche se affatto completo, si può facilmente desumere la grande varietà degli strumenti necessari ad un ottimale campionamento di materiali biologici.

	ATTREZZATURA DA CAMPIONAMENTO	QUANTITA'	CONDIZIONI	rotto
	DESCRIZIONE OGGETTO	TOTALE	MANCA	scaduto
1	<i>etichette autoadesive</i>			
2	<i>pennarello blu/nero water-resist</i>			
3	<i>sacchetti per campionamento biologico</i>			
4	<i>pinzette monouso in materiale plastico in confezione sterile</i>			
5	<i>pinzette monouso in acciaio 30 cm</i>			
6	<i>acqua bidistillata</i>			
7	<i>tubi cilindrici in materiale plastico autoclavabile tipo “Falcon” da 15 ml</i>			
8	<i>provette in materiale plastico con swab di legno</i>			
9	<i>swabs di materiale plastico con tacca di rottura e provette con pellet per campionamento</i>			
10	<i>siringhe da 50 - 20 – 10 ml</i>			
11	<i>pipette monouso in materiale plastico</i>			

12	guanti "powder free"			
13	flaconi da campionamento cilindrici monouso con tappo a vite			
14	provette cilindriche tipo "Eppendorf" da 2,5 ml			
15	cucchiari in materiale plastico monouso			
16	sessola in materiale plastico			
17	penna biro			
18	matita			
19	blocco di carta per appunti			
20	schede campionamento bio			
21	forbici chirurgiche in acciaio			
22	forcipe in acciaio			
23	bisturi			
24	cutter			
25	Scatoline in plastica trasparente			
26	spugnette da campionamento			
27	pennelli			
28	metro rigido			
29	schede di notifica stato morbosio			

Tabella 6 attrezzatura per il campionamento biologico

Le bottiglie ed i barattoli da campionamento di plastica e vetro, devono avere le seguenti caratteristiche: devono essere ermetici, a collo largo, tappo avvitabile, superficie scrivibile, sterili.

Sealing strips

Il sealing strip (parafilm) è utile a sigillare una serie di contenitori.

Buste a chiusura ermetica

Devono essere a tenuta e chiusura ermetica con superficie scrivibile, di varie dimensioni ed infine autoclavabili. Le nostre squadre ne hanno di 2 dimensioni, per utilizzarle come contenitore secondario e terziario. Servono anche

sacchetti e *sacchi* di diverse dimensioni, per raccogliere il materiale da smaltire ed i DPI da conservare, confinati in attesa degli esiti analitici.

Sono necessari anche *sacchi* e *bidoni* per il trasporto di materiali da campionamento e DPI contaminati.

Spruzzetta – aspersore

Serve per le operazioni di *decontaminazione* del campione e dei DPI, al suo interno è contenuto ipoclorito di sodio al 5 - 10%. Per le operazioni di pulizia del laboratorio vengono usate *spruzzette* con all'interno *alcol etilico*.

La squadra di campionamento dovrà inoltre avere:
registratore, fotocamera, GPS, mappe dell'area interessata (o in alternativa *griglie prestampate*), *elastici, fascette* per sigillare, *nastro adesivo, carta assorbente*.

E' necessario effettuare un check up periodico delle attrezzature anche mediante apposita scheda ed un controllo periodico dei materiali caricati sui mezzi di soccorso specialistici.

Il Campionatore in matrice aerea “Biocapture”

CARATTERISTICHE TECNICHE:

Misura delle particelle raccolte: 0.5 – 10 micron;

Velocità e volume di campionamento: 200 lt/min;

Dimensione del campione: 2-5 ml;

Tempi di campionamento: 5-15-30 min (fino ad 1 h max).

Il *Biocapture* raccoglie le polveri disperse in aria all'interno di una serpentina in materiale plastico contenuta nella cartuccia monouso e, previo lavaggio del circuito, le concentra in una provetta contenente acqua sterile.

Funziona con batteria ricaricabile, è decontaminabile ed è munito di contenitore decontaminabile per l'utilizzo in “*zona rossa*”.



Campionatore d'aria

S. Minghetti

Figura 35 caratteristiche del campionatore *Biocapture*

Considerate le sue caratteristiche, e nonostante i costi piuttosto elevati delle cartucce di ricambio, il campionamento con il *Biocapture* si potrebbe consigliare in ambienti chiusi, non eccessivamente ampi, quali stanze adibite ad uffici e locali ad uso civile o militare. Un ulteriore vantaggio consiste nel fatto che sebbene i filtri degli altri campionatori abbiano un costo di gran lunga più accessibile, il *Biocapture* produce un campione liquido e quindi immediatamente utilizzabile per l'analisi con rt-pcr (strumentazione *Rapid* del Lab. Biologico VVF di Venezia), mentre invece i filtri, di qualsiasi tipo, vanno trattati per l'estrazione del campione.

L'utilizzo all'interno dei locali per i filtri delle unità di trattamento aria di edifici pubblici e/o privati può essere utile ma bisogna ricordare di fermare,

durante le operazioni, il flusso d'aria degli impianti stessi, che interferisce sul funzionamento del dispositivo addirittura bloccandolo, come è stato possibile sperimentare nel corso di numerosi interventi da noi svolti.

3.3 TRATTAMENTO E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Tutti i campioni devono essere imballati e trasportati insieme ed utilizzando lo stesso sistema. Ogni campione deve essere identificabile da etichetta riportante: sigla GDT del prelievo e nome del campionatore per il buon esito dell'analisi.

La raccolta di campioni significativi e di buona qualità, oltreché corredati da complete informazioni, è fondamentale per l'esito delle analisi.

Le operazioni di prelievo devono essere rapide ed il trasporto verso il laboratorio di analisi deve essere effettuato nel minor tempo possibile.

3.3.1. I DATI DEL CAMPIONE

L'etichettatura (*labelling*):

l'annotazione dei dati del campione è una delle operazioni più delicate ed importanti.

Sui contenitori che contengono il campione devono sempre essere apposte sigle codificate ed indicazioni per esteso che ne rivelino con estrema precisione la provenienza, il nome del campionatore e tutti i dati fondamentali atti a ricostruire, con precisione, il luogo ed il momento del campionamento, tutto ciò per non ricadere nel temutissimo, in ambito scientifico, “*mislabelling*”, ovvero la mancanza di etichettatura che rende vani gli sforzi del campionamento e pressoché inutilizzabile il campione.

Ogni campione deve essere identificabile da una etichetta riportante la sigla GDT del prelievo.

Il campione deve essere, in ogni caso, accompagnato da un *foglio informativo* “*Data Sheet*” o foglio notizie, che deve riportare la sigla identificativa, il suo stato fisico, le sue caratteristiche e dimensioni, il suo quantitativo, le coordinate topografiche del punto di rinvenimento, il GDT del

prelievo, la procedura impiegata ed i dati meteorologici oltre naturalmente al nome del campionatore. Un possibile esempio di *data sheet* (quello del Nucleo NBCR del Comando di Venezia) è fornito all'interno del fascicolo “Allegati” accluso al presente lavoro.

3.3.2. CONFEZIONAMENTO PER IL TRASPORTO E SPEDIZIONE DEI CAMPIONI

I campioni, sia ambientali che biologici diagnostici, devono essere confezionati per la spedizione in accordo con le norme vigenti in materia di trasporto di



Figura 36 i campioni all'interno dei contenitori (sacchetti) trasparenti

materiale infetto, secondo il metodo dei tre involucri (I.A.T.A. regulation), e come prescritto nella Circolare del Ministero della Salute n° 3 del 08/05/2003:

- 1) contenitore o recipiente primario** (*flaconi – provette*) che contiene il campione, consistente in materiale potenzialmente infetto (resistente – impermeabile – a tenuta stagna – a chiusura ermetica – etichettato (etichetta impermeabile) – possibilmente trasparente – va avvolto in materiale assorbente a struttura continua come *cotone idrofilo* o *carta bibula*).

E' buona norma sigillare il *contenitore primario* con il *parafilm* (specialmente per quanto riguarda campioni liquidi) al fine di evitare la fuoriuscita accidentale del campione, potenzialmente infetto.

Il materiale assorbente deve essere in quantità tale da poter assorbire tutto il liquido eventualmente fuoriuscito dal campione in caso di rottura del recipiente.

- 2) **Il contenitore o recipiente secondario**, atto ad accogliere il *flacone* dovrà essere impermeabile e a tenuta stagna, di materiale resistente.

Il *contenitore secondario* può contenere anche diversi *contenitori primari* al suo interno ma devono essere avvolti uno per uno nella carta o nel materiale assorbente. All'esterno del *contenitore secondario* devono essere collocate o applicate le *schede dei campioni* oltre a tutti i dati riguardanti il destinatario ed il mittente.

- 3) L'involucro esterno (**contenitore e recipiente terziario**), contenente il *contenitore secondario* dovrà essere atto al trasporto ed in grado di proteggere il materiale da ogni eventuale sollecitamento meccanico o danneggiamento, deve essere di cartone, plastica, legno o altri materiali comunque resistenti alle azioni meccaniche ed alle intemperie. dovrà contenere inoltre i dati identificativi del campione.

Le etichette di attenzione dovranno poi avvisare del pericolo biologico.

Ogni contenitore va comunque etichettato dopo l'inserimento del campione e corredato di tutte le informazioni possibili riguardanti il campione stesso.

Tutti e tre i contenitori vanno debitamente decontaminati esternamente.



Figura 33 i 3 involucri per il trasporto dei campioni

3.3.3.CONTROLLO CAMPIONE

Il campione, o i campioni vanno ripetutamente controllati sia in fase di raccolta che di trasporto e successivamente, durante le fasi di aliquota e sterilizzazione.

Ora esaminiamo chi deve raccogliere cosa:

First Responders:

raccogliono principalmente campioni ambientali (aria, piante, suolo e liquidi) e campioni particolari (armi, D.P.I., congegni), bisogna sottolineare che molto spesso sono i primi e gli unici campionatori presenti sul luogo dell'evento, per cui di sovente, sono autorizzati con delega a raccogliere anche campioni medici o veterinari.

Personale medico:

raccoglie, a scopo preventivo, campioni di liquidi sospetti, oltre naturalmente ad effettuare campionamento medico/diagnostico su persone e cadaveri.

Personale medico veterinario:

raccoglie campioni di cibi e bevande e, naturalmente, effettua campionamento su animali vivi o morti.

Catena di Custodia del campione:

deve essere sempre mantenuta una stretta catena di custodia per ogni singolo campione che comprenda una registrazione accurata dei passaggi di mano tra operatori e responsabili della custodia. Il *documento di custodia* con tutti i passaggi deve sempre seguire il campione.

CAPITOLO 4

L'ATTIVITA' DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI DEI VIGILI DEL FUOCO

In questo capitolo andiamo a considerare l'attività dei Vigili del Fuoco in ambito CBRNe. La sigla CBRN, sta per Chimico Biologico Radiologico e Nucleare ed è riferita sia al rischio derivante dall'uso di armi, “non convenzionali” contenenti o consistenti in agenti chimici, biologici, radiologici e nucleari, sia ad incidenti/catastrofi che coinvolgono uno o molti di tali agenti, il loro uso in attività civili o industriali comporta inoltre che siano fatti attualmente oggetto di un maggiore livello di attenzione da parte di governi, enti ed associazioni, oltre che di attento monitoraggio anche sul piano internazionale. Alcuni di questi agenti sono diffusibili per mezzo di ordigni esplosivi di vario genere, motivo questo che ha recentemente fatto aggiungere una “e” (per esplosivo) all'acronimo CBRN, che risulta per tale ragione modificato in CBRNe.

Nel caso di un evento, dovrebbe essere ben chiaro che la formazione del personale è la sola chiave, sia per la risoluzione del problema che per la salvezza degli operatori coinvolti, sia su base individuale che come gruppo. Spesso è assai utile una preparazione con addestramento anche mediante simulazioni del tipo “*Table Top Exercises*” che indica oltre lo stato di preparazione del personale anche la capacità di azione/reazione e formazione della squadra.

Le operazioni di decontaminazione sono particolarmente critiche durante la fase di risposta, per neutralizzare o rimuovere gli agenti di qualsiasi natura e trattare immediatamente le eventuali vittime, oppure in fasi successive in cui la priorità diventa, ad esempio, il ricovero dei colpiti.

Il Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco, per affrontare le emergenze e gli incidenti coinvolgenti sostanze pericolose, si è dotato in questi ultimi anni di una particolare organizzazione che, prevedendo competenze diverse fra i vari operatori, dalle squadre base ai nuclei specialistici, ha comportato l'adozione di:

- nuovi percorsi formativi – addestrativi;
- nuove attrezzature ed automezzi;

- nuove procedure operative e piani d'emergenza.

Possiamo suddividere le attività operative in due fasi principali:

Fase 1: Prelievo e trattamento dei campioni;

Fase 2: Identificazione degli agenti biologici nei campioni prelevati;



Figura 38 il manuale di campionamento biologico del Nucleo di Venezia

Schema di Flusso Intervento Biologico

Campionamento;

Trasporto dei Campioni

Sterilizzazione

Manipolazione dei Campioni

Avvio dei Campioni all'Analisi

La protezione degli operatori

Per la protezione degli operatori vengono utilizzati i D.P.I. (*dispositivi di protezione individuale*). Esistono anche dispositivi e procedure che proteggono più persone e si chiamano:

Dispositivi di protezione collettiva

Procedure operative;

Profilassi.

Va considerata poi una protezione livello ambientale, di cui di seguito si forniscono alcuni esempi.

La Protezione dell'ambiente

Filtrazione aria in uscita;

Scarichi controllati;

Confinamento interno dei materiali;

Disinfezione e bonifica di quanto esce (decontaminazione);

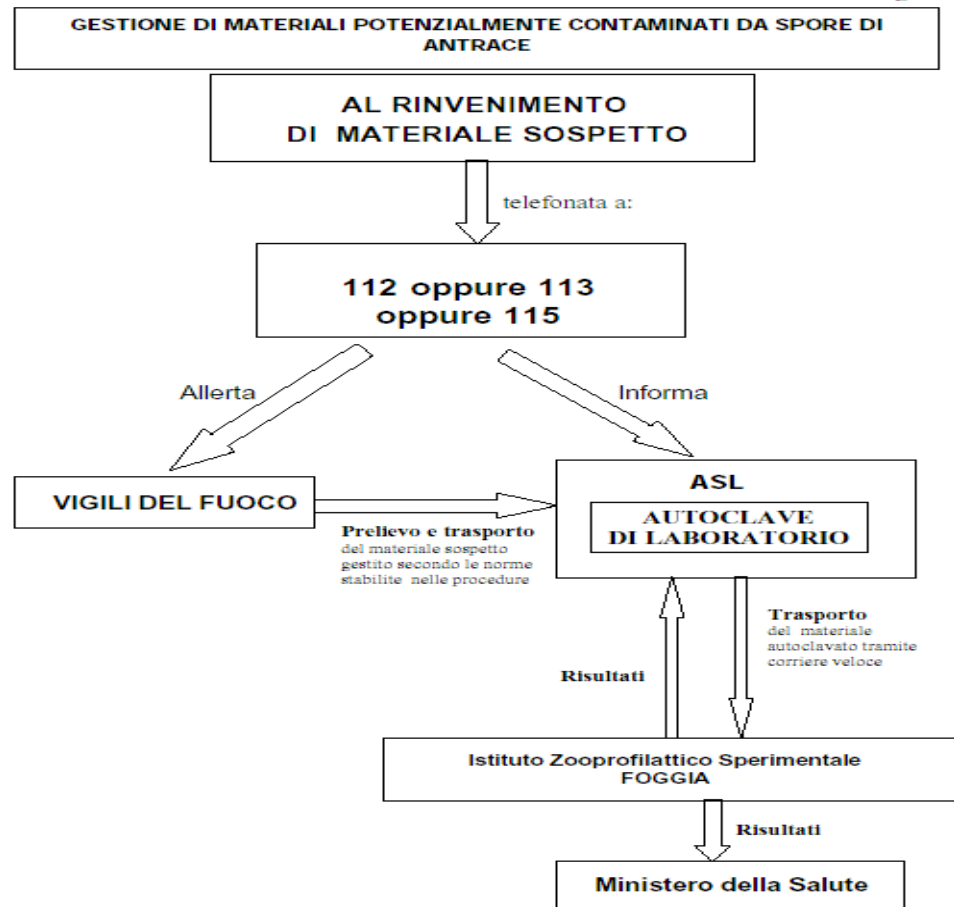
Aggiunta di involucri fuori della zona contaminata;

Sistema di ventilazione ambientale;

Cappa di sicurezza (BLS III).

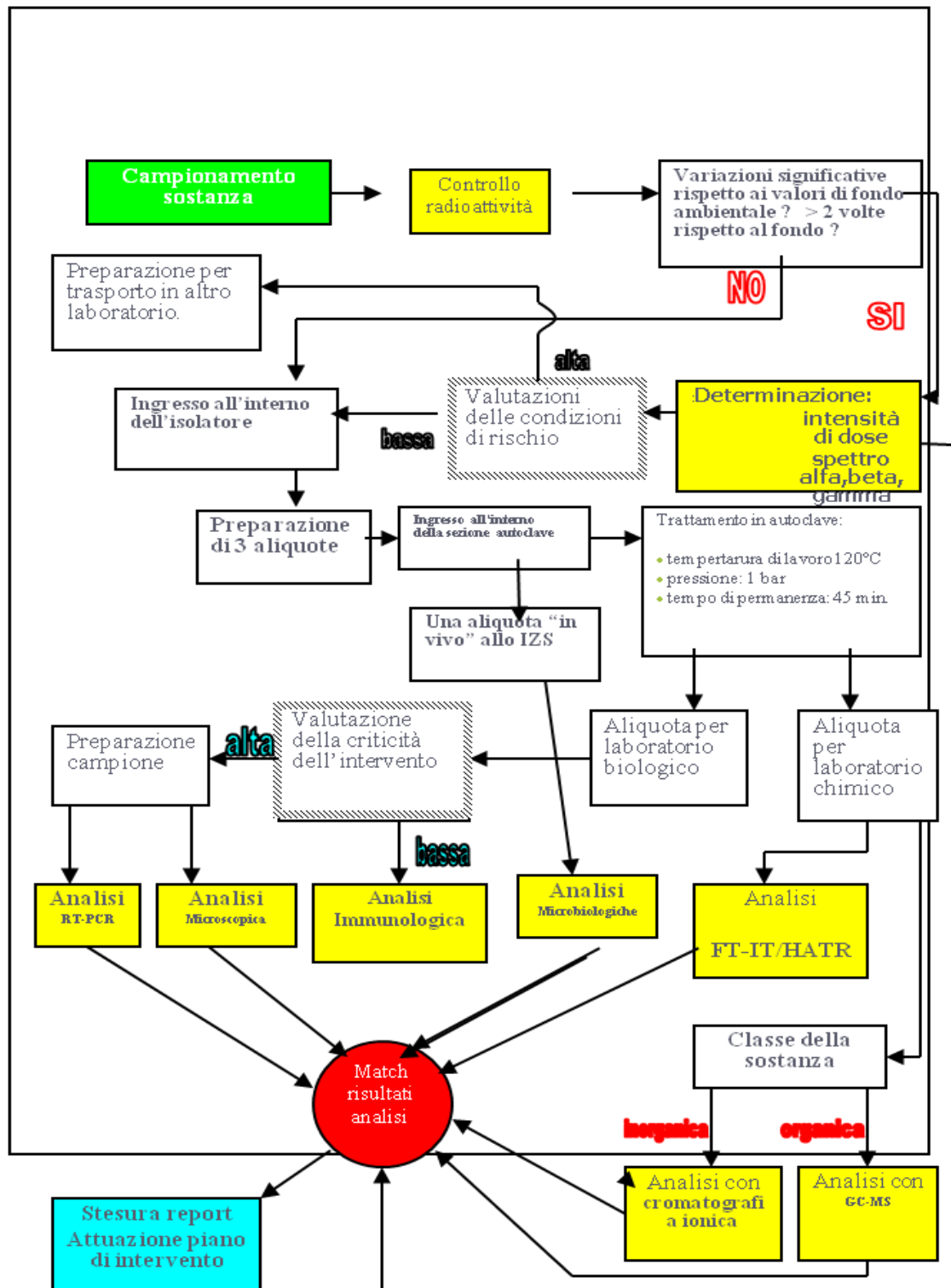
Schema di flusso di intervento biologico

Allegato 1



Ministero della Salute - Direzione Generale della Prevenzione

Nello schema sopra riportato non abbiamo tutta l'attività di trattamento ed analisi del campione che è stata sperimentalmente attuata e continua ad essere utilizzata da alcuni nuclei biologici avanzati (Venezia e Torino), i quali, in seguito ad accordi con gli IZS interregionali presenti territorio, riescono ad ottenere e fornire risposte molto più veloci. Diamo di seguito un possibile schema di flusso operativo sicuramente migliorabile.



Schema delle procedure di campionamento/analisi NBC (CBRNe)



Figura 39 un intervento biologico

“Non esiste in realtà nessuna procedura standard concepita per descrivere severamente come una squadra dovrebbe compiere il suo compito in materia di campionamento biologico, solo il buon senso e ogni procedura e attenzione che possa diminuire gli errori e i rischi di contaminazione dovrebbero essere usate in ogni situazione. Bisogna inoltre ribadire che i campioni possono essere molto pericolosi e devono essere maneggiati con cura e soprattutto da personale addestrato e protetto” (AEP 10 para 2.7.3).

Comunque, sia per ciò che concerne le operazioni di campionamento che per la progettazione e gestione di laboratori biologici, vale il **PRINCIPIO DI PRECAUZIONE** ovvero: bisogna considerare il rischio biologico, per sua stessa natura, sempre presente quando si manipolano sostanze che possono contenere agenti eziologici (anche quando sembrerebbe evidente la loro assenza).

4.1 DISPOSTO NORMATIVO

I Vigili del Fuoco, come anche l'Esercito Italiano, la Marina, l'Aeronautica, fanno riferimento, come base per tutte le operazioni di campionamento CBRN al:

**Manuale (N.A.T.O.) per Identificazione e Campionamento di
Agenti Chimici e Biologici (AEP-10)**

Cap. 2: Operazioni di Campionamento

Annesso B: Missione Biologica

Annesso D: Equipaggiamento per il campionamento

Per quanto riguarda la normativa nazionale ampia citazione è riportata all'interno del presente lavoro nel capitolo "Riferimenti Normativi".

4.1.1 PROCEDURE PER IL CAMPIONAMENTO BIOLOGICO

Innanzitutto va premesso che l'operatore addetto ai controlli antiterroristici è tutelato da D.P.I. speciali, idonei per la protezione da aggressivi chimici o tossici aeriformi, da speciali procedure di sicurezza e per esso sono previsti interventi profilattici e/o terapeutici specifici che saranno effettuati tempestivamente a seguito dell'accertamento della contaminazione.

Per ciò che concerne il comportamento da tenere per le operazioni di campionamento, bisogna tenere conto che rischi elevati sono associati a piccole quantità come micro gocce (*droplets*), aerosol non visibili e contaminazioni sequenziali di materiali (es. pacchetto o plico, *guanti da campionamento* con cui è stato manipolato, mani con cui sono stati sfilati i *guanti*, labbra o occhi inavvertitamente toccati, ecc.). Per questo è molto importante seguire, nel campionamento, procedure che pongano barriere alla sequenza (es. disinfettare con ipoclorito il plico prima e dopo le operazioni, decontaminare i *guanti* ancora indossati, toglierli rivoltandoli senza mai toccare la parte esterna, lavare le mani con acqua e sapone una volta terminate le operazioni).

È opportuno, qualora possibile, utilizzare tute e dispositivi a perdere, cambiandoli ad ogni prelievo nonché guanti e calzari monouso o stivali (da riciclare come detto per gli indumenti).

4.1.2. INDUMENTI DI PROTEZIONE BIOLOGICA

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE DI CATEGORIA III - INDUMENTI COMPLETI PER LA PROTEZIONE DEL CORPO

Tuta scafandrata a tenuta di gas	Categoria 3 - tipo 1a-ET
Tuta scafandrata non stagna ai gas	Categoria 3 – tipo 2
Tuta scafandrata a tenuta di liquidi	Categoria 3 – tipo 3
Tuta monouso a tenuta di polveri e di spray	Categoria 3 - tipo 4



Figura 40 in alto a sn tuta 3 e a seguire vestizione di operatore con tuta 1A-ET

I Guanti

I *guanti* per il campionamento biologico possono essere di materiali diversi come lattice, polipropilene ecc. ma la cosa più importante da ricordare è che bisogna sempre utilizzare guanti privi di polvere o talco (*Powder Free*), in quanto tali polveri potrebbero interferire con le analisi successive del campione (ad es. il talco è un inibitore della reazione pcr, che è la principale metodologia di analisi che utilizziamo per l'identificazione dei patogeni).

E' necessario utilizzare il "Buddy System" durante le fasi di vestizione, che prevede di aiutarsi e controllarsi a vicenda, ciò accresce in maniera notevole il senso di sicurezza degli operatori diminuendone lo stress.

D.P.I. per operatore "sporco"

- Tuta monouso per rischio biologico in materiale plastico antischizzo;
- Cuffia monouso in tyvek;
- Guanti in lattice o nitrile cat. III per rischio biologico;
- Calzari monouso di plastica a collo alto;
- Occhiali protettivi monouso;
- Mascherina facciale FP3 monouso.

. D.P.I. per operatore "pulito"

- Tuta monouso per rischio biologico in materiale plastico antischizzo;
- Guanti in lattice o nitrile cat. III per rischio biologico;
- Calzari monouso di plastica a collo alto;
- Mascherina facciale FP3 monouso.

Gli indumenti e gli altri D.P.I. vanno tolti nella zona filtro e depositati in appositi contenitori; quelli riutilizzabili possono essere trattenuti in zona qualora ci fosse un prolungamento delle analisi, per essere riutilizzati in seguito agli esiti negativi delle prime analisi.

4.2 LA SQUADRA DI CAMPIONAMENTO CBRNe

La squadra di Campionamento è costituita nella sua configurazione ideale da quattro persone addestrate al campionamento biologico:

Non serve che effettui un campionamento particolarmente elaborato e complesso, ma che prelevi campioni significativi, secondo le procedure standard di campionamento per analisi ambientali.

Comandante del Team (Team Leader)

Uomo Sporco

Uomo Pulito

Compilatore/Trasmettitore

La Squadra minima (usualmente impiegata nel campionamento biologico dei Vigili del Fuoco) è formata da:

Uomo Sporco

Uomo Pulito

La Squadra allargata è formata da:

Uomo Sporco;

Uomo Pulito;

Compilatore/Trasmettitore

Biologo/Tecnico di Lab. Biologico

Medico

Artificiere

Fotografo

La squadra di campionamento deve essere preparata ad affrontare situazioni in cui i campioni prelevati saranno gli unici disponibili per le analisi successive, deve essere informata sui parametri di riconoscimento degli agenti CBRNe, su come si presenta l'area da esaminare, deve avere, qualora operi all'aperto, le informazioni meteo e conoscere velocità e direzione del vento.

La squadra, come già accennato, dovrebbe essere dotata di equipaggiamenti portatili per registrare le informazioni durante la raccolta dei campioni:

registratore, fotocamera, GPS e mappe dell'area interessata. Qualora le *mappe* non fossero disponibili si utilizzeranno *griglie prestampate* sulle quali verrà indicata l'esatta posizione dei campioni verranno inoltre raccolte utili osservazioni ed informazioni.

Tutto il personale dovrà essere equipaggiato con dispositivi di protezione individuale, di *kit di primo soccorso, antidoti*, equipaggiamento individuale di decontaminazione, eventuali *vaccinazioni* contro i principali agenti biologici da guerra, dovranno essere previste solo se necessarie e disponibili.

La raccolta e lo stoccaggio dei campioni deve essere effettuata nel minor tempo possibile per:

- 1) Fornire risposte veloci (difesa e profilassi);
- 2) Evitare permanenze eccessive degli operatori in zona contaminata;
- 3) Evitare cambiamenti della situazione iniziale.

La squadra deve operare a piedi, in genere all'interno di un'area estesa approssimativamente 100 m².

Per quanto riguarda la natura del campione, deve trattarsi di un'aliquota analiticamente significativa che va confezionata e conservata in maniera tale da garantirne la completa integrità durante il trasporto fino al laboratorio di analisi.

La squadra di campionamento deve minimizzare gli errori di raccolta.

I campioni vanno raccolti o manipolati con *forcipi, spatole, pinzette, sessole* ed altri strumenti per il campionamento sterili e sterilizzabili o monouso, disponibili in quantità tale da poter essere usati per la raccolta di più campioni.

4.2.1 TEAM LEADER

Organizza, coordina, dirige e controlla la squadra, effettua per primo il sopralluogo in *zona rossa*, per trovare possibili punti da campionare (qualora non abbia già ricevuto direttive precise), evidenziando detti punti con segnali visibili (cartellini alfanumerici), traccia i primi rilievi sulla scena, ad occhio, su carta e/o mediante *macchina fotografica* e rileva il punto o i punti di campionamento col *GPS*.

Comunica (anche a mezzo *radio*) al *Compilatore/Trasmettitore*, posizionato al di fuori della *zona rossa*, i primi dati (spesso fondamentali per le ricostruzioni successive es. neve animali, pioggia o vento).

Fa entrare l'*Uomo Sporco* e l'*Uomo Pulito* all'interno della *zona rossa*, dando indicazioni sulle modalità di campionamento.

Alla fine delle operazioni si occupa del controllo della contaminazione degli altri membri della squadra.

4.2.2 UOMO SPORCO

Detto anche *Campionatore*, ha il compito di prelevare materialmente i campioni, (anche quelli "*in bianco*" in un'area immediatamente all'esterno di quella di campionamento) e depositarli nel *contenitore primario*, se è un *flacone* provvede anche alla sua chiusura, se si tratta di un *sacchetto* provvederà preventivamente a rivoltarne il bordo per favorire le operazioni, di apporvi la sigla di riconoscimento (*label*) e, successivamente, di inserire il *contenitore primario* nel *contenitore secondario*, che viene tenuto aperto dall'*uomo pulito* possibilmente fuori dalla zona sporca o al suo limite.

Ciò fatto, si toglie in sequenza i *calzari* e li deposita nel contenitore dei rifiuti pericolosi, poi si toglie il primo paio di *guanti* e lo depone nel suddetto contenitore.

E' la figura virtualmente più a contatto con i materiali contaminati ed è quindi sottoposto ad un forte carico di stress emotivo, per la qual cosa in condizioni ottimali si dovrebbe prevedere una sua sostituzione, organizzando una turnazione delle operazioni.

4.2.3 UOMO PULITO

O *Supporto*, assiste l'*Uomo Sporco* nella raccolta dei campioni, può occuparsi anche del prelievo del campione "*in bianco*", se manca il *Team Leader*, ne assume le funzioni e ne svolge i compiti. Si occupa di tutte le operazioni di prelievo e movimentazione strumentazioni ed attrezzatura da campionamento posizionata sul *telo da campionamento (drop shet)*, presenta il *sacchetto secondario* all'*uomo sporco* rivoltandone, se possibile, il bordo superiore e l'*uomo sporco* vi inserisce, come precedentemente visto, il *contenitore primario*, appone le sigle sui relativi *contenitori* e chiude il *contenitore* o i *contenitori secondari* mettendoli nei *contenitori terziari* che inserisce all'interno del *contenitore di trasporto*. Compila inoltre la documentazione di campionamento; bonifica l'area

di campionamento e l'area limitrofa alla zona di prelievo (*area arancio*), al termine delle operazioni.

4.2.4 COMPILATORE/TRASMETTITORE

Rimane nell'area esterna connesso via radio col *Comandante del Team*.
Riceve dal *Comandante del Team* i dati relativi ai campioni e compila la documentazione prevista. Preleva le confezioni integre confinandole in apposito contenitore.

Tutto il personale assegnato al campionamento deve essere formato ed informato sulle tecniche di campionamento, sulla materia inerente il rischio biologico e deve essere in possesso del II° livello NBCR.

Il *contenitore primario* viene passato ad altro personale in zona filtro, egualmente protetto, che provvede a disinfettare l'esterno del *sacchetto* con ipoclorito di sodio ponendolo poi in un secondo *sacchetto* o recipiente plastico stagno che verrà sigillato (*contenitore secondario*).

Il II° *contenitore* (*contenitore secondario*) viene passato in zona libera introducendolo nel III° *contenitore* antiurto (meglio se consegnato ad altro personale per il trasporto).



Figura 41 esercitazione di campionamento

N.B.: per le attività di prelievo da effettuare in più siti dell'area di campionamento, *calzari* e *guanti* devono essere sostituiti ad ogni sito di campionamento. Al termine delle attività di prelievo i D.P.I. utilizzati saranno

inseriti nel contenitore per i rifiuti pericolosi (*sacco per rischio biologico*), prima di raggiungere una nuova zona di campionamento.

- Raggiunto l'autoveicolo, i *sacchi* vengono posti all'interno del bagagliaio.
- La documentazione di campionamento, redatta per ciascun sito e firmata dall'*uomo pulito* (*team leader*), deve accompagnare i campioni corrispondenti.

Va sempre effettuato un controllo della contaminazione del personale al termine delle operazioni.

4.2.5 L'AREA DI CAMPIONAMENTO – LA ZONAZIONE

E' una parte fondamentale dell'intervento, si inizia col determinare l'estensione della contaminazione. Si procede poi con la delimitazione delle aree che sono suddivise, in ordine di pericolosità, così come di seguito indicato:

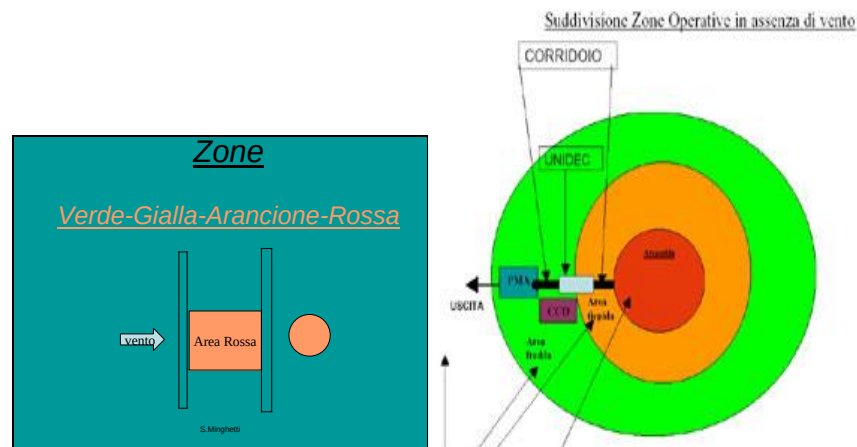


Figura 42 la zonazione

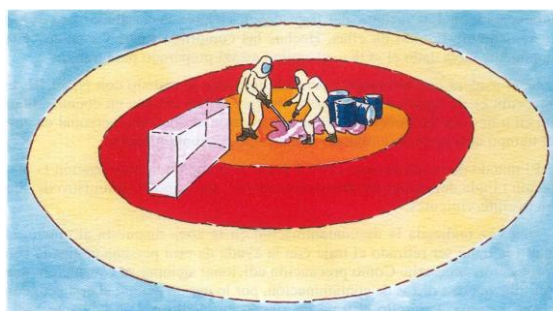


Figura 43 zonazione

Zona ROSSA o A o CALDA:

è l'area di massimo pericolo, l'area coinvolta (teatro operazioni). All'interno di quest'area possono entrare ed operare solo i *First Responders*

Zona ARANCIO o B o TIEPIDA:

area di supporto alle operazioni, è un'area potenzialmente pericolosa

Zona VERDE (GIALLA) o C o FREDDA:

area operativa senza limiti di accesso, non è pericolosa

Zona BIANCA o D o ESTERNA:

è la zona più esterna, non pericolosa e non operativa

Il confine delle zone operative: ROSSA-ARANCIO-GIALLA viene identificato utilizzando la strumentazione occorrente per il monitoraggio ad ampio spettro di tipo chimico e radiometrico (PID, IMS, ecc.). Per delimitare le aree si utilizzeranno *nastro segnaletico, birilli, transenne*.

Devono essere bloccati tutti gli accessi alle zone operative, chiedendo anche la collaborazione delle Forze dell'Ordine intervenute ed evitare assolutamente che alcun operatore privo di protezione o comunque non autorizzato possa accedere nelle *Zone Arancio e Rossa*. In *Zona Rossa* ha accesso solo personale dei Vigili del Fuoco e in alcuni casi dell'Esercito Italiano (VII Reg. Cremona) dotato di idonei DPI.

Nel caso di persone potenzialmente contaminate, bisogna predisporre dei punti di raccolta in *Zona Arancio* dove si potrà trattenerle in attesa di un processo di decontaminazione primaria (lavaggio con getti d'acqua) e dell'eventuale trattamento sanitario, fino comunque all'esito delle prime analisi biologiche. Il *Posto di Comando Avanzato PCA* (interforze e coordinato dal funzionario VVF) deve essere posizionato in *Zona Gialla* (sopravvento).

Importante è anche la scelta dell'area sicura dove stabilire il *Posto Medico Avanzato* e l'area di *triage* (primo soccorso medico avanzato).

Bisogna conoscere e rilevare i possibili mutamenti a livello locale della direzione del vento e quindi dell'eventuale contaminazione dei percorsi precedentemente sicuri e creare idonei corridoi di decontaminazione, per evitare di inquinare grandi aree.

Si devono identificare e concordare con i responsabili del soccorso sanitario le aree di raccolta e le modalità di decontaminazione, di *triage* e trattamento; *l'area di decontaminazione* va posizionata in *area (zona) arancione*; il *posto di comando avanzato* e *l'area di triage* (primo soccorso medico avanzato) in *area gialla*;

4.3 L'INTERVENTO DI CAMPIONAMENTO BIOLOGICO

L'intervento biologico tipico ha lo scopo di individuare, nel più breve tempo possibile, l'eventuale rilascio in ambiente di agenti patogeni, da parte di attentatori o, comunque, di far fronte ad eventi di tipo CBRNe nel miglior modo e nel minor tempo possibile. Quando infatti si ha il sospetto che si sia verificato un evento di tipo CBRNe, casuale o meno, si dovrà iniziare con una ispezione preliminare con l'utilizzo dell'apposito equipaggiamento CBRNe ed impiegando veicoli ed attrezzature idonee alla ricognizione CBRNe, il tipo di campioni da prelevare varia in funzione del luogo di prelievo, del metodo di disseminazione e del tipo di agente biologico. E' molto importante, in questa fase, cercare di determinare l'estensione dell'area coinvolta dall'evento, anche se tale valutazione, in campo biologico, risulta molto difficile da effettuare. Il campionamento delle superfici permette di determinare o confermare la presenza di agenti patogeni, di definire l'ampiezza della contaminazione ed in ultimo di valutare quali misure porre in atto per la bonifica. Le informazioni più importanti devono essere messe sull'etichetta e sul rapporto che accompagna il campione.

Per gli ambienti al chiuso sono necessarie le operazioni di evacuazione e chiusura, chiusura degli impianti di condizionamento e delle finestre, fino ad avvenuta bonifica o alla comunicazione di cessato allarme.

Lo schema di Flusso Intervento Biologico è il seguente:

Campionamento;

Trasporto dei Campioni;

Manipolazione dei Campioni;

Sterilizzazione;

Analisi;

Decontaminazione.

Il modello procedurale dei Vigili del Fuoco, per l'impostazione delle procedure d'intervento è il

Modello ad otto passi:

- 1. Controllo e gestione del sito;**
- 2. Identificazione del materiale/i coinvolti;**
- 3. Analisi dei pericoli e del rischio;**
- 4. Valutazione degli indumenti protettivi e delle attrezzature;**
- 5. Coordinamento delle informazioni e delle risorse;**
- 6. Controllo, confinamento e contenimento del prodotto;**
- 7. Decontaminazione;**
- 8. Chiusura dell'intervento.**

L'attuazione dello schema procedurale di riferimento è indipendente dalla dimensione e dalla gravità dell'evento. E' importante rilevare che, nonostante un intervento sia in maniera conclamata di tipo biologico, non si può escludere la presenza concomitante di materiali radiologici, o nucleari, di sostanze chimiche o di esplosivi. Per tale motivo è sempre bene effettuare una rilevazione chimica e radiometrica oltre a mantenere la massima attenzione e a rivolgersi agli artificieri se vi sono plichi o pacchi sospetti chiusi.



Figura 44 operazioni di campionamento di buste e plichi postali

Il personale che effettua gli interventi di campionamento biologico opera in condizioni ambientali particolarmente disagiate e stressanti, è dunque fondamentale una completa ed accurata preparazione psicologica propedeutica agli interventi che includa anche prove pratiche.

4.4 IL CAMPIONAMENTO DEI VIGILI DEL FUOCO NUOVE PROSPETTIVE

Il continuo aggiornamento ed una pianificazione accurata degli interventi può essere proficua per affrontare qualsiasi intervento con maggiore sicurezza e professionalità.

Le nuove prospettive riguardano tra l'altro, la dotazione delle squadre di campionamento di idonea strumentazione per la rivelazione veloce di contaminanti di tipo "B" al fornire risposte rapide in situazione di emergenza laddove la priorità è rappresentata dallo sblocco di pesanti situazioni di "impasse" come può avvenire ad esempio per interventi in porti, aeroporti o linee ferroviarie metropolitane.

Specifici corsi dovranno poi essere fatti al personale per l'aggiornamento e per l'uniformazione delle procedure di campionamento biologico sul territorio nazionale oltre che per l'adeguamento alle procedure europee.

4.5 LA SCHEDA DI CAMPIONAMENTO

Gli operatori devono avere a disposizione una *scheda di campionamento* sulla quale devono essere indicate tutte le informazioni potenzialmente utili alla successiva analisi, alla gestione dell'intervento ed a tutte le operazioni ed indagini che possono seguire l'intervento. La *scheda di campionamento* permette all'operatore di annotare i dettagli di maggior rilievo rilevabili prima, durante e dopo il prelievo per fotografare il momento preciso delle varie operazioni. Questo documento non va considerato completo ma può essere integrato dalle

informazioni rilasciate da altro personale intervenuto, testimoni e persone coinvolte.

La nostra esperienza ci ha portato ad impostare ed utilizzare una *scheda*, di cui diamo esempio in allegato, che, alla luce di una più attenta e meditata analisi vorremmo adattare e snellire nel corso dell'immediato futuro anche nell'ottica di una rapida risoluzione dell'intervento biologico(vedi fascicolo "Allegati").

4.6 LA DECONTAMINAZIONE

Mezzi di bonifica e smaltimento

- 1) autoclave a 120°C;
- 2) soluzioni di ipoclorito di sodio al 4-10 %;
- 3) disinfettanti a base di ammonio quaternario;
- 4) formaldeide al 4%(attualmente proibita);
- 5) formalina al 10% (attualmente proibita);
- 6) glutaraldeide al 4% (ph 8-8,5).

Gli agenti biologici dovrebbero essere rimossi quanto prima possibile, sia dall'equipaggiamento che dagli operatori. In assenza di norme o procedure specifiche, è buona prassi decontaminare le superfici esposte, usando una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% oppure, in assenza di questa, mediante un abbondante lavaggio con acqua e sapone (utilizzando acqua preferibilmente tiepida), spazzolando successivamente le superfici e risciacquandole con acqua calda. L'acqua utilizzata a questo scopo risulta essere contaminata e deve essere rimossa con adeguata attenzione e raccolta in un'area sicura.

I Vigili del Fuoco hanno l'obbligo di decontaminare il proprio personale ed i propri mezzi e solo superficialmente il sito, comunque, se necessario, danno una mano alla Croce Rossa per la decontaminazione delle persone.



Figura 45 fasi della decontaminazione degli operatori

Gli operatori devono decontaminarsi l'un l'altro (*buddy-deco*) o essere decontaminati da altri operatori.

4.7 L'ANALISI SUL CAMPIONE

Vogliamo in questa sede evidenziare la particolare figura degli operatori specialisti biologici come rilevatori precoci: l'importanza della tempestiva identificazione fa sì che sia prevista per essi una particolare attività formativa e di addestramento specifica, focalizzata sul rischio derivante dall'impiego di agenti biologici in ottemperanza al D.Lgs. 81/08 in materia di sicurezza sui luoghi di lavoro.

4.7.1. TRATTAMENTO DEL CAMPIONE E METODOLOGIE DI ANALISI

Le oggettive difficoltà nella rapida identificazione biologica possono essere causa anche di forti disagi per il SSN in quanto obbligano a mantenere l'uso di particolari misure protettive per tempi piuttosto prolungati. A questo scopo è in corso una serie di studi e sperimentazioni sui metodi migliori di identificazione rapida a seguito di evento o in fase di monitoraggio preventivo di siti a rischio.

Torniamo ora alla nostra procedura oggetto del presente lavoro sperimentale.

Il campione, introdotto all'interno dell'isolatore attraverso il tunnel di comunicazione con l'esterno, viene estratto dai tre *contenitori di trasporto* e l'operatore/analista svolge sullo stesso una serie di operazioni in linea con una

procedura standard che prevede la preparazione di tre aliquote, delle quali una da lasciare “*in vivo*”, verrà inviata al laboratorio di diagnostica dell’IZS delle Venezie di Legnaro (PD) per le analisi microbiologiche (*Bacillus anthracis* e *Brucella ss.pp.*), le altre due, una per il laboratorio biologico e l’altra per il laboratorio chimico dei Vigili del Fuoco vengono preventivamente sterilizzate in autoclave con un ciclo di 45 minuti a 120 °C ed 1 atm. di pressione e quindi avviate all’analisi. Viene quindi effettuata l’estrazione del DNA all’interno di una cappa biologica statica da estrazione in plexiglass (BSL I) al fine di evitare soprattutto l’inquinamento dello stesso.

Per l’analisi, il laboratorio utilizza principalmente la tecnica biomolecolare rt-pcr che permette di seguire l’andamento dell’analisi in tempo reale e con una notevole riduzione di tempo rispetto alla pcr classica. Attualmente si utilizzano per le analisi con rt-pcr, reagenti *liofilizzati* ma si è effettuata anche sperimentazione sulla possibilità di utilizzo di reagenti “*wet*” utilizzati soprattutto durante le Olimpiadi Invernali di Torino nel 2006.

Le analisi vengono effettuate con lo strumento Real Time (rt-pcr) che vedremo più avanti all’interno di questo capitolo, dopo una breve prefazione sulla P.C.R..

Per quanto riguarda la possibilità di ulteriori analisi, il laboratorio ha a disposizione un *microscopio in contrasto di fase* per la verifica di presenza di *batteri* e *funghi* senza bisogno di fissare e colorare il campione, per tale metodologia diagnostica è in corso una sperimentazione con il Laboratorio di Diagnostica dell’IZS delle Venezie di Legnaro (PD), tesa soprattutto ad individuare la fattibilità e le metodologie di pretrattamento del campione per una analisi che risulta, allo stato attuale, ancora piuttosto difficoltosa, a causa della eterogeneità delle matrici di campionamento.

Il laboratorio dispone di *test di identificazione immunologica rapida* (*Bio strips*) con i quali ha fatto delle sperimentazioni per l’identificazione di *biotossine* (*tossina botulinica* e *ricina*). Testandone anche l’uso durante gli interventi per ottenere una risposta rapida sul campo.

L’analisi con tecnica rt-pcr viene sempre ripetuta per due volte sullo stesso campione e, per quanto riguarda la tempistica, è ragionevole dire che, considerando le fasi di preparazione/sterilizzazione del campione e la successiva

estrazione del DNA, oltre all'analisi vera e propria, il tempo di prima risposta si attesta ragionevolmente attorno alle 4-5 h, tempo da considerare estremamente competitivo.

L'aliquota del campione destinata al laboratorio chimico del Comando viene analizzata, in genere, mediante *cromatografia ionica* per la ricerca di *floruri*, *cloruri*, *bromuri*, *nitrati*, *fosfati* e *solfati* e mediante strumentazione FTIR./HATR.

4.7.2 ESTRAZIONE DEL DNA

L'*estrazione* e la purificazione degli acidi nucleici costituiscono il primo passo per la caratterizzazione e lo studio del DNA con le tecniche di biologia molecolare. Consiste in una serie di operazioni meccaniche e chimiche sul campione tese a realizzare la lisi cellulare, la rottura della parete *sporica* ed il recupero dell'acido nucleico.

Si hanno in successione le seguenti fasi: ***Lisi cellulare - Separazione del DNA dai detriti cellulari e Purificazione.***

In genere le operazioni di *estrazione* vengono effettuate all'interno di una *cappa biologica statica "da estrazione"* in plexiglass (BSL I) al fine di evitare soprattutto l'inquinamento del campione.

Questa fase è necessaria per liberare il DNA dal *nucleo* della cellula, dalle *proteine istoniche* che lo avvolgono e contemporaneamente vengono inattivate anche le *nucleasi cellulari* che potrebbero degradare il DNA libero. La completa distruzione e la lisi della *parete cellulare/membrana plasmatica* di cellule ed organuli, è condizione necessaria in tutte le procedure di isolamento del DNA genomico: una lisi incompleta si traduce con una significativa riduzione della resa.

Questa procedura deve essere abbastanza vigorosa da frammentare e disgregare il materiale di partenza, ma non deve danneggiare la molecola di DNA.

Lisi cellulare le procedure di lisi del campione biologico includono:

- **disgregazione meccanica (es. omogeneizzazione, lisi ipotonica, calore);**
- **solubilizzazione delle membrane (agenti chimici, es. detergenti);**

- **digestione enzimatica delle membrane (es. proteinasi K, lisozima);**
- **denaturazione delle proteine, inattivazione delle nucleasi (agenti caotropici, es. isotiocianato di guanidinio).**

Molto spesso si utilizzano dei protocolli in cui questi sistemi sono combinati, possono essere utilizzati tamponi di lisi contenenti differenti combinazioni di sali, enzimi, detergenti, si può anche attuare la rottura meccanica dei tessuti (mortaio e pestello).

Attualmente, esistono in commercio numerosi kit, sia per l'*estrazione* nelle diverse matrici, che per la rivelazione rapida di agenti biologici attraverso tecnologie Real-Time.



Figura 46 le operazioni di estrazione

Le diagnosi di *infezioni batteriche* o *virali* mediante PCR rappresentano una valida alternativa alle tecniche diagnostiche tradizionali effettuate mediante *isolamento* dei ceppi patogeni in *coltura* e loro riconoscimento morfologico oppure con tecniche *immunologiche*.

La PCR riesce a identificare velocemente e con estrema sensibilità la presenza di *microrganismi* patogeni.



Figura 47 date le varie sostanze inibitrici è bene operare in *cappa statica*

4.7.3 LA TECNICA P.C.R. (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La P.C.R (*Polymerase chain reaction*) è la replicazione in vitro del materiale genetico (DNA/RNA), con la produzione di un gran numero di copie (*amplificazione*) di una regione specifica di DNA (*frammento*).

Inventata da Kary Mullis nel 1983, (Mullis KB & Faloona FA. “Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction”. *Methods Enzymology* 1987 (155:335-50).

Il principio alla base della reazione a catena della polimerasi (PCR), già in qualche modo delineato nella sua forma nel 1971, diventa reale nel 1987 con la pubblicazione del primo esperimento di amplificazione del DNA. La PCR è stata perfezionata e automatizzata negli anni successivi.

La PCR è una geniale applicazione in vitro della capacità tipica del vivente di sintetizzare, attraverso complesse reazioni enzimatiche, il proprio materiale genetico.

L'*amplificazione*, ossia la produzione di un gran numero di copie del segmento specifico di DNA che interessa (fino a $10^9 - 10^{12}$ copie), rende più facile la caratterizzazione.

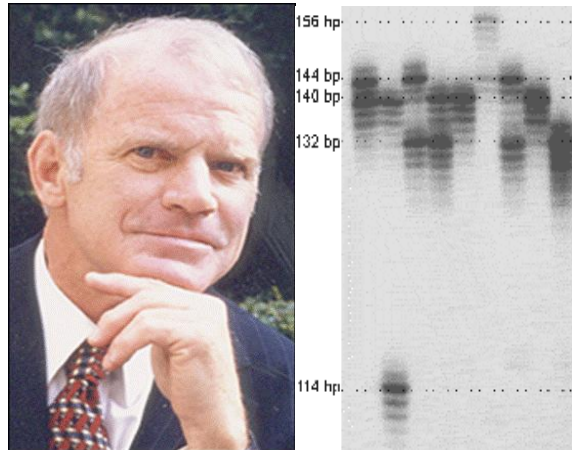


Figura 48 sopra K.B.Mullis Nobel 1993 per la chimica – a sn la corsa degli *amplificati* su gel nella PCR classica

La PCR ha avuto un impatto crescente, inizialmente nell'ambito "ristretto" della biologia molecolare, approdando infine alle altre discipline scientifiche.

Vediamo qui di seguito, e più nello specifico, il funzionamento della reazione:

attraverso l'innalzamento della temperatura le due catene di DNA si separano, si ha quindi la ricostituzione (*sintesi*) di un segmento di DNA a doppia elica a partire dal filamento ad elica singola. Il filamento complementare viene costruito a partire da una serie di *nucleotidi* (monomeri dell'acido nucleico) presenti nella provetta in cui avviene la reazione che vengono disposti nella corretta sequenza.

Questo processo viene svolto in natura sfruttando l'azione di *enzimi* chiamati *DNA-polimerasi*, che sono in grado di sintetizzare progressivamente il nuovo filamento di DNA.

E' necessario conoscere le sequenze *oligonucleotidiche* che fiancheggiano le estremità della regione di DNA da amplificare che fungono da innesco della reazione (*primers*) dei due opposti filamenti, questi si fanno legare alle regioni complementari del DNA (fase di *annealing*) ed estendere nelle due direzioni, l'uno verso l'altro. Alla fine della duplicazione del segmento compreso fra i due *primers*, le due nuove coppie di filamenti complementari vengono a loro volta denaturate e fungono da stampo per una successiva duplicazione.

Mediante ripetuti cicli di replicazione/denaturazione si ottiene un incremento geometrico delle copie del segmento duplicato. Si può così ottenere una *amplificazione* fino a molti milioni di copie.

La tecnica, come si è visto, è basata sulla sintesi ciclica di DNA *in vitro*, che permette in poche ore la moltiplicazione di una particolare sequenza di DNA.

Gli *enzimi* che permettono tale reazione (*polimerasi*) nella maggior parte degli esseri viventi, vengono però distrutte alle temperature necessarie alla denaturazione del DNA “*in vitro*” (96-99 °C), l'intuizione degli autori è stata quella di utilizzare particolari *polimerasi* appartenenti a organismi *termofili* che non vengono inattivate dalle alte temperature, ad esempio la *Taq polimerasi* proveniente dal batterio *Thermus aquaticus*.

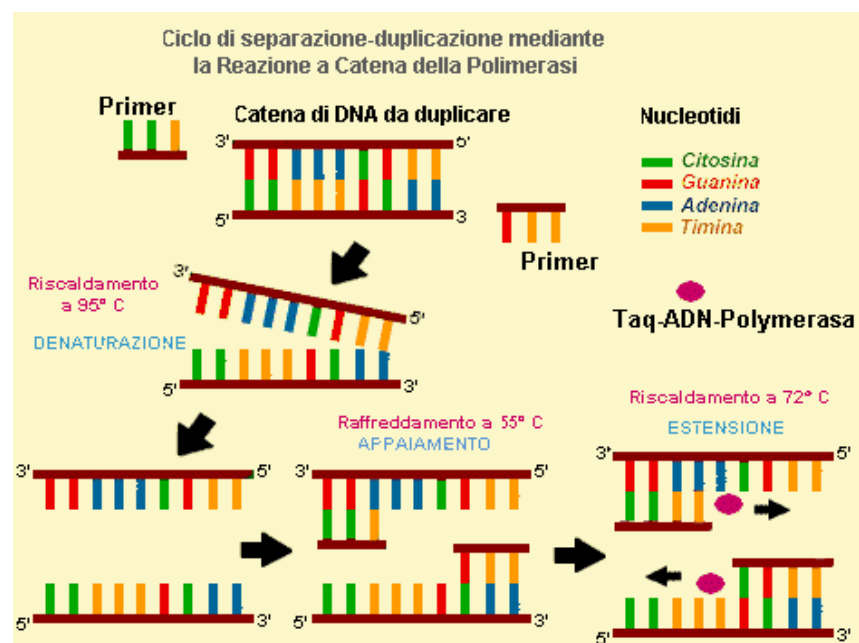


Figura 49 schema dei cicli della reazione PCR

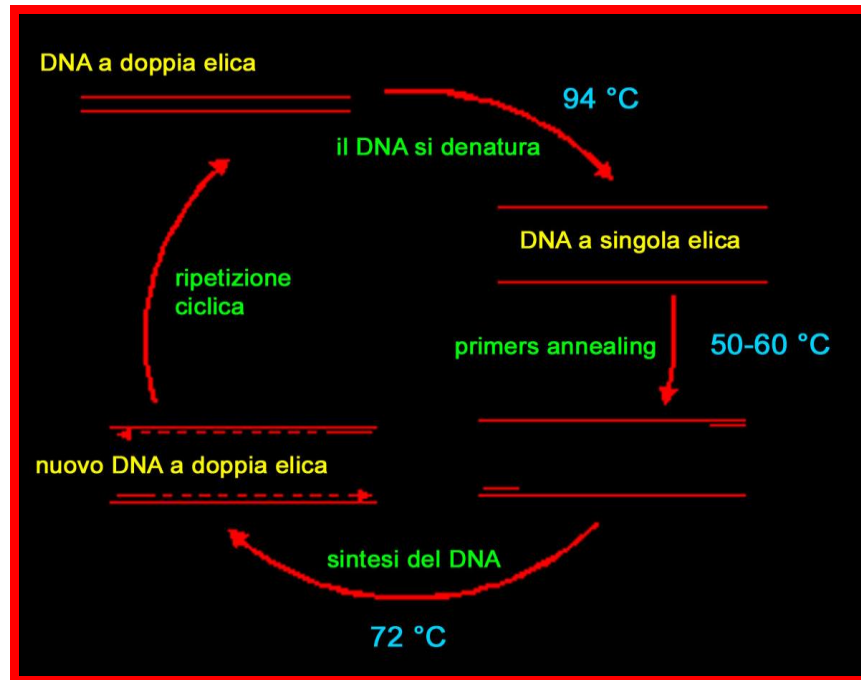


Figura 50 schema dell'intero ciclo della PCR

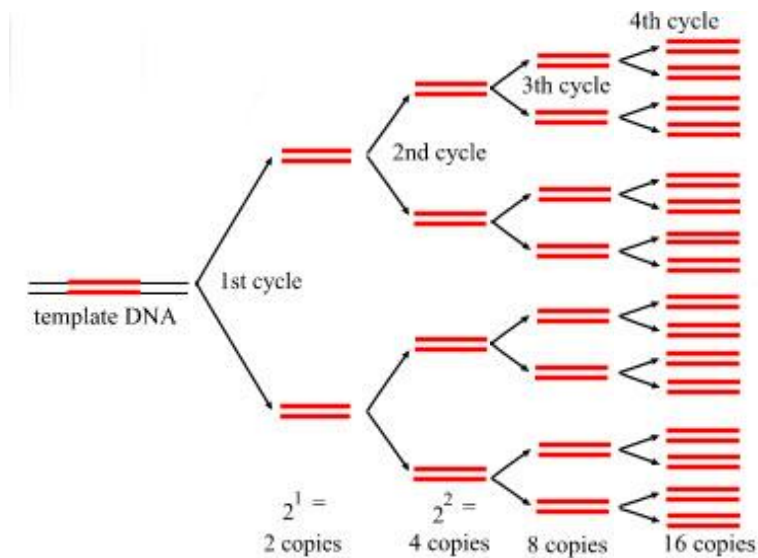


Figura 51 l'amplificazione

La reazione enzimatica avviene all'interno di un *tubo da microcentrifuga* o in un *capillare*.

E' necessario amplificare specifici geni "marcatori" per la detezione dei patogeni e tra questi:

- **i geni ribosomiali** (5S, 16S e 23S rRNA);

- **i geni di virulenza** (pX01 [pag] e pX02 [capB] di *Bacillus anthracis*).

Nella P.C.R. classica l'*amplificato* viene successivamente sottoposto ad *elettroforesi* su *gel* di *poliacrilammide*.

Il metodo ha una elevata sensibilità e consente la rivelazione di agenti anche non coltivabili o di difficile coltivazione.

Svantaggi del metodo: informazioni solamente qualitative (presenza/assenza) e possibilità di falsi negativi (problema particolarmente rilevante in campioni ambientali).

Per ottenere informazioni quantitative è necessario utilizzare una “*Real Time – PCR*” la quale permette di ottenere informazioni quantitative su geni specifici presenti in una matrice contaminata anche a concentrazioni molto basse (30 *spore* di *Bacillus anthracis*).

La P.C.R. quantitativa in tempo reale è un metodo che permette di seguire, in tempo reale, appunto, l'*amplificazione* e la quantificazione del DNA, questo, *amplificato* dalle reazioni a catena delle polimerasi è quantificato dopo ogni fase di *amplificazione*. La quantificazione è possibile mediante colorazioni fluorescenti (es. *SYBR green FRET* ecc) che intercalano il DNA a doppio filamento e da *oligonucleotidi* modificati del DNA (denominati *sonde*) che sono fluorescenti una volta ibridati col DNA.

La Real-Time PCR: combina l'*amplificazione* e la rilevazione della PCR in un unico passaggio. Il principio base è la messa in evidenza della sequenza target mediante una rivelazione *fluorogenica*. I *reporters fluorescenti* permettono di monitorare la reazione PCR in continuum: per esempio i. *fluorocromi intercalari* (*SYBR Green*) Il *SYBR Green* fluoresce 250 volte di più se intercalato a DNA ds

In passato le misure venivano effettuate durante tutta la durata della PCR ma si comprese successivamente che ciò era un errore: la curva teorica e quella sperimentale infatti non coincidono. Le misure vengono attualmente registrate in fase di aumento esponenziale, quando la reazione PCR è più efficiente. Il momento in cui la fluorescenza supera in maniera visibile un valore “soglia” (*rumore di fondo*) è quello meglio correlato al numero di copie di geni iniziali.

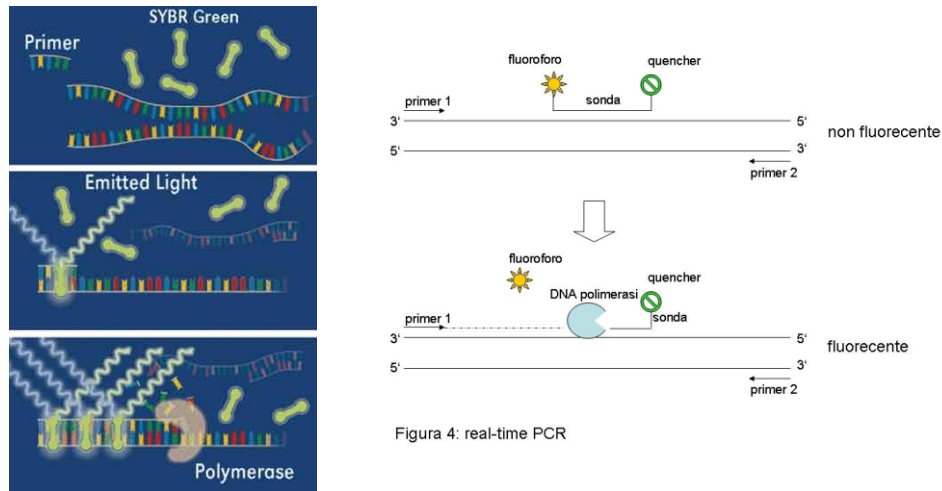


Figura 52 esempi di colorazioni mediante *fluorofori*

La RT-PCR trova impiego:

nelle tecniche di ingegneria genetica;

nella diagnostica molecolare;

in ambito forense;

nelle analisi di laboratorio;

nelle scienze ambientali;

in antropologia.

Si usano generalmente un **controllo positivo** ed uno **negativo** oltre ad un **controllo di estrazione** per monitorare l'efficacia del processo di *estrazione*, quest'ultimo ed i primi due per monitorare la contaminazione sia in fase di *estrazione* che di preparazione del campione per la p.c.r..

Quando si lavora con il DNA è necessario usare materiali e soluzioni sterili "a purezza biologica", cioè non contaminati né da DNA che da /DNAsi/RNAsi né tantomeno da *batteri* o da altri prodotti reattivi.

Bisogna indossare sempre *guanti* privi di polvere o talco in modo da evitare il contatto diretto con le dita (presenza di nucleasi sulla cute).

Moderare l'uso del *vortex* a velocità elevata durante le fasi di estrazione e preparazione dei campioni, giacchè può causare la rottura della catena nucleotidica, è consigliabile miscelare accuratamente le soluzioni dolcemente, non usare puntali con la punta troppo sottile e pipettare sempre lentamente.

Considerata la particolare stabilità della molecola di DNA, i suoi prodotti di *amplificazione* costituiscono una pericolosa fonte di contaminazione (*carry over*).

L'RNA, essendo una molecola a singola catena, è notevolmente meno stabile rispetto alla molecola di DNA e ciò fa sì che nell'*estrazione* e nei processi successivi bisogna essere estremamente cauti, ad esempio, il materiale biologico avente come genoma l'RNA non può essere *sterilizzato* in autoclave prima dell'*estrazione* e dell' *analisi*.

Per evitare qualsiasi tipo di contaminazione bisogna prevedere una serie di locali (o zone di lavoro) rigorosamente separati per le diverse fasi dell'*analisi* (prePCR, PCR, postPCR), considerando un flusso di direzione delle operazioni a senso unico per:

- **flusso dei campioni**
- **preparazione dei reagenti**
- **personale tecnico**

Devono essere inoltre previste attrezzature dedicate e separate per ogni fase di lavoro e devono essere adottate procedure di prevenzione della contaminazione e di bonifica al termine di ogni processo.

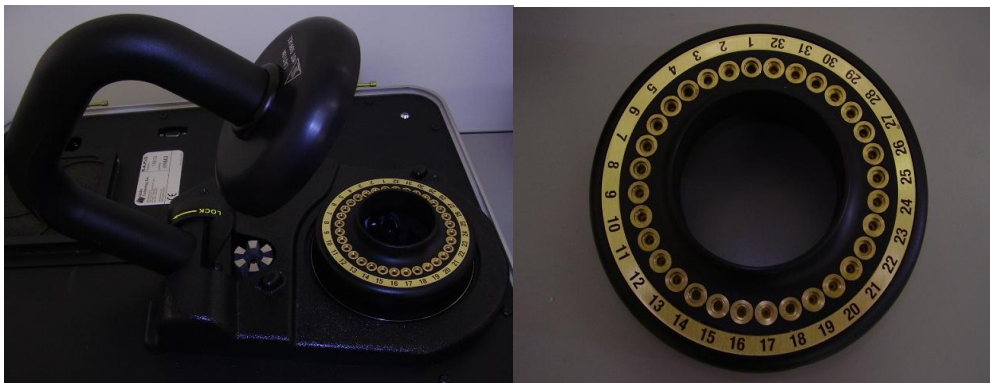


Figura 53 il Rapid ed il carousel per i capillari

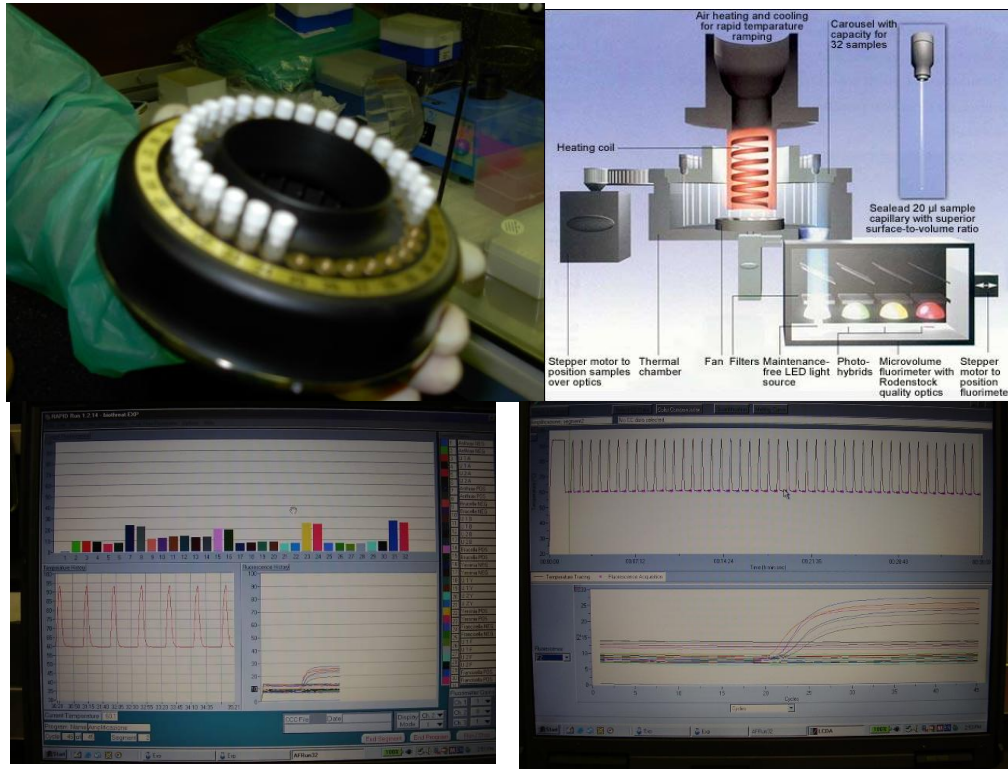


Figura 54 nell'ordine da sn in alto: il rotore (*carousel*) per i capillari, schema di uno strumento rt-pcr, schermata di *analisi*, andamento di cicli e *amplificazione*

Il Rapid™ Real Time RT-PCR; con cui si effettua l'*analisi biomolecolare* presso il nostro laboratorio biologico, è uno strumento per rt-pcr campale, spallabile e trasportabile, di tipo aperto e permette l'*analisi* per l'identificazione di qualsiasi sequenza di DNA di cellule *procariotiche*, *eucariotiche* e dei *virus*, ed in particolare per l'identificazione specie specifica, per confronto del corredo genetico, di qualsiasi organismo.

Il Rapid™ si avvale della tecnica *real time polymerase chain reaction* su *cuvette capillari* e della tecnologia *F.R.E.T.(fluorescenza)*, che permettono di effettuare *analisi* biologiche in tempi veramente brevi rispetto alle metodiche classiche di laboratorio biologico. Sono possibili due modalità predeterminate di *analisi*: una per la ricerca di un singolo organismo (*Batch test*) con previsione di doppio controllo positivo e negativo e possibilità di analizzare da 1 a 28 campioni sconosciuti ed una modalità (*Screen test*) che permette di testare la presenza di diversi organismi (fino a 10). A prescindere da tali modalità predeterminate è comunque possibile impostare le *analisi* con i parametri che si preferiscono.

Lo strumento fornisce dati analitici semiquantitativi ed ha alta sensibilità, riconoscendo frammenti di DNA pari a otto paia di basi, da inoltre la possibilità di ulteriore e più fine valutazione dei dati attraverso l'analisi delle curve di *melting* per il confronto delle temperature di *annealing* che danno indicazioni sulla attendibilità di dati di positività dubbi.

Per disposizione ministeriale il laboratorio è obbligato ad eseguire test per la verifica di presenza del DNA dei seguenti agenti: *Bacillus anthracis* (plasmidico), *Yersinia pestis* (genomico), *Francisella tularensis* (genomico). A questi è stato recentemente aggiunto il virus *Variola major* (agente eziologico del vaiolo).

Alcuni laboratori del CNVVF (es. Roma, Venezia, Milano), di consuetudine effettuano analisi anche per *Brucella* spp (DNA generico).

Il Rapid è utilizzato da più di quaranta corpi militari nel mondo, tra i quali l'Esercito Italiano che ha potuto provarlo sul campo nel corso delle operazioni "Enduring freedom" in Afghanistan e "Babilonia" in Iraq, è attualmente in dotazione ai Comandi Provinciali VV.F. di Roma, Milano e Venezia.

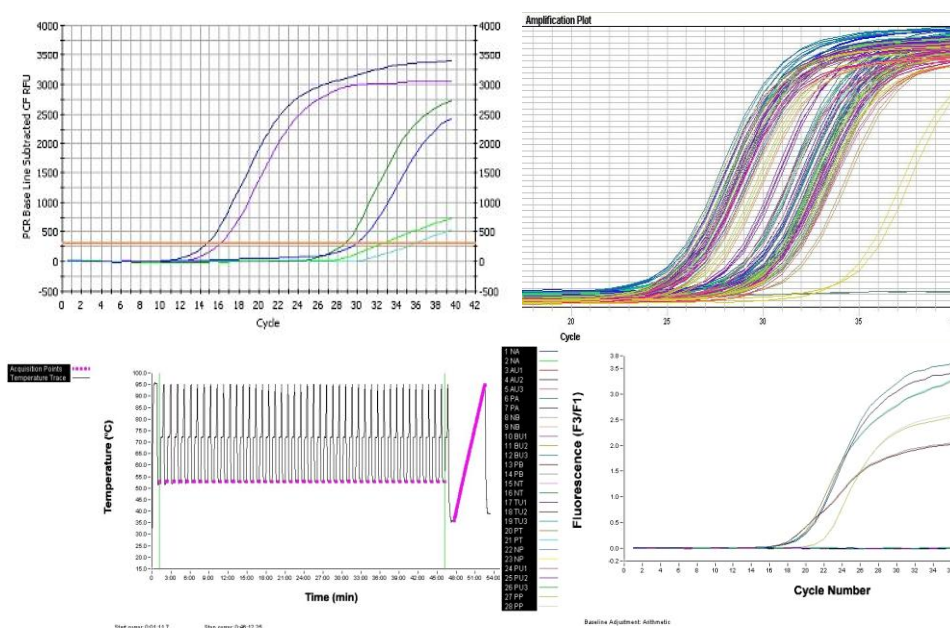


Figura 55 grafici degli *amplificati* e (in basso a sn) grafico dei cicli di reazione

Come già accennato, l'analisi con tecnica rt-pcr viene sempre ripetuta per due volte sullo stesso campione.

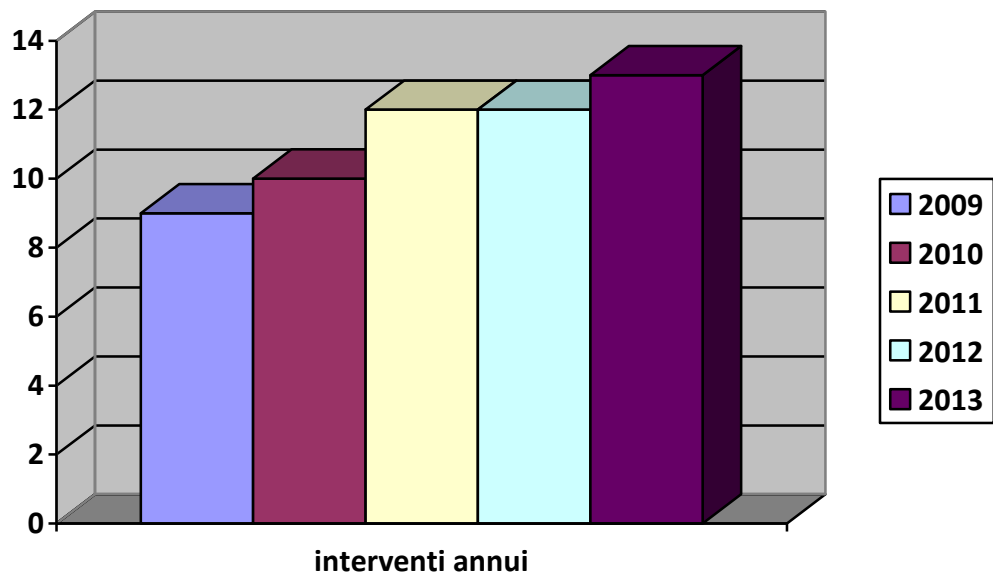


Grafico degli interventi biologici del laboratorio di Venezia

4.7.4 TEST DI IDENTIFICAZIONE IMMUNOLOGICA (BIOSTRIPS)

I *Test immunologici* Sono basati sull'alto grado di specificità del meccanismo *antigene – anticorpo*.

Ve ne sono di vari tipi ma per la maggior parte si tratta di test cosiddetti *immunocromatografici a scorrimento laterale* per l'analisi di campioni liquidi.

Mediante questo tipo di test, il nostro laboratorio biologico ha effettuato e continua ad effettuare delle prove sperimentali per la possibilità di identificazione veloce di *biotossine (tossina botulinica e ricina)*. Le *Biostrips* sfruttano la specificità della reazione antigene-anticorpo per determinare la presenza di *microrganismi* e di loro *tossine*, oltre che di *composti chimici*.

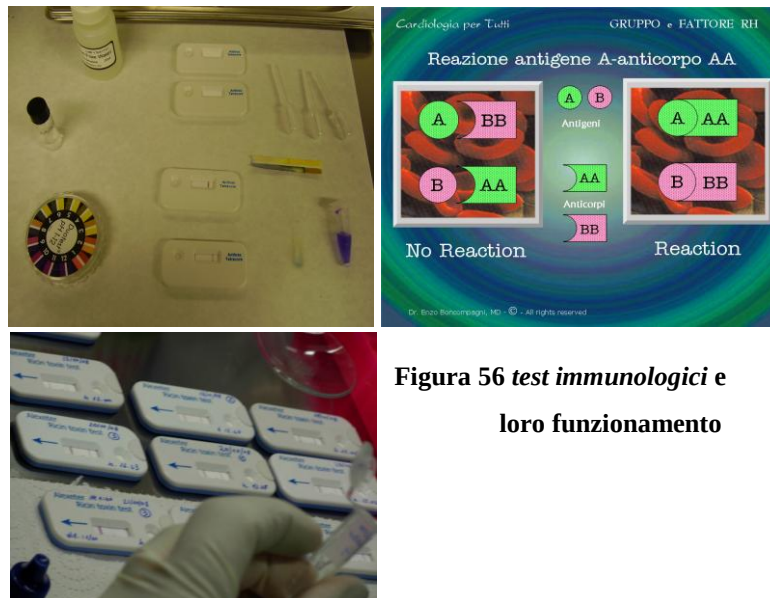


Figura 56 test immunologici e loro funzionamento

TABLE 1. Examples of BW/ID agents, accepted detection and identification methods, and available rapid immunological assays^a

Agent	Standard method(s)	Immunological assay			
		HHA	ELISA	ECL	TRF
Bacteria					
<i>Bacillus anthracis</i>	Culture, γ phage, FA,	X	X	X	X
<i>Brucella</i> sp.	Culture, FA	X	X		
<i>Burkholderia</i> sp.	Culture	X	X		
<i>Coxiella burnetii</i>	Culture, serology, FA,	X	X		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Culture, serology	X	X	X	
<i>Francisella tularensis</i>	Culture, FA	X	X		X
<i>Salmonella</i> sp.	Culture, serology	X	X		
<i>Shigella</i> sp.	Culture	X	X		
<i>Vibrio cholerae</i>	Culture, serology	X	X		
<i>Yersinia pestis</i>	Culture, FA	X	X		
Parasites, <i>Plasmodium</i> sp.	Microscopy	X	X		
Toxins					
Aflatoxins	HPLC, MS		X		
<i>C. botulinum</i> neurotoxins	Bioassay	X	X	X	X
Ricin	ELISA	X	X	X	
Saxitoxin	Bioassay		X		
Shigatoxin	Bioassay	X	X		
Staphylococcal enterotoxins	ELISA	X	X	X	X
Viruses					
Dengue	Culture, CF, FA	X	X		
Ebola	Culture, EM, FA		X		
Rift Valley fever	Culture, FA		X		
Variola major (smallpox)	Culture, EM	X	X		
West Nile fever	Culture, serology		X		
Yellow fever	Culture, CF, FA		X		

^a Abbreviations: CF, complement fixation; EM, electron microscopy; FA, fluorescent antibody; HHA, hand held assay; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS, mass spectroscopy; X, assay available.

Figura 57 tabella degli agenti rilevabili con *test immunologico*

4.7.5 PROVE DI RIVELAZIONE DI TOSSINA RICINICA

Nell'anno 2008, il nostro laboratorio ha iniziato degli interessanti test di rivelazione, attualmente ancora in atto, della *tossina ricinica* mediante test immunologici (*immunocromatografia a scorrimento laterale*).

Scopo di tale ricerca è quello di capire la reale affidabilità dei risultati ottenuti, oltre naturalmente a verificare i limiti delle *Biostrips* determinati dalle differenti condizioni del campione e la creazione successiva di valide procedure di campionamento.

E' inoltre nostra intenzione verificare l'ambito di utilizzo dei *test immunologici* ed i loro reali limiti (compresa la presenza di falsi positivi/negativi) congiuntamente alla verifica di sistemi di manipolazione ed analisi in condizioni di completa sicurezza per l'operatore.

Il primo lavoro che è scaturito da questa ricerca, che ha riguardato la verifica di positività su campioni liquidi a diverse diluizioni e che si allega alla presente tesi, ha fornito risultati interessanti e lusinghieri ed è stato pubblicato negli atti del OPCW Meeting of the SAB TWG on Sampling and Analysis – The Hague – 20/21 nov 2008.



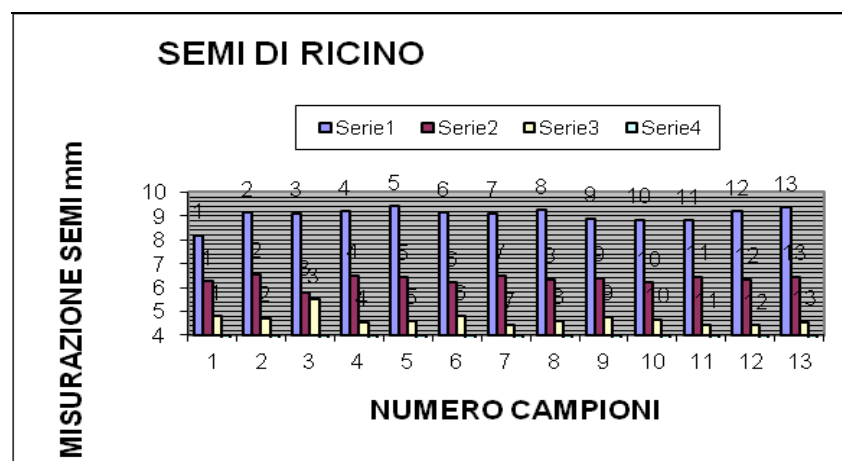
Figura 58 il test per ricina con la linea di controllo e quella di conferma presenza

Test	Sample type	Sample Treatment	Test Time	Dilution Waiting time	Sample
1	Control test powdered sampled by swab	/	10.10.2008		NEGATIVE
2	Homogenous internal seed pulp unprocessed	1 seed/ 1 ml of H ₂ O (lethal dose for children)	13.10.2008		POSITIVE
3	Homogenous internal seed unprocessed	1 seed/ 1 ml of H ₂ O (lethal dose for children)	13.10.2008	Dilution 1:40	POSITIVE
4	Homogenous internal seed unprocessed	1 seed/ 500 ml of H ₂ O (lethal dose for children)	17.10.2008		POSITIVE
5	Homogenous internal seed unprocessed	1 seed/ 1000 ml of H ₂ O (lethal dose for children)	20.10.2008		POSITIVE
6	Homogenous internal seed unprocessed	1/4 seed/ 1000 ml of H ₂ O	20.10.2008		POSITIVE
7	Homogenous internal seed unprocessed	1/4 seed/ 500 ml of analcolic drink	20.10.2008		POSITIVE
8	Homogenous internal seed unprocessed	1 seme/ 500 ml of H ₂ O	21.10.2008	Waiting time 36 hours	POSITIVE
9	Homogenous internal seed unprocessed	1/4 seme/ 1000 ml of H ₂ O	21.10.2008	Waiting time 24 hours	POSITIVE
10	Homogenous internal seed unprocessed	1/4 seed/ 1000 ml of H ₂ O	21.10.2008	Dilution 1:40 Waiting time 24 hours	POSITIVE
11	Homogenous internal seed unprocessed	1/4 seed/ 1000 ml of analcolic drink	21.10.2008		POSITIVE

Tabella 7 risultati delle analisi per la rilevazione di tossina ricinica

I risultati di positività si sono avuti utilizzando le *Biostrips* all'interno delle *camere a guanti* del laboratorio mobile, quindi in piena sicurezza per l'operatore, anche altre operazioni come l'*omogeneizzazione* dei semi sono avvenute in tale ambiente protetto anche per evitare le reazioni allergiche provocate da alcune sostanze presenti nei semi di *Ricinus*.

I risultati positivi, la facilità di utilizzo suggeriscono un utile uso di tali test sul campo.



PESI SPECIFICI DIFFERENTI PER MEDESIME DIMENSIONI

Figura 59 le misurazioni sui campioni di semi di *Ricinus communis*

4.7.6 ULTERIORI APPROCCI ANALITICI

Per le *analisi* che richiedono particolare attenzione, a causa della pericolosità degli agenti coinvolti e per le *analisi* su *virus* a RNA, laddove su questi, a causa della facilità di denaturazione di tale acido nucleico, risulta impossibile effettuare un'operazione di preventiva *sterilizzazione* in *autoclave*, i processi di *estrazione*, *retrotrascrizione* dell'RNA e preparazione dei campioni per l'*analisi* mediante real time-pcr ed anche l'*analisi* stessa, possono essere effettuati all'interno del sistema chiuso di *camere a guanti*, come già provato nell'ambito dei primi lavori congiunti con l'IZS delle Venezie di Legnaro su *virus* dell'*influenza aviaria* H(n)N(n).

Un ulteriore step di *analisi* potrebbe anche essere effettuato *sequenziando* le sequenze geniche maggiormente rappresentate all'interno del campione oggetto di *analisi*, sia con tecniche di *sequenziazione* classiche che con nuove tecniche (*deep sequencing*).

Nuovi sistemi di identificazione degli agenti biologici sono attualmente in via di sperimentazione.

4.7.7 PROBLEMATICHE (COMPARABILITA' E RIPRODUCIBILITA')

E' di particolare importanza la standardizzazione dei metodi di campionamento, purtroppo assai di frequente le metodologie non risultano confrontabili togliendo scientificità e valore ai risultati.

E' fondamentale altresì la sperimentazione di laboratorio, che verifichi l'efficienza di taluni metodi di campionamento.

Di grande rilievo è la considerazione della variabilità del dato dovuta all'operatore. Operatori diversi determinano infatti differenze di carattere anche quantitativo nel campionamento e la stessa cosa accade anche in ambito *analitico* ma con frequenza notevolmente inferiore, nella interpretazione dei dati di campionamento.

La sola *media* non rappresenta la popolazione o l'evento studiato. Uno dei parametri di maggiore importanza è quello della *variabilità* che caratterizza la *densità* della *popolazione* studiata.

Di seguito vengono descritti i 3 parametri statistici di base più comunemente adottati per la descrizione della variabilità, dell'eterogeneità e della densità di una popolazione:

- **la deviazione standard (s.d.):** distanza media delle diverse misure effettuate rispetto alla media del campione;
- **il coefficiente di variazione (c.v.):** $c.v.\%: (s.d./ media) * 100$;
- **l'errore standard (s.e):** $s.d./ \sqrt{n}$ di osservazioni.

Per la valutazione della variabilità del campione è bene considerare tra le altre cose:

- **la sua dimensione** (deve essere tale da comprendere un numero sufficiente di organismi/elementi per l'analisi statistica);
- **il numero di repliche** per ogni strato o superficie supposta omogenea (ciò al fine di abbassare la varianza).

4.7.8 COLLABORAZIONI CON ALTRI ENTI E PROGETTI

Le prime linee guida per i nuclei biologici dei Vigili del Fuoco sono state fornite dall'Esercito Italiano che in base ad accordi con il nostro Dipartimento ha organizzato, nel tempo, sia corsi di campionamento biologico, presso il Centro interforze di Rieti, sia corsi di microbiologia, biologia molecolare ed analisi biologica organizzati presso il Centro Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'Esercito di Roma.

La proficua collaborazione con l'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, instaurata in occasione delle Olimpiadi invernali del 2006, persiste a tutt'oggi, soprattutto in ambito territoriale ma anche nazionale (corsi di biologia molecolare ed analisi mediante p.c.r.).

I responsabili del settore biologico del nucleo N.B.C.R. del Comando di Venezia stanno, negli ultimi anni realizzando una serie di convenzioni/collaborazioni con enti che svolgono attività diagnostica e di ricerca nell'ambito di settori di interesse comune. Privilegiando l'ambito territoriale e sulla scia della positiva esperienza di lavoro congiunto durante il periodo olimpico a Torino (2006), si è voluto iniziare con la stipula di un accordo di collaborazione con l'IZS delle Venezie di Legnaro (PD), accordo sottoscritto dalle parti in data 25 ottobre 2007. A seguito di tale accordo, si è dato inizio ad una serie di incontri, sia al fine di formare il nostro personale, che di verificare la corrispondenza e la comparabilità dei risultati analitici ottenuti adottando gli stessi protocolli nonché le opportunità di utilizzo del sistema di *glove boxes* installato a bordo del laboratorio biologico mobile. Il nostro personale ha potuto inoltre, nel corso di tali incontri, essere formato e provare personalmente diverse strumentazioni e tecniche in uso presso i laboratori di diagnostica biomolecolare, quali il *sequenziamento* del DNA, la costruzione dei *primers* e la verifica di presenza di eventuali inibizioni (soprattutto proteica) mediante *spettrofotometria*. Essendo l'IZS di Legnaro referente nazionale per l'*influenza aviaria*, tutti i test sono stati effettuati su campioni contenenti il *virus H(n)N(n)*.

Il primo vero progetto di ricerca che ha interessato entrambi gli enti è stato realizzato nel 2011 ed ha comportato la verifica dell'attendibilità/accuratezza dei dati analitici ottenuti su piattaforme rt-pcr portatili come quella in dotazione al nostro laboratorio. E' importante anche registrare la proficua collaborazione con il

dipartimento di diagnostica microbiologica dell'IZS che, in sinergia con il nostro laboratorio, che fornisce una prima risposta rapida, fa seguire una risposta di tipo confermativo effettuando prove microbiologiche colturali per la verifica di presenza di *Bacillus anthracis*, *Brucella spp* e *Yersinia pestis*.

Una seconda collaborazione sta per essere sottoscritta dal nostro Comando con il Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova e con il Centro di ricerca interdipartimentale C.R.I.B.I., che, oltre a fornire un alto tutorato scientifico ai nostri operatori, interagirà presto con noi, anche in virtù della presenza presso i propri laboratori di strumentazione diagnostica estremamente evoluta per la gestione degli interventi biologici di maggiore complessità.

La possibilità di indagine data dai reagenti in nostro possesso permette attualmente di identificare i principali agenti batterici di interesse per la sicurezza pubblica compresi nelle classi 3 e 4 identificate all'interno del DLgs. 81/08 (ex Dlgs 626/94) (classe A Min. della Salute), delle più importanti *biotossine* e, presto dei più importanti *virus* inclusi nella classi 3 e 4.

La collaborazione con i precitati enti potrà in un futuro non lontano aumentare enormemente il nostro range e le nostre potenzialità diagnostiche, sia nel senso di una moltiplicazione dei target ricercati, sia attraverso un affinamento delle tecniche di *analisi biologica rapida*.



Figura 60 lavorazioni nei laboratori biologici di Venezia

CAPITOLO 5

IL LABORATORIO BIOLOGICO MOBILE SPERIMENTALE DEL NUCLEO NBCR VVF DI VENEZIA

Il Corpo Nazionale Vigili del Fuoco ha l'obbligo del primo intervento in caso di eventi in ambito civile che comportino rischi di tipo nucleare, chimico e biologico e, per quanto riguarda il rischio di tipo biologico, ha l'onere di fornire una prima risposta diagnostica veloce a carattere esclusivo e della trasmissione della stessa alle autorità competenti.

I quattro nuclei regionali avanzati N.B.C.R. di Roma, Venezia, Torino e Milano, si sono quindi dotati con l'intenzione di sperimentarne l'efficacia, di idonee strutture, ognuno con modalità leggermente differenti ma che garantiscano, attraverso l'analogia, la formazione congiunta ed infine, con l'acquisizione di una idonea strumentazione per la diagnosi veloce, la completa intercambiabilità del personale specialistico e la perfetta confrontabilità e ripetibilità dei *dati analitici*.

A tale proposito, nell'ottica di una gestione in massima sicurezza dell'evento ed in linea con la politica interventistica del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco (la maggior parte degli interventi VF deve infatti essere risolta entro poche ore), il nucleo regionale N.B.C.R. di Venezia ha progettato e realizzato, nell'anno 2007, un laboratorio biologico mobile di nuova concezione con all'interno strutture di contenimento di livello BSL III.

Scopo fondamentale del presente lavoro è di illustrare quanto realizzato negli ultimi anni con entusiasmo e tenacia anche per il mantenimento di una relazione di confronto con tutte le strutture di eccellenza e le competenze specialistiche presenti presso gli altri enti pubblici e privati col fine ultimo di una sempre migliore gestione dell'emergenza di tipo CBRN-e.

La valutazione delle necessità operative, dell'esigenza di sicurezza e l'analisi dei costi hanno portato alla progettazione e successiva realizzazione

nell'anno 2007, del primo laboratorio biologico mobile (BSL III) del CNVVF, presso il Comando Provinciale di Venezia.

Diverse sono le motivazioni che hanno portato alla progettazione del primo laboratorio biologico mobile, tra queste, e per prima, andrebbe citata la necessità di disporre di una struttura all'interno della quale svolgere in sicurezza il primo trattamento/verifica sui campioni ed il successivo primo *screening* di *analisi* nel corso di interventi sul territorio. In secondo luogo, si è considerato che il raggiungimento veloce dell'area limitrofa a quella dell'intervento (*zona verde*) e la collaborazione tra squadre di campionamento ed analisti, avrebbe influito positivamente, sia sugli esiti che sui tempi di risposta. In terzo luogo si potrebbe accennare alla esigenza di ottenere l'assoluta sicurezza degli operatori nel corso dell'intervento su sostanze sconosciute, poi ancora alla possibilità di lavorare, per la gestione di un evento, in sinergia con laboratori competenti pubblici o privati distribuiti sul territorio, anche raggiungendoli direttamente.

Il laboratorio è stato realizzato all'interno di un container standard di 20 ft, trasportabile su ruota, rotaia e nave che rappresenta un accettabile compromesso tra abitabilità e trasportabilità.

L'idea fondamentale e, se vogliamo innovativa di questo progetto, è stata quella di abbandonare la vecchia concezione di laboratorio biologico BSL III concepito, nel suo complesso, per la gestione dei patogeni infettivi più pericolosi per l'uomo, quelli appartenenti alle classi 3 e 4 ex Dlgs 626/94 (classe "A" dei CDC di Atlanta). Fino ad oggi si è infatti concepita tale tipologia di laboratori come strutture perfettamente isolate, mantenute in pressione negativa/positiva ed atmosfera controllata, con vari ambienti in gradiente continuo di pressione ed accesso di operatori muniti di pesanti D.P.I. e di sistemi per la respirazione; tali strutture, oltre ad avere costi di costruzione/gestione molto elevati, non risultano essere pratiche dal punto di vista della difficoltà di manipolazione dei campioni, dell'effettuazione delle *analisi*, della *decontaminazione* del personale, del limitato tempo di lavoro permesso agli operatori al loro interno, presentano inoltre notevoli inconvenienti aggiuntivi tra i quali, ad esempio, la necessità di verificare continuamente tenuta e pressione ed infine occupano spazi che, comprendendo precamere di ingresso, ambienti per vestizione/svestizione ed ambienti per la *decontaminazione*, risultano essere eccessivamente estesi. Partendo dal concetto

che l'unico strumento all'interno del quale sia possibile la manipolazione degli agenti patogeni più pericolosi in massima tranquillità è la *camera a guanti (glove box)*, la sola considerata come cappa di sicurezza biologica di classe III, l'idea è stata quella di concepire il cuore del laboratorio, anzi, il laboratorio biologico stesso, come un insieme interconnesso di *camere a guanti*, relegando il settore di massima sicurezza dell'intero laboratorio a quest'unica struttura, ciò allo scopo di risparmiare spazio prezioso, abbattere i costi di costruzione/gestione e manipolare più agevolmente i campioni. Il resto dell'ambiente interno al container risulta essere, in tale maniera, non potenzialmente contaminabile/contaminante e dunque non soggetto alle normative che sanciscono le caratteristiche di un laboratorio biologico di tipo BSL III. All'interno del container possono essere effettuate, dagli operatori, le più disparate operazioni ed *analisi* semplicemente indossando *camice* e *guanti* ed avendo come unico problema quello di non contaminare i campioni da analizzare.

La progettazione del laboratorio mobile è stata effettuata nel rispetto delle necessità imposte dalle procedure di primo *screening* sul campione, definite sulla base delle esperienze maturate nel corso degli ultimi anni, sia nell'ambito delle esercitazioni che degli interventi.

Vantaggi aggiuntivi sono senz'altro la possibilità di presenza in tempi veloci sul luogo dell'incidente e la risposta analitica rapida mediante l'utilizzo di strumentazione da laboratorio resa trasportabile.

Anno costruzione: 2007

Lunghezza: 6,60 m (20 ft)

Larghezza: 2,44 m

Peso: kg 5580

Categoria: BSL III



Figura 61 le caratteristiche del laboratorio biologico mobile

Scopi: manipolazione, conservazione ed analisi biologiche rapide in sicurezza su agenti patogeni anche in situazioni ambientali disagiate.

Il sistema integrato di *camere a guanti* consiste in tre *isolatori* (tipo *glove box*) indipendenti, intercomunicanti, consecutivi, a tenuta stagna, con l'interno in pressione negativa, dotati di *ultrafiltri* per l'aria in entrata ed uscita e *filtri a carboni attivi* per l'aria in uscita, di sistemi interni di *decontaminazione* e smaltimento dei rifiuti solidi/liquidi in sicurezza, uniti tra loro a formare un'unica apparecchiatura, progettati e realizzati secondo i dettami in materia presenti nel Dlgs 626 /94 (ora Dlgs 81/2008), in particolare per quanto riguarda l'art.81(misure specifiche per laboratori e stabulari). Il laboratorio di Venezia risulta essere, tra l'altro, il primo con queste caratteristiche, ad essere stato realizzato sul territorio nazionale.



Figura 62 il vano tecnico e a dx il sistema di espulsione dei rifiuti solidi non pericolosi

All'interno del laboratorio, nella *precamera di ingresso* (il settore laboratorio è separato dall'esterno mediante una *precamera* che funge anche da spogliatoio) sono presenti due armadi, per lo stoccaggio dei consumabili e dei reagenti, su un ripiano di uno dei quali trova alloggio un apparato radio e sul soffitto della precamera è presente una doccia. Nel *vano principale*, addossato alla parete sinistra è alloggiato un banco in acciaio per le analisi, sul quale è poggiata una *cappa statica da estrazione in plexiglass* (BSL I), sono inoltre presenti un frigorifero ed un congelatore (con *data logger* per la registrazione delle temperature) per reagenti e campioni, un ripiano estraibile per l'alloggiamento di un p.c., una cassettiera in acciaio, un lavandino con attiguo lavaocchi, un gruppo

di continuità UPG, un gruppo di condizionamento aria, una apertura verso l'esterno per l'espulsione dei rifiuti solidi non a rischio.

Visti gli spazi, piuttosto esigui, all'interno del laboratorio possono lavorare in modo ottimale due o al massimo tre operatori.

Sul retro del container è presente il *vano tecnico*, all'interno del quale sono alloggiati il gruppo elettrogeno, il sistema di distribuzione delle alimentazioni elettriche, i serbatoi dell'acqua, il compressore. Questo vano è stato opportunamente insonorizzato.



Figura 63 il sistema di isolatori BSL III Figura 66 l'interno della camera centrale

5.1 IL SISTEMA INTEGRATO DI GLOVE BOXES

L'*isolatore*, nel suo complesso, costituisce parte integrante del laboratorio biologico mobile e ne è la sezione BSL III, l'idea è stata infatti, come accennato, quella di limitare la sezione di massimo livello di sicurezza al sistema integrato di *glove boxes (isolatore)*, ottenendo in tal modo notevoli vantaggi dal punto di vista gestionale, di risparmio economico ed in termini di semplificazione delle operazioni. Gli *isolatori ermetici* infatti non permettono l'ingresso della contaminazione aerotrasportata dal circostante ambiente e quella veicolata dal personale, né consentono la fuoriuscita di contaminanti verso l'ambiente.

La struttura generale dell'*isolatore* è costituita da tre unità principali, indipendenti, intercomunicanti, consecutive, unite tra loro a formare un'unica apparecchiatura, le tre *camere* sono in comunicazione tra di loro e con l'esterno attraverso 4 portelli scorrevoli con interblocco e a comando pneumatico.

Tutte e tre le parti dell'isolatore, costruite interamente in monolitiche in acciaio inox AISI 316 di 3 cm di spessore, saldate di testa con procedimento TIG (all'esterno le saldature sono del tipo a giuntura piana), presentano superfici interne elettrolucide e superfici esterne satinata, con saldature interne ed esterne pulite e satinata, prive di sporgenze ed incavi per garantire le operazioni di decontaminazione ed angoli arrotondati.

Tutto il sistema è controllato mediante due quadri elettrici e l'intera struttura è munita di riduttori di vibrazione.

In basso, sotto le camere ed in corrispondenza di esse, sono situate tre vasche di contenimento in acciaio.

Le dimensioni per l'apparecchiatura sono le seguenti:

Dimensioni isolatore: mm. 3200 x 750 x 900 h

Peso complessivo: kg. 600

Dimensioni del supporto: mm. 2800 x 700 x 850 h

Le pareti delle tre sezioni sono apribili mediante incernieramento e blocco con sistema di morsetti rapidi, ciò al fine di accedere facilmente all'interno per bonifica/lavori.

La struttura poggia su un unico supporto realizzato in tubo a sezione quadrata di acciaio inox AISI 304 con piedi di appoggio regolabili, terminali antivibranti fissati alla struttura del container e riduttori di vibrazione.

Le pareti frontali delle tre sezioni sono realizzate in vetro di sicurezza trattato in autoclave, a doppio strato con interposta lamina di polietilene, dello spessore totale di circa 10 mm fissato alla struttura.

Tutti i passaggi di parete per le utenze sono stati realizzati mediante sistemi con flangia e ghiera filettata.

Particolare attenzione è stata riservata ai punti critici come angoli, bocchettoni per servizi, attacchi e supporti saldati, rendendoli sempre accessibili per essere puliti e decontaminati.

Tutti gli angoli interni alle sezioni sono arrotondati, con raggi di curvatura idonei a garantire un sufficiente livello di decontaminazione.

Gli attacchi, le connessioni e le strutture interne sono lisci, privi di incavi e di sporgenze, tutti gli spigoli vivi, parti taglienti o sbavature sono stati eliminati, al fine di ridurre al massimo l'eventualità di tagli sui *guanti*.

Le tre unità sono tenute in pressione negativa (20 mm H₂O) mantenuta mediante i *ventilatori centrifughi* di generazione della pressione negativa, l'unità posizionata sulla destra (rispetto all'operatore) o **PRECAMERA** è dedicata al passaggio dei campioni in ingresso verso l'unità centrale, **l'UNITÀ CENTRALE** (*camera a guanti vera e propria*), è più specificamente dedicata all'*analisi*, manipolazione e conservazione dei campioni di varia natura. Infine l'unità posizionata sulla sinistra **CAMERA ALLOGGIO AUTOCLAVE**, è predisposta per l'alloggiamento ed il funzionamento, anche durante il trasporto, di una *autoclave a recupero dei vapori* e permette il passaggio in entrata ed uscita dei campioni *autoclavati* e da *autoclavare*.

Il sistema è stato progettato in modo tale da garantire la massima semplicità d'uso, limitare e prevenire il contatto tra l'operatore e l'agente biologico, ed è stato realizzato mediante l'uso di materiali impermeabili ai liquidi e resistenti a qualsiasi corrosione che potrebbe essere innescata, sia per effetto dei campioni inseriti all'interno, sia a causa dei decontaminanti utilizzati. Inoltre l'*isolatore* è stato progettato in modo di rispondere a requisiti di resistenza strutturale in considerazione del fatto che si trova all'interno di un laboratorio mobile. Sulla parte frontale di vetro della struttura sono presenti undici *flange a sezione rotonda per guanti*, i *guanti fissi* sono in numero di otto, in neoprene, a manica lunga ed ambidestri, per permettere un agevole lavoro anche in presenza di un solo operatore. L'illuminazione dei tre vani interni, è assicurata da quattro *lampade al neon a tubo*, a luce fredda, inserite in gruppi illuminanti a plafoniera chiusa e protetta da copertura esterna in acciaio inox AISI 304, posizionati esternamente sulle pareti frontali.



Figura 64 lavorazioni e a dx un *filtro assoluto HEPA*

5.2 L'APPARATO FILTRANTE

Ci sono tre sistemi uguali e completamente indipendenti di filtrazione, in corrispondenza di ciascuna sezione, ciascun sistema è costituito da:

- 1) Un gruppo filtrante in ingresso, con *filtro di ingresso aria assoluto* di tipo HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), in grado di garantire un'efficacia del 99,97% sul filtraggio di particelle a partire da $0,3\ \mu\text{m}$.



Figura 65 particolari dell'interno del laboratorio

detto filtro è incombustibile e chiuso all'interno di un contenitore di protezione in pvc. L'aria in ingresso proviene dall'interno del laboratorio mobile, il quale, a tale scopo, è munito di un idoneo impianto di aerazione.

- 2) Un gruppo filtrante in uscita con *elettroaspiratore centrifugo* in acciaio inox AISI 304, *filtro assoluto* HEPA incombustibile, chiuso in un contenitore di protezione in acciaio inox AISI 304, con valvola a sfera di intercettazione flusso, collocato all'esterno del sistema ed un *filtro assoluto* HEPA interno, protetto da un contenitore di acciaio inox AISI 304.

E' presente un *manometro differenziale* per la verifica della pressione interna ed il controllo del filtro assoluto in uscita, con presa di pressione a monte ed a valle del filtro e tubazioni, tale *manometro* indica la caduta di pressione (ΔP) attraverso il filtro stesso e quindi il grado di intasamento dello stesso e l'opportunità di sostituzione.

- 3) Ognuna delle tre unità è inoltre fornita, in uscita, di *filtro a carboni attivi*, efficace nei confronti di gas o evaporati, posto all'interno di un contenitore di acciaio AISI 316, completo di valvola a sfera di regolazione del flusso, aspiratore centrifugo in acciaio inox AISI 304 con flangia per connessione a scarico. L'aria filtrata proveniente dagli ambienti interni al sistema di isolamento è convogliata direttamente all'esterno del laboratorio, attraverso un

sistema di tubi in pvc con scarico a parete (presente su tutte e tre le sezioni che risultano in tal modo completamente indipendenti).

5.3 LA DECONTAMINAZIONE DELLE CAMERE A GUANTI

All'interno dei tre settori, posizionate sulla parete superiore interna di ciascuna sezione, sono disposte tre *lampade UV*, una per ciascun ambiente, realizzate in costruzione a tenuta stagna antideflagrante, per la *decontaminazione* e la degradazione del DNA. Per quanto riguarda la *decontaminazione* vera e propria degli ambienti interni, sono presenti tre *pistole brandeggiabili a spruzzo* (tipo *spray-gun*), posizionate sulle pareti laterali delle camere con i relativi tubi. Le tre *pistole* pescano da una delle due *bombole* da 17 lt. contenenti una il *liquido di decontaminazione* (ipoclorito di sodio al 5 %) e l'altra *l'acqua per il lavaggio* successivo (l'ipoclorito di sodio rovina l'acciaio), le *bombole* hanno un attacco per l'aria compressa in entrata ed uscita e sono posizionate al disotto della *sezione precamera*.



Figura 66 la termosaldatrice e a dx la parte superiore di una camera con filtri e manometri

Tutti i liquidi di *decontaminazione*, i liquidi presenti nel campione e quelli utilizzati nelle operazioni all'interno dell'isolatore, sono drenati attraverso scarichi posti sul piano di lavoro delle camere e convogliati all'interno di un *serbatoio chiuso* in acciaio inox AISI 304, con innesti rapidi della capacità di 18 lt. I passaggi di parete, per ogni sezione, sono del tipo con giunto rapido e valvola di ritegno.

Il campione, raccolto e trasportato dalla squadra di campionamento, viene inserito all'interno del sistema attraverso una apertura comunicante con l'esterno, previa comunicazione mediante citofono ed autorizzazione da parte del personale presente all'interno del laboratorio. L'apertura da accesso alla *sezione di ingresso/uscita campioni* a sezione cilindrica che è una vera e propria *camera di trasferimento (pass box)*, al suo interno è presente un piano mobile di acciaio AISI 316, a spostamento manuale, scorrente su binari (privi di cuscinetti o rotelle per una migliore decontaminazione), che serve ad una più agevole traslazione dei campioni e dei materiali in ingresso e di due portelli con comandi pneumatici e muniti di sensore per l'interblocco che ne impedisce l'apertura simultanea.

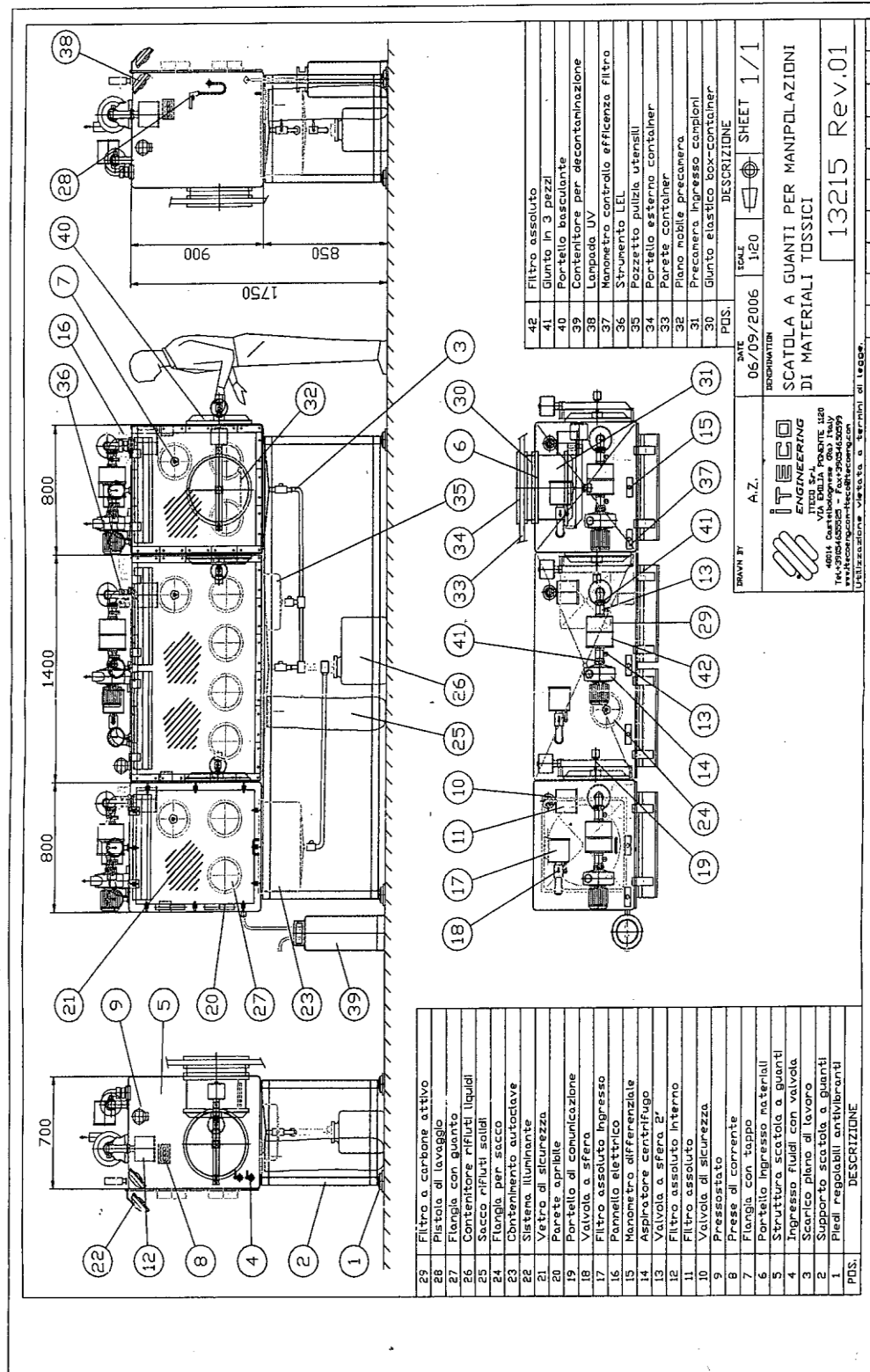


Figura 67 progetto dell'isolatore

5.4 LA PRECAMERA

E' munita di tre aperture di cui una in comunicazione con la *sezione centrale*, una in comunicazione con l'interno del laboratorio mobile, ed una in comunicazione con l'esterno del laboratorio, posizionata sul lato lungo di questo; il campione, una volta all'interno, viene quindi processato, aliquotato, pesato e testato nei tre ambienti. Gli schemi di procedura possono essere molteplici, si può infatti immaginare di voler confinare tutte le operazioni possibili alla *pass box*, laddove la particolare natura e/o pericolosità del campione ci indirizzasse verso tale soluzione, evitando così di contaminare le altre sezioni oppure, procedere cominciando a liberare il campione dalla serie di tre involucri utilizzati per il trasporto e spostandolo, attraverso il *portello scorrevole pneumatico* comunicante e munito di interblocco dalla *precamera* nella *sezione centrale*.

5.5 LA SEZIONE CENTRALE

Quella di maggiori dimensioni e specificatamente dedicata alla manipolazione del campione, al deposito temporaneo ed alle operazioni di pesatura (è presente un *piano stabilizzatore di pesata* per la *bilancia analitica* realizzato in acciaio inox AISI 316) e di aliquota dello stesso. Sulla parete di fondo della *camera centrale* sono state applicate due mensole per il deposito di vetrerie, utensili e campioni.

Tutte e tre le sezioni, al fine dell'utilizzo di strumentazioni al loro interno, sono munite di prese di corrente IP65, sono presenti inoltre ingressi per fluidi.

Sempre per ragioni di ottimizzazione degli spazi, è stato realizzato, sul piano di lavoro, un *pozzetto per le operazioni di decontaminazione* di strumenti, con scarico, valvola per il recupero dei liquidi e griglia forellata di copertura facilmente rimovibile, drenato sul fondo ed all'interno del quale sono contenuti tre vassoi in acciaio per lavorazioni varie, di misure tali da poter essere inseriti l'uno nell'altro.

La *sezione centrale* è munita di una stazione digitale per il controllo di temperatura e umidità relativa (*termoigrometro*), posizionata sulla parete superiore esterna della camera, con alimentazione a batteria e sonda di rilevazione posizionata all'interno della camera di lavoro, di sensori dello *strumento di rilevazione* L.E.L. (*Lower Explosivity Level*), che ha una centralina di visualizzazione esterna posizionata sulla parete interna del laboratorio e che serve ad avvisare qualora all'interno del sistema di camere a guanti si verificasse la presenza di sostanze o reazioni chimiche esplosive permettendo, in tal modo, sia di uniformarsi alle specifiche del già citato D.lgs 626/94 (ora Dlgs 81/2008) sia, in pratica, l'utilizzo, seppure con cautela, di solventi di vario tipo.

Le due sonde di captazione del L.E.L., tarate su etere e metano e la cella a O, collegate con una centralina, costituiscono il sistema di rilevazione per l'indicazione del livello di esplosività minimo significativo rilevato.

Nella porzione destra della camera centrale c'è la botola del sistema per lo scarico in sicurezza dei materiali di rifiuto solidi, con una flangia provvista di tappo. Il sacco per la raccolta dei rifiuti è collegato con doppia gola. Il sacco viene successivamente chiuso per lo smaltimento mediante una *termosaldatrice* posizionata a valle dello scarico, all'esterno della *glove box*.

La quota di campione che si vuole conservare “*in vivo*” per l'invio ad altri laboratori e soprattutto per le analisi di tipo colturale, potrà essere conservata in questo ambiente, ad esempio all'interno del citato *pozzetto*.

L'ultima *camera a guanti*, alla quale viene indirizzato il campione per la *sterilizzazione*, costituisce

5.6 LA SEZIONE DI ALLOGGIO AUTOCLAVE

All'interno di questa sezione trova posto, dentro un *pozzetto*, un' *autoclave* con capacità di 18 lt. Il coperchio dell' *autoclave* è stato modificato ed adattato per il recupero dei vapori, che vengono filtrati prima dell'emissione all'esterno del laboratorio, mediante un *ultrafiltro* (tipo HEPA resistente al vapore) ed un *filtro a carbone attivo*.

In questa sezione è anche presente, sulla parete di fondo, un ripiano ripiegabile a libro per l'effettuazione di operazioni diverse da quelle di *sterilizzazione*. Sulla parete sinistra della *sezione di alloggio per l'autoclave*, c'è un supporto per il posizionamento del coperchio dell'*autoclave* stessa durante le operazioni di carico e scarico della stessa.

5.7 PARETI SUPERIORI E PANNELLI DI CONTROLLO

Sulla parte superiore del sistema ed in corrispondenza di tutte e tre le sezioni, prendono posto gli *apparati di filtrazione*, i *manometri differenziali* per il controllo diretto della pressione d'esercizio (scala $-100/0/+100$ mm H₂O), le *valvole di sovrappressione* a sicurezza intrinseca che intervengono in caso di anomala pressione positiva interna con filtrazione assoluta, l'*apparato di controllo L.E.L.*, i *ventilatori* di generazione della pressione negativa.

I *pannelli di controllo* sono protetti con fusibili, interruttore generale, interruttore aspiratore, interruttore prese di corrente, sistema di autodiagnosi con avviso luminoso di sostituzione del filtro assoluto interno fissato a 200 ore di lavoro ed avviso luminoso di controllo generale e verifica tenuta della *glove box*, con reset a pulsante fissato ogni 500 ore di lavoro.

Il *pressostato* è munito di allarme per il controllo della pressione minima di sicurezza di esercizio.

Controlli di tenuta/manutenzione dell'*isolatore* vengono effettuati con cadenza annuale presso la ditta installatrice.



Figura 68 il portello esterno della *pass-box* e a dx l'interno della *pass-box*



Figura 69 l'autoclave e a dx l'interno del vano in cui è alloggiata

5.8 MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

L'operatore addetto al trasporto dei campioni raggiungerà il laboratorio biologico mobile, comunicherà via citofono con gli operatori presenti all'interno e quando questi apriranno automaticamente il *portello esterno*, avrà cura di sistemare il campione o i campioni all'interno del tunnel/precamera di introduzione (*pass-box*).

Chiuderà quindi il *portello esterno* facendo particolarmente attenzione alle manovre di chiusura dello stesso e comunicherà l'esito di tale operazione, sempre via citofono agli operatori che si trovano all'interno del laboratorio.

Il campione, introdotto all'interno dell'isolatore attraverso il tunnel di comunicazione con l'esterno, viene estratto dai tre contenitori di trasporto e l'operatore svolge sullo stesso una serie di operazioni in linea con una procedura standard ma che può subire delle variazioni in funzione della natura del campione stesso, ad esempio se si tratta di un campione di terriccio va disciolto in acqua per effettuare le analisi. Vengono poi effettuate tutte le operazioni di misura del campione (peso, dimensioni) ed i rilievi fotografici delle fasi di manipolazione e del campione stesso. La nostra procedura standard, peraltro sperimentale, prevede la preparazione di tre aliquote, delle quali una da lasciare "*in vivo*", che verrà inviata al laboratorio di diagnostica dell'IZS delle Venezie di Legnaro (PD) per le analisi microbiologiche (*Bacillus anthracis* e *Brucella ss.pp.*), le altre due, una per

il laboratorio biologico e l'altra per il laboratorio chimico dei Vigili del Fuoco vengono preventivamente *sterilizzate* in *autoclave* con un ciclo di 45 minuti a 120 °C ed 1 atm di pressione e quindi avviate all'*analisi*.

Un'ulteriore aliquota del campione rimane sempre "*in vivo*" all'interno della *glove box* a disposizione per qualsiasi ulteriore analisi disposta dalle autorità competenti.

5.9 LA STERILIZZAZIONE

Per *sterilizzazione* s'intende un procedimento ovvero una serie di processi chimico/fisici che impiegano metodologie standardizzate e definite, in grado di distruggere tutte le forme di *microrganismi* viventi presenti su un dato oggetto/superficie. Quindi suo peculiare obiettivo è l'eliminazione di ogni *microrganismo* vivente, patogeno o non patogeno, in fase *vegetativa* o *sporica*. Con il termine "*sterile*" si intende quindi la condizione in cui la sopravvivenza di un *microrganismo* qualsiasi sull'oggetto/superficie è altamente improbabile. Si deve ricordare che la *pastorizzazione* e l'*ebollizione* non sono metodi di *sterilizzazione* ma di *disinfezione* in quanto riducono il numero di organismi presenti ma senza sostanzialmente eliminarli.

La scelta del processo di *sterilizzazione* si basa sulle diverse caratteristiche dei materiali da trattare oltre che naturalmente sui diversi tipi di agenti coinvolti.

Per i campioni di natura biologica in genere si utilizza la *sterilizzazione in autoclave* con vapore sottovuoto.

I parametri fisici di *sterilizzazione in autoclave* (temperatura, pressione, umidità e tempo) devono essere raggiunti e mantenuti per un tempo sufficiente alla distruzione dei *microrganismi*. La pressione aumenta il punto di ebollizione dell'acqua, per tale motivo la temperatura di *sterilizzazione* aumenta in proporzione all'aumentare della pressione, la temperatura deve aumentare per garantire la distruzione dei *microrganismi* anche nelle fasi di resistenza e risulta efficace solo se mantenuta per un lasso di tempo sufficiente, chiaramente

maggiore è la temperatura e minore è il tempo di sterilizzazione, per ultimo il vapore deve essere saturo (100% di umidità relativa).

Esistono apposite tabelle nelle quali sono elencati tutti i rapporti da mantenere tra pressione temperatura e tempo per ottenere una *sterilizzazione* ottimale.

Nel nostro laboratorio si effettua un ciclo di *sterilizzazione* dei campioni in *autoclave* mediante vapore-calore-pressione, il ciclo è della durata di 45 min ad 1 atm e 121°C. Per controllare il corretto completamento del processo di *sterilizzazione* esistono 3 tipi di controlli:

Fisici – Chimici - Biologici

I **Controlli Fisici** sono effettuati con strumenti e sensori fissi posizionati all'interno delle apparecchiature (sensori di temperatura – pressostati ecc).

I **Controlli Chimici** utilizzano sostanze coloranti (inchiostri o cere) su un supporto in genere cartaceo, in grado di reagire agli stimoli fisici (pressione/calore/umidità) o chimici modificando il colore e/o la consistenza. Tali modificazioni presuppongono il raggiungimento ed il mantenimento, per un determinato tempo, dei parametri indicati. Per la *sterilizzazione in autoclave* i parametri sono: temperatura, tempo e vapore saturo.

Gli indicatori chimici si possono dividere in due tipi: **indicatori di processo** e **indicatori di sterilizzazione**.

Gli indicatori di processo sono sensibili ad uno o al massimo due parametri di *sterilizzazione*. Vengono usati fondamentalmente per distinguere visivamente il materiale *sterilizzato* da quello non *sterilizzato*, il cambiamento del colore deve essere uniforme su tutta la superficie dell'*indicatore*. **Gli indicatori di sterilizzazione** sono invece sensibili a tutti i parametri fisici di *sterilizzazione*, si utilizzano per verificare l'effettiva avvenuta *sterilizzazione*.

I **Controlli Biologici** consistono in preparazioni di *spore batteriche* non patogene, con alta resistenza come *Bacillus stearothermophilus* (per *autoclave*) o *Bacillus subtilis var. Niger* (per altri tipi di *sterilizzazione* es. *stufetta a secco*), la cui mancata sopravvivenza alle condizioni di *sterilizzazione* indica che il processo si è svolto correttamente. Le *spore* in questione sono disponibili in fiale con terreno di coltura o su strisce di carta.

Nel laboratorio di Venezia vengono utilizzati attualmente sistemi di controllo *fisici* e *chimici* ma è in programma l'acquisto di preparati per il controllo *biologico* al fine di effettuare uno *screening* con cadenza almeno trimestrale sul funzionamento dell'*autoclave*.



Figura 70 campioni autoclavati (notare gli indicatori di sterilizzazione a striscia e a nastro)

TEMPERATURA	TEMPO	PRESSIONE
STERILIZZAZIONE TOTALE AL 100 %		
121 °C	20 MINUTI	1 ATM
STERILIZZAZIONE TOTALE AL 110 %		
121 °C	30 MINUTI	1 ATM
STERILIZZAZIONE TOTALE AL 130 %		
134 °C	45 MINUTI	2 ATM

Tabella n.8 parametri di sterilizzazione in autoclave

I tempi ed i parametri di *sterilizzazione* del campione variano a seconda del campione da *sterilizzare*, per le forme *sporiche* più resistenti il ciclo può durare 30 - 45 min a 120-121°C ed 1atm.

I campioni vengono inseriti in *buste per autoclave* che permettono il processo di *sterilizzazione* ma non la contaminazione incrociata all'interno dell'*autoclave*.

All'interno delle *buste* e, se presenti, all'interno delle *provette*, si inserisce del *nastro indicatore di sterilizzazione* o delle *strisce indicatrici di avvenuta sterilizzazione*.

Se il colore sulle *strisce* o sul *nastro* vira al nero il processo di *sterilizzazione* è avvenuto correttamente.

.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE

6.1 CONSIDERAZIONI

Argomento di questa tesi è stata l'analisi, la progettazione e la proposta di sviluppo di un sistema integrato di campionamento ed analisi biologica veloce in situazioni di emergenza a seguito di eventi che coinvolgono sostanze sconosciute di tipo biologico.

Pur nelle difficoltà incontrate giornalmente per continuare ad operare in assenza di una reale strutturazione del sistema, il vantaggio dato dal poter effettuare qualsiasi tipo di sperimentazione sul campo ci ha sempre sorretto ed entusiasmato, portandoci a continuare il lavoro fatto finora.

La rivelazione biologica, purtroppo, è caratterizzata attualmente dalla risposta limitata ad alcuni target esclusivi, ma, ciò nonostante, è stato possibile sfruttare le tecnologie e le grandi opportunità fornite dalle collaborazioni con enti che si avvalgono di tecnologie e macchinari più avanzati rispetto a quelli che noi possediamo. Tali collaborazioni, ci hanno permesso di ottenere risultati non sperabili altrimenti, come per esempio la rilevazione, a seguito di un intervento, nell'anno 2012, del primo caso di positività biologica rilevata a seguito di un intervento dei Vigili del Fuoco sul territorio nazionale: all'interno del campione da noi prelevato ed analizzato, il Laboratorio di Diagnostica dell'IZS sperimentale delle Venezie di Padova ha potuto rilevare la presenza del batterio *Railstonia picketti* (patogeno opportunisto ospedaliero), isolato in purezza e con alta carica. Lo stesso, identificato mediante il sistema API Zone è stato successivamente inviato per conferma al Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Padova che ha dato ulteriore conferma di positività mediante l'effettuazione di antibiogramma.

Tale esperienza induce in realtà a vari spunti di riflessione, in primo luogo ci fa pensare alla necessità di non abbassare il livello di guardia in merito alla

possibilità, seppur remota, di incidenti che coinvolgano sostanze o agenti biologici e quindi ci induce a meditare sulle grandi possibilità offerte, e ancora tutte da scandagliare, da laboratori mobili BSL III.

Lo studio più approfondito delle possibilità di tali laboratori andrebbe fatto in collaborazione con personale medico e universitario, per la verifica di operabilità in situazioni ambientali disagiate e per la gestione, ad esempio, di eventi epidemici al fine di ottenere risposte e valutare la miglior abilità del sistema di risposta congiunto in caso di eventi anche catastrofici.

E' d'altra parte evidente che nel corso dello sviluppo di questa tesi, sono emerse diverse idee di possibili ampliamenti e miglioramenti e quindi il presente lavoro, vuole essere solamente l'inizio e lo spunto per successive riflessioni e progetti più specifici.

Il delicato e complesso campo di ricerca riguardante le tecniche di diagnostica rapida di agenti patogeni di interesse per la sicurezza pubblica, a tutt'oggi poco studiato, se non da alcune branche della ricerca sanitaria e militare, potrà e dovrà fornire, nel corso dei prossimi anni, spunti di lavoro e ricerca per tutti gli enti e gli organismi interessati, non prescindendo mai da una fattiva collaborazione tra gli operatori, che, oltre a permettere il raggiungimento degli obbiettivi prefissati, amplierà in maniera decisiva la possibilità di intervento in condizioni di emergenza, favorendo una sempre maggiore e capillare tutela delle persone e delle cose, tutela che fa parte dei precipui compiti del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco.

La qualità di una valutazione analitica è inoltre direttamente correlata sia alla qualità del campione, la qual cosa ci induce a continuare nel programma di potenziamento delle squadre di campionamento, anche attraverso una formazione appropriata del personale e studiando nuove metodologie, così come avvenuto in occasione delle già citate Olimpiadi Invernali di Torino del 2006, durante le quali si è potuto verificare sul campo un complesso meccanismo di campionamenti preventivi dei siti olimpici indoor e di analisi mediante p.c.r. classica e rt-p.c.r. in collaborazione con l'IZS del Piemonte.

Ulteriori verifiche di attendibilità e riproducibilità dei dati analitici da noi ottenuti sono state realizzate nel 2008, nel corso di una sperimentazione sulla rt-pcr portatile, per verificare la possibilità di impiego di tale strumentazione

portatile, direttamente sul campo, in occasione di epidemie animali. Tale progetto, che ha dato risultati positivi per la strumentazione di rivelazione biologica in nostro possesso, è stato effettuato in collaborazione con Il Laboratorio di Biotecnologie dell'IZS delle Venezie di Legnaro (PD).

Il presente lavoro, non intendeva trattare in maniera esaustiva la teoria del campionamento né le modalità di intervento in presenza di sostanze chimiche e biologiche e non ha la pretesa di sovrapporsi a studi di ecologia, epidemiologia e statistica, vuole, invece, fornire un'utile traccia ed utili degli spunti per successivi lavori e ricerche.

Una delle nostre speranze è anche la creazione, congiuntamente ad esperti provenienti da vari settori scientifici ed operativi, di un manuale unico per tutti i nuclei NBCR presenti sul territorio nazionale.



Figura 71 test in *cappa statica* per la ricerca di *tossine* in *matrice liquida*

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

7.1 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Alla luce dei notevoli risultati ottenuti perseguendo gli obbiettivi di un miglioramento delle procedure di campionamento ed analisi biologica veloce, in scenari operativi e condizioni di emergenza, nel ribadire la necessità di continuare con entusiasmo ed ottimismo il lavoro di sperimentazione intrapreso, ci preme a tal proposito sottolineare l'assoluta necessità di un processo di controllo e verifica sia per quanto concerne gli aspetti procedurali che per ciò che riguarda i dati analitici, prima della successiva validazione ufficiale e pubblicazione dei risultati.

Tutte le procedure di campionamento e di analisi biologica citate nel presente lavoro sono da considerarsi puramente sperimentali e non ancora validate né pubblicate.

E' fin troppo chiaro che tale processo di verifica di fattibilità, validazione, verifica delle criticità e dei punti di forza, dovrà trovare negli enti ed istituti di ricerca deputati (Università, ISS, CNR), il necessario supporto tecnico e scientifico, oltre agli opportuni suggerimenti per un indirizzo programmatico ben strutturato. A favorire queste operazioni contribuirà certamente l'apertura e la disponibilità del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco ai confronti ed alle critiche, peraltro già dimostrata in molteplici occasioni.

Ci preme, a conclusione del presente lavoro, fornire una serie di spunti per la continuazione della sperimentazione e dell'operatività.

In primo luogo rileviamo l'evidente necessità di un incremento tecnologico nella diagnosi e nella caratterizzazione degli agenti biologici (metodologie, strumentazione e nuove tecnologie efficaci per la rilevazione delle varie tipologie di possibili BWA), nell'ottica anche di una sempre maggiore sicurezza operativa e di un migliore controllo del territorio.

Della massima importanza sarebbe la strutturazione di una risposta congiunta da parte dei Vigili del Fuoco e del personale medico/sanitario (trattamento medico/profilassi, triage, trasporto e diffusione di vaccini/antibiotici, decontaminazione di ambienti e persone coinvolte).

In questo ambito non sarebbero inutili incontri formativi congiunti per condividere ed acquisire competenze nei settori di relativa specifica esperienza ed esercitazioni che portino ad una migliore gestione di situazioni di emergenza (*preparedness*) anche di eventi epidemici o pandemici.

E' di fondamentale importanza il mantenimento dei rapporti con gli altri *first responders*, (Esercito Italiano) scambiandosi competenze acquisite e suggerimenti.

L'attività dei *First Responders* necessita di un alto tutorato scientifico da parte di enti di ricerca ed università, al fine della validazione continua delle procedure e dei dati analitici oltre naturalmente al supporto formativo alle squadre ed ai tecnici, questi ultimi (medici, biologi, tecnici di laboratorio, psicologi), seppure nelle more di un inquadramento ufficiale andrebbero, con l'attribuzione di specifiche competenze ed incarichi in forma esclusiva (attualmente si attribuiscono agli stessi diversi incarichi anche di natura non congruente con il settore CBRNe), liberati da impegni che di fatto precludono una attività formativa e di ricerca a tempo pieno e continuo.

Una apposita preparazione a livello psicologico per il corretto approccio e la corretta gestione dell'evento CBRNe di tutto il personale (*first responders*) al quale è spesso richiesto uno sforzo lavorativo e psicologico notevole nelle fasi di intervento sia prima che dopo.

Sarebbe inoltre necessaria la previsione di modelli di comunicazione esterna con le autorità, con i media e con la popolazione nel corso e nella fase successiva agli interventi stabilendo con precisione:” *chi è di volta in volta autorizzato a comunicare cosa*”, le giuste modalità i mezzi ed i limiti.

E nella fase post-intervento strutturare meglio e regolamentare una catena di custodia dei campioni con la previsione e la progettazione di specifici siti di conservazione e documentazione del campione anche ai fini di una corretta gestione anche dal punto di vista legale.

A livello interventistico si suggerisce in questa sede di dare un maggiore risalto, seppure con i limiti imposti attualmente dalla strumentazione in commercio, alla identificazione rapida sul campo da parte delle squadre NBCR, identificazione che sarebbe utilissima a risolvere particolari situazioni (blocco di servizi, uffici, infrastrutture). Tale eventualità è attualmente al vaglio da parte del CNVVF e presto ci sarà una fase di sperimentazione in tal senso.

Anche il miglioramento delle operazioni di decontaminazione delle attrezzature e del personale sarebbe assolutamente necessario.

Nell'ambito dell'implementazione ed addestramento periodico delle squadre NBCR al campionamento ed alla decontaminazione con la revisione e correzione e successiva diffusione del manuale di campionamento per le squadre, alla stesura del quale potrebbe partecipare anche personale non appartenente al CNVVF. Ma proveniente dai settori della ricerca e della sanità..

La gestione migliorativa delle più evidenti criticità del sistema, sia di carattere operativo e procedurale che a livello logistico e formativo, è attualmente oggetto di studio e monitoraggio da parte degli organi ministeriali deputati anche attraverso l'istituzione di apposite commissioni e gruppi di lavoro.



Figura 72 personale all'interno del laboratorio

RIFERIMENTI NORMATIVI

Per la realizzazione e la gestione del laboratorio e per tutte le altre attività di campionamento ed analisi descritte nel presente lavoro si sono rispettate e si è costantemente fatto riferimento alle normative e agli standard disponibili, ed in particolare:

- **ISO 14644-7 2005 (UNI EN ISO 14644-7 2005);**
- **En 1050- En 292-1-2 ;**
- **En 349- En 294;**
- **En 60204;**
- **Legge 13 maggio 1961, n. 469;**
- **Legge 27 dicembre 1941, n° 1570;**
- **Legge 7 agosto 1990, n. 241 (accordi tra pubbliche amministrazioni);**
- **D.lgs. 217 del 13/10/2005;**
- **DPR 459/96;**
- **DLgs 626/94 (ora DLgs 81/2008);**
- **Circ. N. 16 Min. Sanità del 20/07/1994;**
- **D.M. Lavoro e Previdenza Sociale n. 226 del 02/05/2001;**
- **D.M. Lavoro e Previdenza Sociale n. 209 del 08/09/2001;**
- **D.M. Ministero del Lavoro e Previdenza Soc Suppl. Ord. N. 226 (DPI);**
- **Circ. n. 3 Min. della Salute del 08/05/2003 (conf. Campioni);**
- **Circ. n. 6, Min. Interno del 22/05/02;**
- **Circ. M.Interno Dip. VV.F. Prot. n. 998/5635 del 19 marzo 2007** (Influenza aviaria – Indicazioni Tecniche per interventi a sostegno del piano di emergenza per l'estinzione di focolai di influenza aviaria – Manuale operativo);
- **Bozza al 2/1/04 della Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento della Protezione Civile.** “Pianificazione della risposta sanitaria al rilascio intenzionale di materiale radiologico e Nucleare”;
- **Bozza al 2/1/04 della Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento della Protezione Civile** “Pianificazione della risposta sanitaria al rilascio deliberato di spore di *Bacillus anthracis*”;
- **Ordinanza del Presidente del Consiglio dei Ministri n. 3275/2003,** “Disposizioni urgenti di protezione civile per fronteggiare l'emergenza derivante dalla attuale situazione internazionale”;
- **Direttiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo del 18 settembre 2000** relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

BIBLIOGRAFIA

[B1 Raven] Raven Peter H., Evert Ray F., Helena Curtis – “ Botanica Generale e Diversità Vegetale” - (1^aed. italiana) Zanichelli, 1984

[B2 FOA] Swedish National Defense Establishment (FOA) – “Briefing Book on Biological Weapons”, 1995

[B3 - Str] Lubert Stryer – “ Biochemistry” – International Student Edition – W.H.Freeman and Co. New York, 1987

[B4-Gesu] Giovanni Gesu – “ Pocket di Microbiologia Clinica” – Ed. Interaction Milano, 2009

[B5-Gil] R.R.Gillies e T.C. Dodds – “ Batteriologia Illustrata” – Ed. Il Pensiero Scientifico (2^a ed. italiana), 1968

[B6-Ster] Luciano Sterpellone – “ I Virus (dal Vaiolo alla SARS, dall’AIDS alla guerra batteriologica)” – Newton Compton Ed. Roma, 2004

[B7-ISPEL] ISPEL – “ Manuale di Sicurezza nei laboratori” – ed. in lingua italiana 3^a edizione, 2005

[B8-Pyat] K. Piatkin, Yu. Krivoshein – “Microbiology” – ed. In lingua inglese, 2^a ed. Mir Publishers .Moskow, 1990

[B9-Carson] Jake Carson – “Bioterrorismo e Armi Chimiche” – Piemme Pocket Casale Monferrato (AL), 2003

[B10-IDec] Ivo De Carneri – “Parassitologia Generale ed Umana” – Ed. Ambrosiana Milano 9^a Ed., 1986

[B11-LS] Manuela Monti e Carlo Alberto Redi – “ Il futuro prossimo della vita sintetica” – in Le Scienze (ed. italiana di Scientific American) nr 537 maggio 2013 pg. 50-57 <http://www.lescienze.it>

[B12-LS1] Sonia Shahi – “Nuova minaccia dai poxvirus” – in Le Scienze (ed. italiana di Scientific American) nr 537 maggio 2013 pg. 84-89 <http://www.lescienze.it>

[B13-DTS] Autori Vari – “Dizionario Enciclopedico dei Termini Scientifici” della Oxford University Press – Dizionari Rizzoli BUR edizione italiana, 1990

[B14-OPCW]A.K.Datta, C.Eon, S. Furusaki, B. Goupy, G. Griffiths, T.D. Inch, L. Weimin, M. Lord, A.A. Mohammadi, T.Oda, A.Shafiee, K.K.Srivastava, W. Tyszkiewicz, S.Witek – “3rd Meeting of the Temporary Working Group on Sampling and Analysis – Working Group on Ricin – Documents” – O.P.C.W. –The Hague, November 2008

[B15-HDA] Headquarters Department of The Army – Field Manual NO. 4-02.7 (8-10-7) Health Service Support in a Nuclear Biological and Chemical Environment Tactics, Techniques and Procedures – U.S.A. Army Headquarters Dept – Washington D.C., 1 October 2002

[B16-BRS] R.D. Barnes – “Zoologia Gli Invertebrati” Ed originale “Invertebrate zoology” by W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1963, 1968 – Ediz. Italiana Piccin editore Padova, 1972

[B17-RPD] AA.VV. – “R.A.P.I.D. Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device System Operator Manual” – Rev. 03 – Idaho Technology Inc – Salt Lake City UT. U.S.A., 2003.

[B18 - CSL] Casula D. ed altri – “Medicina del lavoro” - Monduzzi Editore. Bologna. 1993.

[B19 -CHC] Checcacci L - “Medicina preventiva e igiene” - CEA, Milano. 1981

[B20 -WJ] Warren E. Levinson Ernest Jawetz – “Medical Microbiology & Immunology – Examination & Board Review” – Ed. Appleton & Lange Medical Books – third edition (international edition) – East Norwalk – CT – U.S.A. 1997

[B21-ISPEL2] ISPEL – Min. Interno Dip. Vigili del Fuoco “Indicazioni tecniche per interventi a sostegno del piano di emergenza per l’estinzione di focolai di influenza aviaria” – gennaio 2007

[B22-USAM] U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases – “USAMRIID’s Medical Management of Biological Casualties Handbook” – Fort Detrick Frederick Maryland U.S.A. – Fourth edition, February 2001

[MAN04A] Tesi di Andrea Mancini, Sito di E-learning per il corso di Tecnologie Web 2004

SITI WEB DI INTERESSE

SITO CDC DI ATLANTA – Georgia U.S.A.
CDC Centers for Disease Control and Prevention
Website: <http://www.cdc.gov>

BioFire Diagnostics (formerly Idaho Technology): RAZOR® EX
Website: <http://www.biofiredx.com>

BioFire Diagnostics (formerly Idaho Technology): R.A.P.I.D.®
Website: <http://www.biofiredx.com>
www.idahotech.com

Bibliografia

IZSPB – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata –
Foggia – **Centro di riferimento italiano per il Carbonchio**

Website: www.izsfg.it

IZSPB – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia
“Bruno Ubertini” Pavia – **Centro di riferimento italiano per la Tularemia**

Website: www.izsfg.it

IZSPB – Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise
“Giuseppe Caporale” – Teramo – **Centro di riferimento italiano per la
Brucella**

Website: www.izsfg.it

IZSPB – Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Legnaro –
Padova

Website: www.izsvenezie.it

Website IATA PI 602, per l'imballo/spedizione campioni: <http://www.iata.org>.