**Dipartimento dei Vigili del Fuoco Soccorso Pubblico e Difesa Civile**

# *SCHEMA ORGANIZZATIVO PER I NUCLEI INTERVENTO NBCR OLIMPIADI INVERNALI TORINO 2006*

**Premessa**

I Giochi Olimpici costituiscono certamente uno dei più grandi e complessi eventi di risonanza mondiale, che vanno ben oltre l'avvenimento sportivo per assumere una fisionomia e una dimensione culturale, sociale, mediatica. Tali ragioni impongono pertanto di predisporre un complesso e capillare piano di soccorso tecnico urgente, che la situazione straordinaria richiede, per la salvaguardia delle persone coinvolte in situazioni incidentali, nonché la salvaguardia ambientale.

**Introduzione**

Nel presente documento verrà illustrata l'attività NBCR che verrà svolta dal CNVVF, con il coordinamento del Comando Provinciale di Torino, durante le Olimpiadi invernali 2006. Scopo del presente studio è individuare le esigenze connesse allo svolgimento dei Giochi Olimpici, al fine di disporre le risorse atte a fronteggiare l'insorgere di eventuali situazioni di rischio.

**Siti interessati**

I Giochi Olimpici si svilupperanno nella Città di TORINO e nelle Valli SUSA e CHISONE;
tali valli risultano particolarmente strette e con un'unica via di scorrimento, sono caratterizzate da elevata densità di popolazione e dalla presenza di numerosi insediamenti abitativi.

Nel complesso saranno realizzati 14 Siti competitivi e 17 Siti non competitivi tra cui 3 villaggi olimpici, che interessano il territorio di 9 Comuni.

- 9 Comuni sede di gara: Torino, Bardonecchia, Cesana, Pinerolo, Pragelato, Sauze d'Oulx, Sestriere, Claviere e Torre Pellice.
- 3 Villaggi Olimpici: Torino, Bardonecchia e Sestriere.

Le gare si svolgeranno "all'aperto" nei siti montani ed all'interno delle seguenti "strutture coperte":

- Palasport Olimpico;
- Padiglione 3 Palazzo Expo;
- Palavela;
- Oval Lingotto;
- Palaghiaccio (Pinerolo).

Inoltre saranno previste delle sedi non competitive per allenamenti:

- Claviere,
- Palazzetto Corso Tazzoli (TO);
- Palazzetto Torre Pellice;

ed infine delle sedi per le cerimonie:

- Stadio Olimpico – Torino;
- Medal Plaza - Piazza Castello.

La distribuzione delle varie discipline sportive sul territorio della Provincia di Torino rendono complesse le procedure organizzative dei soccorsi, per il continuo migrare dei flussi di operatori addetti alle manifestazioni, di atleti e del numeroso pubblico.
La complessità viene inoltre accentuata dalle condizioni climatiche e ambientali, dalla viabilità che si snoda per gran parte su un territorio montano.

***Luoghi sensibili individuati.***

Tra i vari siti interessati dalle manifestazioni sportive e dalle gare si ritengono i seguenti particolarmente delicati ai fini della sicurezza pubblica e della difesa civile:

- n° 5 siti cittadini "al chiuso" (Palavela, Lingotto, Palaghiaccio –Pinerolo-, Palasport)
- n° 6 siti "all'aperto" (Cesana, Sansicario, Sestriere, Pinerolo, Bardonecchia, Torino)
- n° 2 siti per le cerimonie ( Piazza Castello, Stadio Olimpico di Torino)

**I Rischi**

I rischi presi in considerazione nell'ambito di specifico interesse sono in sintesi:

-la minaccia biologica (B), consistente nella diffusione nell'ambiente di agenti biologici di vario genere (virus,batteri, funghi, tossine, ecc.);

Gli scenari ipotizzabili sono riconducibili al sabotaggio di impianti di distribuzione o della catena alimentare, ovvero alla contaminazione di materiali o animali, ovvero ancora la diffusione in zone affollate (edifici pubblici, mezzi di trasporto, ecc. anche attraverso persone in grado di portare il contagio.

Pur ritenendo tale ipotesi molto remota, si ritiene necessario porre in essere attività di tipo preventivo con la disponibilità di apparecchiature idonee a rivelare la presenza di agenti biologici.

-la minaccia chimica (C), consistente nella deliberata diffusione nell'ambiente di composti chimici o miscele di essi in grado di produrre gravi danni per la salute, sia per inalazione di sostanze allo stato aeriforme, sia per l'assorbimento cutaneo, sia eventualmente per ingestione di acqua o viveri contaminati.

Gli scenari ipotizzabili nella circostanza sono riconducibili alla diffusione di tali sostanze in luoghi chiusi e/o affollati quali i vari stadi durante le competizioni , i villaggi e le grandi infrastrutture, ovvero lo sfruttamento della circostanza della presenza di ammoniaca in grande quantità nella pista di bob, slittino e skeleton di Cesana Torinese, ovvero in piccola quantità al Tazzoli, provocandone la fuoruscita.

In tal caso, e considerando tale ipotesi la meno remota, si ritiene debbano essere pianificati nel dettaglio gli scenari riferiti ai singoli obiettivi ritenuti sensibili prevedendo la concreta dislocazione sul territorio di squadre di soccorso tecnico urgente e sanitario addestrate ed equipaggiate e la disponibilità di strutture mobili di decontaminazione, secondo il modello in allegato ;

-la minaccia radiologica (R) e nucleare (N), consistente nella deliberata diffusione dell'ambiente di materiali radioattivi o nucleari in grado di arrecare danni all'uomo (attraverso irradiazione corporea esterna causata da sorgenti gamma emittenti, oppure alla contaminazione interna attraverso l'inalazione o l'ingestione delle sostanze radioattive) o alle cose.

Considerando anche questa ipotesi molto remota si ritiene necessario porre in essere misure di tipo preventivo quali il compimento di attività di controllo puntuale (bonifica dei siti, controllo dei frequentatori degli stessi) con idonee apparecchiature.

**Attività**

Le attività previste per le squadre NBCR sul territorio in occasione delle Olimpiadi sono:

1. Soccorso tecnico nel campo chimico, biologico e radiologico. Queste attività comprendono la fase di individuazione della problematica, decontaminazione, recupero persone coinvolte, messa in sicurezza ed eventuale bonifica.
2. Campionamento/monitoraggio preventivo nel campo chimico, biologico e radiologico.

**Concetti operativi per l'intervento dei Nuclei NBCR**

Il personale dei vigili del fuoco durante la manifestazione olimpica dovrà assicurare il soccorso ordinario e "straordinario" , il monitoraggio ambientale ed il servizio di vigilanza.

Le squadre NBCR dedicate al monitoraggio ambientale saranno composte da personale più o meno specializzato a seconda dei compiti ad esse assegnati. Infatti il personale formato a livello più alto si occuperà dell'utilizzo di sofisticate apparecchiature (gascromatografo-spettrometro di massa, Rapid, spettrometri gamma, rilevatori di neutroni etc.) e sarà a disposizione per la gestione e conduzione di interventi specifici nel campo chimico-biologico-radiologico.

A tal fine è prevista la presenza di 2 nuclei risolutivi di livello III regionali dislocati uno in montagna e l'altro in città con raggio di intervento di max 50 km; 6 nuclei di primo intervento di livello II Provinciale dislocati 2 in città, 2 a metà valle e due in alta montagna, tutti nel raggio 5-15 km; 1 nucleo di primo intervento di livello II Provinciale dislocato in aeroporto; 30 squadre base livello I distribuite su 18 sedi; 3 nuclei sono dislocati presso sedi anche base di nucleo elicottero e quindi elitrasportati.

**Pianificazione dislocazione e composizione squadre NBCR**

Tutte le squadre che interverranno per le attività NBCR lavoreranno su turni di 24 ore .

Di seguito è riportata una tabella riassuntiva della composizione, in termini di mezzi e persone, delle squadre NBCR da impiegare per le suddette attività.

## DETTAGLIO DISLOCAZIONE E COMPOSIZIONE NUCLEO NBCR
(calcolo per turno di servizio)

| SEDE | TIPOLOGIA SQUADRA | LIV. UNITA' | CONVOGLIO | | UNITA' DISPONIBILI COMANDO TORINO PER TURNO | | UNITA' NECESSARIE DA ALTRI COMANDI PER TURNO | | UNITA' TOTALI NECESSARIE PER OLIMPIADI PER TURNO | | | MEZZI AGGIUNTIVI DA ALTRI COMANDI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | LIV 2° | LIV 3° | LIV 2° | LIV 3° | LIV 2° | LIV 3° | TOT | |
| CENTRALE | 1 Squadra Regionale | 2°/3° | 1 UCL<br>1 CA/DECO<br>1 AF/NBC<br>1 AF/DPI<br>1 Shelter DECO<br>1 AF/LAB. BC<br>1 AV/Doblò | 2<br>2<br>3<br>2<br>2<br>2<br>2 | 4 | 1 | 4 | 6 | 2<br>1<br>0<br>1<br>0<br>2<br>2 | 0<br>1<br>3<br>1<br>2<br>0<br>0 | 15 | • 1 Shelter DECO<br>• AV/Doblò |
| | Funzionari NBCR | 3°Oper | Autoradio | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | • Autoradio |
| | Operatore NBCR | 3° | Sala Operativa | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | |
| | Rilev. B | 3° (BC) | • AV/Doblò<br>• 1 AF/LAB BC | 2<br>2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 | 4 | • AV/Doblò<br>• 1 AF/LAB BC |
| | Rilev. C | 3° (BC) | • AV/Doblò<br>• AV/Doblò | 2<br>2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 | 4 | • AV/Doblò<br>• AV/Doblò |
| | Rilev. NR | 3°/2° (NR) Squadre speciali | • AF/NR<br>• AF/CRCC<br>• AV/Doblò<br>• CA/PickUp | 2<br>2<br>2<br>2 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | 8 | 8 | • AF/NR<br>• AF/CRCC<br>• AV/Doblò<br>• CA/PickUp |
| TORINO CENTRO | 1 Squadra Provinciale | 2° | • 1 AF/NBC | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | • 1 AF/NBC |
| LINGOTTO | 1 Squadra Provinciale | 2° | • 1 AF/NBC | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | • 1 AF/NBC |
| CASELLE AEROPORTO | 1 Coord. | 3° | • 1 AF/NBC | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0 | 1 | In assegnazione |
| SUSA | 1 Squadra Provinciale | 2° | • 1 AF/NBC | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | • 1 AF/NBC |
| | Funzionario NBCR | 3°dir | • Autoradio | 1 | 0 | 1 ** | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | • Autoradio |
| PINEROLO | 1 Squadra Provinciale | 2° | • 1 AF/NBC | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | • 1 AF/NBC |
| SALBERTRAND | 1 Squadra Regionale dec | 3° | • UCL<br>• Shelter DECO | 2<br>2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 1<br>1 | 1<br>1 | 4 | • UCL<br>• 1 Shelter DECO |
| | 1 Squadra Provinciale | 2° | • AF/NBC | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | • AF/NBC |
| SESTRIERE | 1 Squadra Provinciale | 2° | • AF/NBC | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | • AF/NBC |
| GRANGE SISES | 1 Squadra Regionale op | 3° | • CA/DECO<br>• AF/NBC<br>• AF/DPI | 2<br>3<br>2 | 1 | 0<br>1<br>0 | 1 | 4 | 1<br>0<br>1 | 1<br>3<br>1 | 7 | • CA/DECO<br>• AF/NBC<br>• AF/DPI |
| | Funzionario NBCR | 3°Oper | Autoradio | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | • Autoradio |
| TOTALI | | | | | 9 | 16 | 18 | 24 | 33 | 32 | 63 | |

*Necessità e disponibilità personale, mezzi e strumentazione.*

Personale:

| Funzione | Personale | Comando | Specializzazione |
|---|---|---|---|
| Monitoraggio Chimico | 8 unità (2 turni) | 2 Venezia<br>2 Firenze<br>2 Torino<br>2 Roma | Specializzazione campionamento e analisi Chimiche |
| Monitoraggio Biologico | 8 unità (2 turni) | 2 Venezia<br>2 Milano<br>2 Roma<br>2 Torino | Specializzazione campionamento e analisi Biologiche |
| Monitoraggio N,R | 16 unità (2 turni) | 3 Lab. dif. Atomica<br>2 Vercelli<br>2 L'Aquila<br>2 Piacenza<br>2 Pavia<br>2 Pisa<br>2 Genova<br>(2 Trento) | Specializzazione campionamento e analisi Radiologiche |
| Nucleo Regionale Città | 20 unità (2 turni) | 6 Torino<br>4 Venezia<br>4 Milano<br>4 Firenze<br>2 Trieste | 3° livello operat. |
| Nucleo Regionale Montagna | 16 unità (2 turni) | 4 Torino<br>4 Roma<br>4 Bologna<br>2 Genova<br>2 Perugia | 3° livello operat. |
| Nucleo Regionale Città | 12 unità (2 turni) | 4 Torino<br>4 Cuneo<br>4 Alessandria | 2° livello operat. |
| Nucleo Regionale Montagna media | 12 unità (2 turni) | 4 Asti<br>4 Biella<br>4 Verbania | 2° livello operat. |
| Nucleo Regionale Montagna | 12 unità (2 turni) | 2 Vercelli<br>4 Novara<br>4 Savona<br>2 Verbania | 2° livello operat. |
| Aereoporto | 12 unità (2 turni) | 12 Torino (pers. Aeroportuale formato) | 2° livello operat. |
| Coordinamento | 4 unità (2 turni) | 1 Milano<br>1 Novara<br>1 Vercelli<br>1 Alessandria | 3° livello diret. |
| Coordinamento | 4 unità (2 turni) | 1 Venezia<br>1 Milano<br>1 Roma<br>1 Trieste | 3° livello operat. |

Mezzi

Per quanto riguarda i mezzi disponibili e la possibile provenienza da altri Comandi si propone quanto segue:

| VEICOLI | Quantità | PROVENIENZA COMANDI |
|---|---|---|
| Shelter Deco | 1 | Venezia |
| Shelter Deco | 1 | Milano |
| Laboratorio mobile chimico/biologico | 1 | Venezia |
| Laboratorio mobile chimico/biologico | 1 | Torino |
| AF/DPI | 1 | Milano |
| CA/DECO | 1 | Milano |
| CA/DECO | 1 | Torino |
| AF/DPI | 1 | Torino |
| AV/Doblò | 1 | Torino |
| AV/Doblò | 1 | Venezia |
| AV/Doblò | 1 | Milano |
| AV/Doblò | 1 | Roma |
| AF/NR | 1 | Roma |
| UCL | 1 | Torino |
| UCL | 1 | Milano |
| AF/Nbc | 1 | Torino |
| AF/Nbc | 1 | Venezia |
| AF/Nbc | 1 | Milano |
| AF/Nbc | 1 | Roma |
| AF/Nbc | 1 | Firenze |
| AF/Nbc | 1 | Bologna |
| AF/Nbc | 1 | Genova |
| AF/Nbc | 1 | Alessandria |
| AF/Nbc | 1 | Vercelli |
| AF/Nbc | 1 | Cuneo |
| Autoradio | 1 | Venezia |
| Autoradio | 1 | Milano |
| Autoradio | 1 | Vercelli |
| Autoradio | 1 | Novara |

Strumentazione

Per sostenere l'attività di monitoraggio biologico i Comandi di Milano, Torino e Venezia parteciperanno come segue:

- Il Comando di Venezia con il laboratorio mobile dotato di gas-massa e PCR
- Il Comando di Torino con il laboratorio mobile dotato di gas-massa in corso di allestimento.
- Il Comando di Milano con la PCR alloggiata sul laboratorio mobile del Comando di Torino)

La suddetta attrezzatura sarà utilizzata il più possibile in maniera "campale" al fine di testarne l'efficienza, perfezionare le tecniche e le procedure necessarie al futuro impiego nell'ambito del soccorso tecnico urgente.

**LINEE GUIDA OPERATIVE PER PREVENZIONE RISCHIO BIOLOGICO**

Il comando di Torino ha proposto di effettuare analisi in collaborazione con l'Istituto di Zooprofilassi al fine di affinare e verificare le tecniche di utilizzo della macchina PCR, avvalendosi delle competenze specifiche del personale qualificato dell'istituto.

Da studi effettuati dall'Istituto Zooprofilattico di Torino è emersa la necessità, per effettuare un monitoraggio biologico significativo, di prelevare e analizzare circa 40 campioni in un arco temporale di 48 ore sui siti (o macrozone) individuati come potenzialmente sensibili (sono previsti circa 4-5 campioni per macrozona).

**Obiettivo:**

- Sorveglianza dei siti olimpici al coperto finalizzata al monitoraggio delle condizioni ambientali relativamente alla presenza di germi patogeni potenzialmente utilizzabili in episodi di bioterrorismo;

**Campo di applicazione**

Siti olimpici da monitorare:

- Oval Torino Lingotto
- Palavela Torino
- Torino Esposizioni
- Palaghiaccio di Pinerolo
- Palasport olimpico - Hockey 1

**Tipologia del controllo**

Monitoraggio ambientale dell'aria di ricircolo, mediante determinazione analitica dei quattro agenti biologici considerati su materiale filtrante removibile appositamente predisposto.

**Dispositivi di campionamento**

La scelta e la collocazione del materiale filtrante sono state effettuate in seguito a sopralluoghi congiunti con i progettisti degli impianti di climatizzazione dei siti olimpici. Sono stati presi in

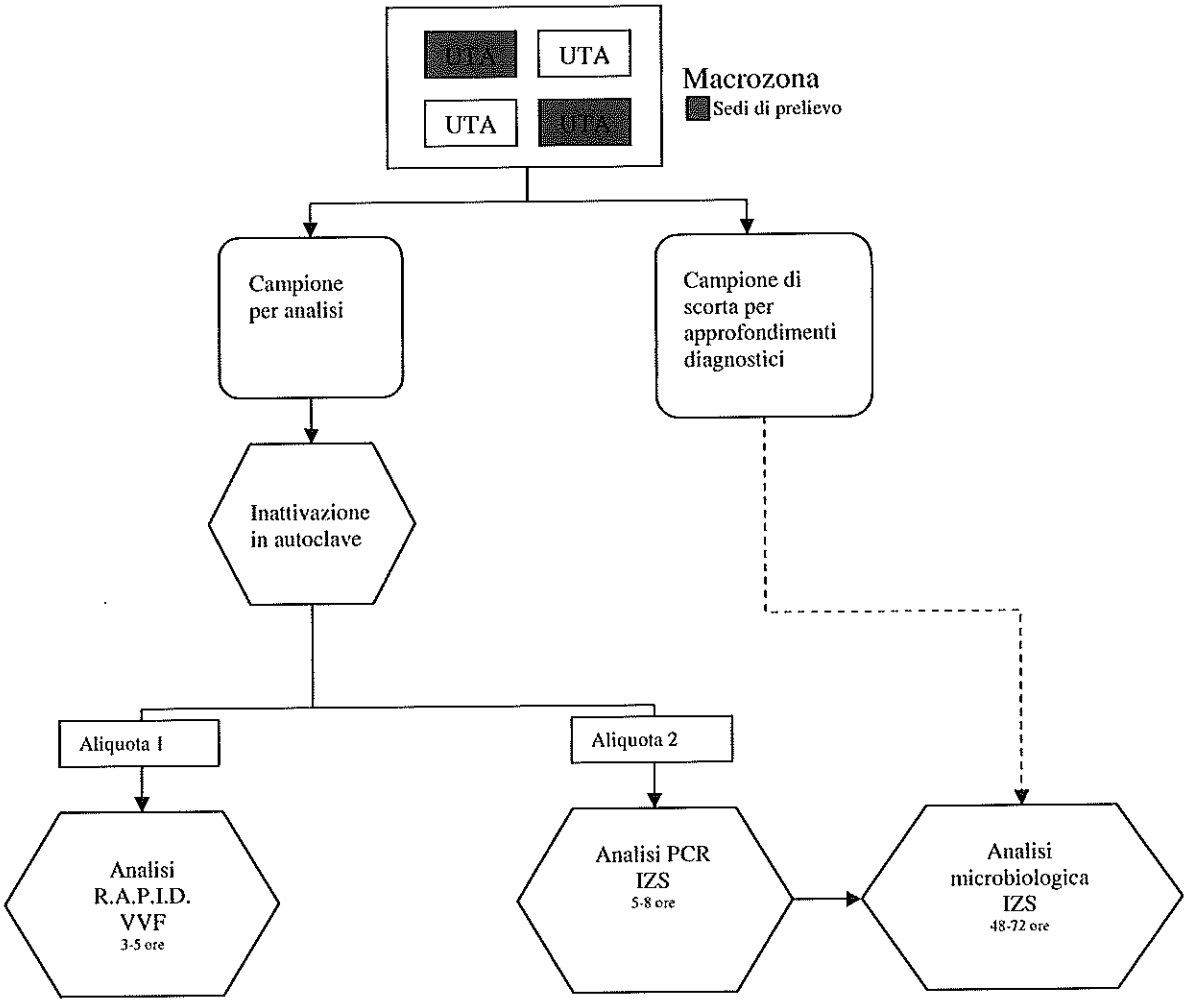
considerazione aspetti tecnici legati alle modalità di convogliamento dell'aria all'interno delle UTA e di praticità compatibile con le fasi di campionamento.

**Campionamento**

Al fine di definire le peculiarità del campionamento sono state pianificate riunioni tecniche e sopralluoghi, a seguito dei quali è stata assemblata una documentazione tecnica essenziale (disegni tecnici e materiale fotografico) utile a impostare uno studio per razionalizzare le modalità di campionamento. Tale studio ha permesso di identificare per ciascun sito olimpico delle macrozone (aree di un sito servite da una unità di climatizzazione formata da una o più UTA) che possono costituire le unità campionarie per l'attività di controllo.

Le modalità di campionamento, analisi e trasmissione dei dati sono state illustrate nella procedura allegata redatta in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Torino. ( **allegato 1**).

**SCHEMA DEL FLUSSO OPERATIVO**



## LINEE GUIDA OPERATIVE PER PREVENZIONE RISCHIO CHIMICO

Per quanto riguarda l'attività chimica si prevedono campionamenti e analisi nei siti sensibili al "coperto" prima degli eventi sportivi o delle manifestazioni.

**Obiettivo:**

- Sorveglianza dei siti olimpici al coperto finalizzata al monitoraggio delle condizioni ambientali relativamente alla presenza di sostanze chimiche dannose per la salute umana.

**Campo di applicazione**

Siti olimpici da monitorare:

- Oval Torino Lingotto
- Palavela Torino
- Torino Esposizioni
- Palaghiaccio di Pinerolo
- Palasport olimpico - Hockey 1

**Tipologia del controllo**

Monitoraggio ambientale dell'aria, mediante campionamento e analisi istantanea in punti (ancora da determinare) con l'uso di analizzatori di tre diverse tipologie:

- PID (detector a fotoionizzazione), come tecnica di screening di base per la rilevazione di famiglie di composti e per singole specifiche sostanze;
- IMS;
- analizzatori multigas a celle elettrochimiche.

Attualmente è in corso un confronto con l'ARPA che ha proposto un protocollo di collaborazione: "*allineamento tra le dotazioni tecniche dei VVF e i sistemi di analisi in uso in Arpa per le attività di prevenzione e controllo dei rischio chimico durate i giochi olimpici di Torino 2006*" che viene di seguito riportato come allegato ( **allegato 2**).

## LINEE GUIDA OPERATIVE PER PREVENZIONE RISCHIO RADIOLOGICO/ NUCLEARE

Per quanto riguarda l'attività radiologica/nucleare si prevede il monitoraggio sia nei siti sensibili al "coperto" che in quelli "all'aperto" prima e durante lo svolgimento degli eventi sportivi o delle manifestazioni.

**Obiettivo:**

- Sorveglianza dei siti olimpici finalizzata al monitoraggio delle condizioni ambientali relativamente alla presenza di sostanze radiogene.

**Campo di applicazione**

Siti olimpici da monitorare:

- Oval Torino Lingotto
- Palavela Torino
- Torino Esposizioni
- Palaghiaccio di Pinerolo
- Palasport olimpico - Hockey 1
- Stadio Olimpico – Torino;
- Medal Plaza - Piazza Castello

**Tipologia del controllo**

Monitoraggio ambientale, con analisi istantanea in punti (ancora da determinare) mediante l'uso di analizzatori di diverse tipologie.

Per quanto riguarda i siti al coperto verranno utilizzati radiometri ed eseguiti "smear test".

Per i siti all'aperto verrà eseguito un monitoraggio mediante la seguente strumentazione campale:

- Rilevatori a ioduro di sodio;
- Rilevatori di neutroni ( al $BF_3$ o al trizio);
- Scintillatori Plastici;
- Spettrometri gamma.

Durante le gare o le manifestazioni avverrà invece un monitoraggio "passivo" mediante l'uso di dosimetri elettronici personali di tipo:

-UDR 13;

- Mini Radiac;

di cui saranno dotate tutte le squadre di vigilanza.

**Allegato1**

**DETTAGLI OPERATIVI PER IL CAMPIONAMENTO IN FASE DI MONITORAGGIO PER IL RILEVAMENTO DI CONTAMINAZIONE BIOLOGICA SU FILTRI DEGLI IMPIANTI DI VENTILAZIONE DEI SITI OLIMPICI INDOOR**

Il monitoraggio prende in considerazione quattro specie batteriche potenzialmente impiegabili in attentati terroristici: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Brucella spp.* e *Francisella tularensis*.

Di seguito si elenca il materiale occorrente ed il flusso operativo per il monitoraggio:

**Campionamento**

**Materiali:**

1. *Dispositivi di prelievo*
   - Dispositivi, di dimensioni 20X20 cm, realizzati utilizzando lo stesso materiale filtrante in dotazione ai dispositivi UTA degli impianti, appositamente predisposti per essere fissati in linea ai filtri degli UTA.
   - Detti dispositivi saranno preventivamente confezionati e conservati in condizioni di sicurezza.

2. *Materiali per l'esecuzione del prelievo*
   - Sacchetti autoclavabili per rischio per rischio biologico
   - Sacchi grandi per rischio biologico;
   - Etichette autoclavabili;
   - Pennarelli permanenti con inchiostro autoclavabile;
   - Boccetta con vaporizzatore per ipoclorito di sodio;
   - Fascette piccole per sigillare i sacchetti;
   - Rotolo di carta assorbente;
   - Salviette disinfettanti per pulizia mani.

3. *Identificazione dei campioni*

Il sistema di identificazione dei campioni si basa su una nomenclatura articolata su tre livelli:
- identificazione del sito (sigla di tre lettere): **OvL** (Oval Lingotto), **PaV** ( Palavela), **ToE** (Torino esposizioni), **PgP** ( Palaghiaccio Pinerolo), **PoS** ( Palasport Olimpico);
- identificazione della macrozona ( sigla monolettera maiuscola): es. **OvL-A;**
- identificazione dell'UTA sede di prelievo (sigla numerica progressiva): es. **OvL-A-45.**

4. *Materiali per il campionamento*

Le etichette per l'identificazione dei campioni verranno preventivamente predisposte dall'istituto Zooprofilattico e saranno a disposizione delle squadre che effettueranno il prelievo. Si ritiene utile, per agevolare le operazioni di campionamento, poter disporre di kit appositamente preparati, contenenti tutto il materiale impiegato nel prelievo, ovvero i dispositivi di prelievo puliti, i sacchetti, le etichette e le fascette per il confezionamento dei campioni, nelle quantità necessarie.

5. *Squadre di campionamento*

La squadra di campionamento è composta da due operatori dei VVF:
- l'operatore addetto al prelievo viene identificato, come da normativa NATO, **uomo sporco**;
- l'operatore addetto alle fasi di assistenza al prelievo viene identificato come **uomo pulito** ed è il responsabile della squadra e delle operazioni effettute.

6. *Dotazioni di DPI*

Per ciò che concerne la protezione individuale durante le operazioni di prelievo dovranno essere indossati i seguenti DPI:

**- uomo sporco**
- Tuta monouso per rischio biologico in materiale plastico antischizzo;
- Cuffia monouso in tyvek;
- Doppio paio di guanti in lattice o nitrile cat. III per rischio biologico;
- Calzari monouso di plastica a collo alto in materiale plastico;

- Occhiali protettivi monouso;
- Mascherina facciale FP3 monouso.

- **uomo pulito**
- Tuta monouso per rischio biologico in materiale plastico antischizzo;
- Doppio paio di guanti in lattice o nitrile cat. III per rischio biologico;
- Calzari monouso di plastica a collo alto in materiale plastico;
- Mascherina facciale FP3 monouso.

## *7. Calendario attività prelievo*

Per coprire l'intero periodo nel quale si svolgono gli eventi Olimpici ed in considerazione dei periodi di incubazione degli agenti eziologici considerati, l'attività di prelievo verrà effettuata ogni 48 ore ( nei giorni pari) per un totale di n. 10 interventi, di cui il primo avrà luogo 48 ore prima dell'inizio delle manifestazioni e l'ultimo avrà luogo nella prima giornata di chiusura della manifestazione stessa.

## *8. Sequenze operative*

Schema di campionamento:

- per ogni punto di prelievo (UTA) saranno campionati due dispositivi di prelievo: uno per l'esecuzione dell'analisi rapida molecolare PCR (campione etichetta nera) e uno di scorta per l'eventuale analisi microbiologica di conferma (campione etichetta rossa);
- per ciascun sito tutti i campioni prelevati dovranno essere aggregati per tipologia di etichetta e raggruppati in un ulteriore unico sacco al quale sarà unita la documentazione di campionamento.

Operazioni svolte dall'**uomo sporco:**

- entra nella zona sporca (o zona di prelievo) e provvede materialmente al prelievo dei dispositivi di campionamento: rimozione del filtro di campionamento e posizionamento del dispositivo pulito;
- introduce il campione in un primo **sacchetto in plastica** autoclavabile **(1),** che chiude con la fascetta apposita e che identifica mediante l'apposizione dell'etichetta di identificazione;
- introduce il sacchetto (1) all'interno del secondo **sacchetto in plastica** autoclavabile **(2)** che gli viene presentato aperto dall'**uomo pulito** (che resta al di fuori della zona sporca);
- si toglie in sequenza i calzari ed il primo paio di guanti che saranno scartati nel contenitore dei rifiuti pericolosi; quindi chiude l'impianto di aerazione con il guanto pulito;

N.B.: per le attività di prelievo da effettuare in più UTA della medesima macrozona, i calzari e i guanti sono sostituiti ad ogni UTA.

- Al termine del campionamento nella macrozona tutti i D.P.I. per il rischio biologico saranno scartati nel contenitore dei rifiuti pericolosi (sacco grande per rischio biologico) prima di raggiungere una nuova macrozona.

Operazioni svolte dall'**uomo pulito:**

- presenta il sacchetto (2) aperto all'uomo sporco e ultima il confezionamento del campione chiudendolo con l'apposita fascetta;
- introduce il sacchetto (2) nel terzo **sacchetto in plastica** autoclavabile **(3)**, che viene chiuso con le medesime modalità;

- colloca ciascun campione nei contenitori di trasporto (sacchi grandi per rischio biologico), uno per campioni con etichetta nera e uno per campioni con etichetta rossa;
- compila la documentazione di campionamento;
- bonifica l'area di contorno alla zona di prelievo (area arancio) al termine delle operazioni;
- vigila, quale responsabile della squadra, sul buon andamento delle operazioni.

Conclusione delle operazioni di campionamento:

- Al termine del campionamento gli operatori abbandonano il sito e portano con se due contenitori di cui:
  - il primo con i dispositivi di prelievo campionati, suddivisi per colore di etichetta;
  - il secondo contenente i rifiuti a rischio biologico da autoclavare o incenerire (D.P.I., guanti, carta).
- Raggiunto l'autoveicolo, i sacchi vengono posti all'interno del bagagliaio.
- La documentazione di campionamento, redatta per ciascun sito e firmata dall'**uomo pulito**, accompagna il rispettivo contenitore per ogni singolo Sito Olimpico.

N.B.: per le operazioni di vestizione e svestizione delle squadre di campionamento, si rimanda alle apposite istruzioni che verranno impartite durante l'addestramento.

## *9. Documentazione di campionamento*

Saranno redatti due documenti di campionamento:

- Uno a cura del Comando Provinciale Vigili del fuoco di Torino denominato *"Scheda di campionamento"*
- Uno a cura dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta denominato *"scheda accettazione campioni ordinari"*.

Entrambi saranno compilati dalla squadra di campionamento.

## *10. Trasporto campioni.*

- Vengono istituite due squadre di campionamento:
  - la **squadra 1** si occuperà della struttura **"Palaghiaccio Pinerolo"**;
  - la **squadra 2** si occuperà delle strutture di **"Oval Lingotto e Palavela"**;
  - la **squadra 3** si occuperà delle strutture **"Torino Esposizioni e Palasport Olimpico"**.
- Il trasporto dei campioni, a mezzo autoveicolo, deve avvenire nel minor tempo possibile ma con la massima cautela di guida, vanno quindi evitate tassativamente soste intermedie non dovute ad emergenze.
- I veicoli devono essere esclusivamente unità mobili NBCR. In caso ciò non fosse possibile i veicoli assegnati dovranno essere usati esclusivamente per il trasporto di materiale a rischio biologico e dovranno riportare sui tre lati il logo del rischio biologico.
- Tutto il personale assegnato al campionamento deve essere formato e addestrato alle tecniche di campionamento e sulla materia inerente il rischio biologico e essere munito di qualifica di II livello NBCR.
- All'interno dell'autoveicolo potranno viaggiare solo le due unità di personale componenti la squadra di campionamento.
- All'interno dell'autoveicolo sarà presente un **Kit di decontaminazione d'emergenza** così composto:
  - Guanti in lattice o nitrile cat. III per rischio biologico

- Tute categoria III tipo 4
- Occhiali protettivi
- Mascherine FP3
- Calzari monouso
- Contenitore **ipoclorito di sodio** 0,5%
- Asciugamani in carta usa e getta
- Salviette disinfettanti per pulizia mani
- Sacchi per rifiuti autoclavabili piccoli
- Sacchi per rifiuti autoclavabili grandi
- Barattolo in plastica 500 ml.

**11. Accettazione campioni in fase analitica**

I campioni devono pervenire all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino (IZS), sito in via Bologna 148 (ingresso accettazione via Paganini 25) tassativamente entro le ore 8.30 di ogni giornata calendarizzata per il prelievo.

**12. Esami di Laboratorio**

I contenitori con i campioni con etichetta nera vengono portati ai laboratori per l'inattivazione in autoclave, mentre i campioni con etichetta rossa vengono adeguatamente stoccati per eventuali approfondimenti diagnostici che si rendessero necessari.
Dopo in attivazione i campioni vengono preparati per essere sottoposti alla analisi rapida in PCR ( sminuzzamento, lavaggio, concentrazione mediante centrifugazione, allestimento aliquote).
L'analisi rapida in PCR viene seguita con metodo interno dai Laboratori IZS e dai VVF nucleo NBCR con le proprie dotazioni di reagenti e attrezzature.
I risultati delle analisi saranno a disposizione entro la giornata successiva a quella del prelievo.

**Allegato 2**

## PROPOSTA DI ALLINEAMENTO TRA LE DOTAZIONI TECNICHE DEI VVF E I SISTEMI DI ANALISI IN USO IN ARPA PER LE ATTIVITÀ DI PREVENZIONE E CONTROLLO DEI RISCHIO CHIMICO DURATE I GIOCHI OLIMPICI DI TORINO 2006

## 1 AERIFORMI IN FASE DI MONITORAGGIO DEI SITI OLIMPICI

### 1.1 STUDIO MEDIANTE TECNICA ALL'INFRAROSSO IN FASE SOLIDA

Lo studio delle componenti chimiche presenti nei condotti di aerazione sarà realizzato secondo un campionamento a concentrazione su membrane filtranti in policarbonato (strumentazione Arpa disponibile) che permettano una successiva valutazione analitica mediante studio all'infrarosso. Il campionamento su membrane filtranti verrà realizzato da personale di VVF affiancato da tecnici di Arpa in uno o due punti degli impianti di aerazione mediante pompa volumetrica e sonda di prelievo da introdursi nei sistemi.

Per il campionamento presso i sei siti olimpici oggetto di monitoraggio si stima l'impegno di 2 squadre, composte ciascuna da 2 persone di cui un operatore VVF e un tecnico Arpa. Tempi e modi di campionamento saranno condizionati dalla conoscenza dell'assetto degli impianti di condizionamento e del loro funzionamento. I campioni saranno trasferiti dal personale dei VVF presso il laboratorio Arpa dove si potrà procedere all'analisi del particolato raccolto sulle membrane filtranti mediante tecnica all'infrarosso in fase solida.

- ❑ Si ipotizza un campionamento al giorno (mattina o sera) in relazione alla frequenza e orari di utilizzo dei siti, in analogia alla progettazione del monitoraggio biologico.
  - campionamento: durata circa 1 ora
  - trasferimento campioni dal sito al laboratorio Arpa: durata circa 1 ora
  - analisi: durata circa 1 ora

### 1.2 RILEVAZIONE ANALITICA IN CAMPO

Gli aeriformi saranno inoltre indagati mediante campionamento e analisi istantanea in punti prefigurati dopo opportuna conoscenza dei siti mediante l'uso di analizzatori di tre diverse tipologie:

- PID (detector a fotoionizzazione), come tecnica di screening di base per la rilevazione di famiglie di composti e per singole specifiche sostanze,
- analizzatori a raggi infrarossi – per rilevazione di gas quali: ammoniaca, metano, acido solfidrico,
- analizzatori multigas a celle elettrochimiche.

Queste valutazioni saranno mirate ad indagare classi di componenti organiche e inorganiche estranee alla qualità dell'aria in forma di gas o vapore. Si utilizzerà la strumentazione idonea alla rilevazione analitica in campo già in dotazione ai VVF, integrata da quanto disponibile tra le dotazioni strumentali Arpa. Per il campionamento si stima l'impegno di 2 squadre composte ciascuna da 2 persone, di cui un operatore VVF e un tecnico Arpa.

- ❑ Si ipotizza un campionamento al giorno (mattina o sera) in relazione alla frequenza e orari di utilizzo dei siti, in analogia alla progettazione del monitoraggio biologico. Si stima un numero di punti per sito compreso tra 5 e 10.
  - Tempo di osservazione: 5 minuti per punto, con esito immediato

### 1.3 MONITORAGGIO CON MEZZO MOBILE DELL'ARPA

Il mezzo mobile di Arpa, equipaggiato di strumentazione per la rilevazione dei VOCs (sostanze organiche volatili), sarà posizionato periodicamente in prossimità dei siti olimpici, per condurre un monitoraggio dell'aria in aree ritenute obiettivo significativo rispetto alla potenziale dispersione di un agente chimico su vasta superficie urbana da velivolo in fase di sorvolo.

## 2 AERIFORMI NELLA FASE DI EMERGENZA

### 2.1 RILEVAZIONE DI SOSTANZE ORGANICHE VOLATILI CON CAMPIONATORI A CONCENTRAZIONE (FIALE)

Il campionamento discontinuo di aeriformi in condizioni di emergenza sarà svolto dal personale dei VVF dotato di opportuni dispositivi di protezione individuale mediante l'utilizzo di campionatori a concentrazione (fiale di adsorbimento a carboni attivi o altri supporti solidi). Per la realizzazione di tali campionamenti i VVF dovranno disporre della seguente strumentazione, che dovrà costituire parte integrante delle dotazioni VVF per l'intervento in emergenza:

- pompa alimentata a batteria con un intervallo di funzionamento da 0.5 a 30 litri/minuto (per campionamenti di aeriformi su supporti solidi tipo fiale e su membrane filtranti)
- flussimetro per la taratura della pompa di campionamento
- fiale e membrane filtranti

Arpa fornirà ai VVF le specifiche tecniche delle dotazioni necessarie, la procedura per la realizzazione dei campionamenti e l'affiancamento in fase di addestramento degli operatori VVF alla realizzazione dei campionamenti. Al proposito, si propone l'individuazione di due tecnici di Arpa esperti nell'analisi chimica strumentale per fornire il supporto metodologico ai VVF nell'utilizzo delle dotazioni strumentali installate sul mezzo mobile e da utilizzarsi in situazioni di emergenza.

I campioni realizzati saranno trasferiti dai VVF nei laboratori di Arpa, che eseguirà le determinazioni analitiche quantitative fornendo i dati relativi alla speciazione delle sostanze organiche volatili e sostanze organiche totali. I tempi di analisi saranno da definirsi nell'ambito della organizzazione tecnico-analitica del laboratorio di Arpa.

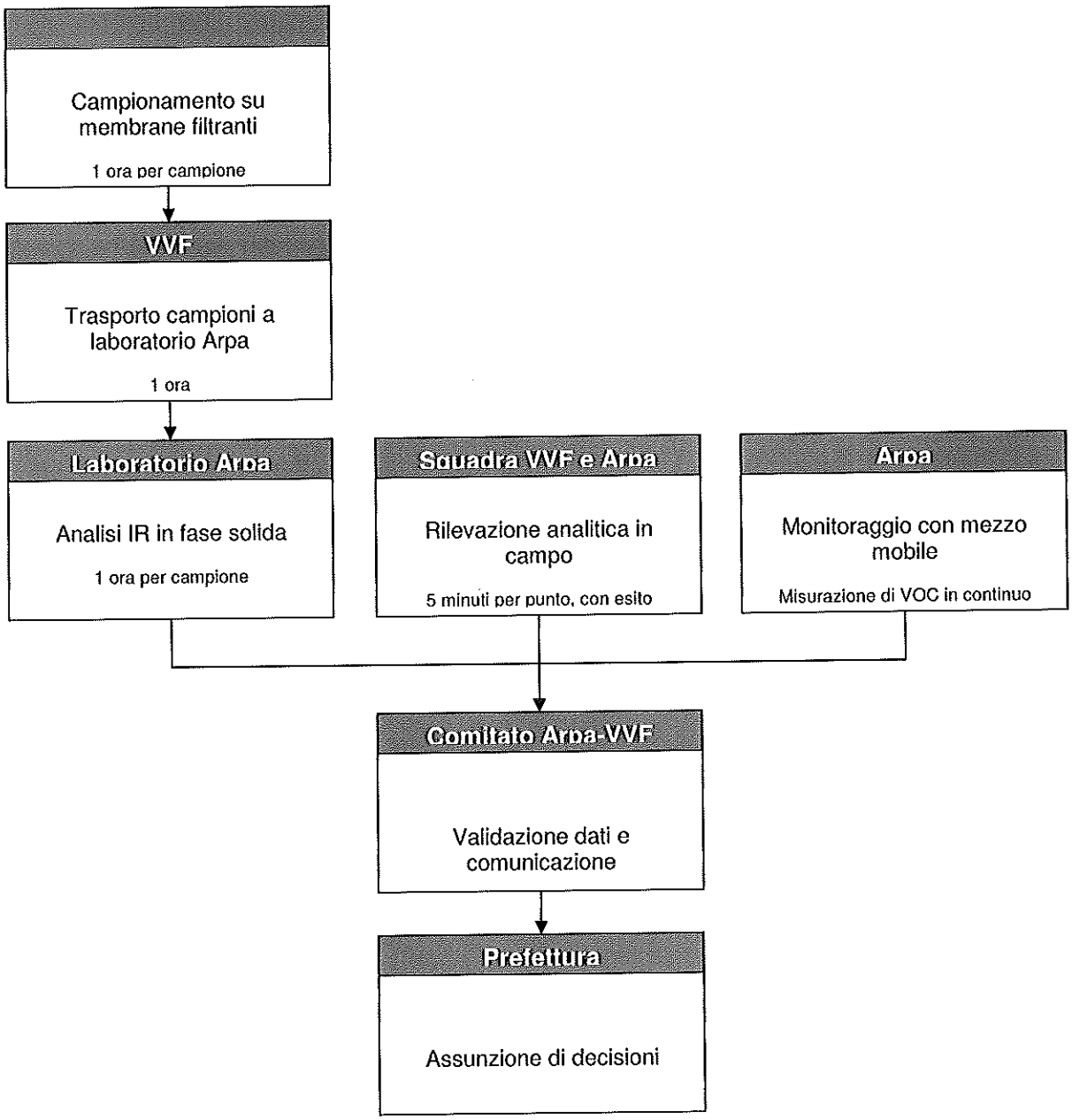
## 2.2 RILEVAZIONE DI SOSTANZE ORGANICHE VOLATILI CON CAMPIONATORI A VOLUME FISSO (CANISTER)

Il campionamento discontinuo di aeriformi in condizioni di emergenza potrà essere svolto dal personale dei VVF dotato di opportuni dispositivi di protezione individuale anche mediante l'utilizzo di campionatori a volume fisso (canister) già facenti parte delle dotazioni VVF per l'intervento in emergenza. Si precisa che per la realizzazione di tali campionamenti i VVF dovranno garantire, anche mediante collaborazione con altra struttura laboratoristica, la disponibilità di idonea linea di approntamento e bonifica de canister.

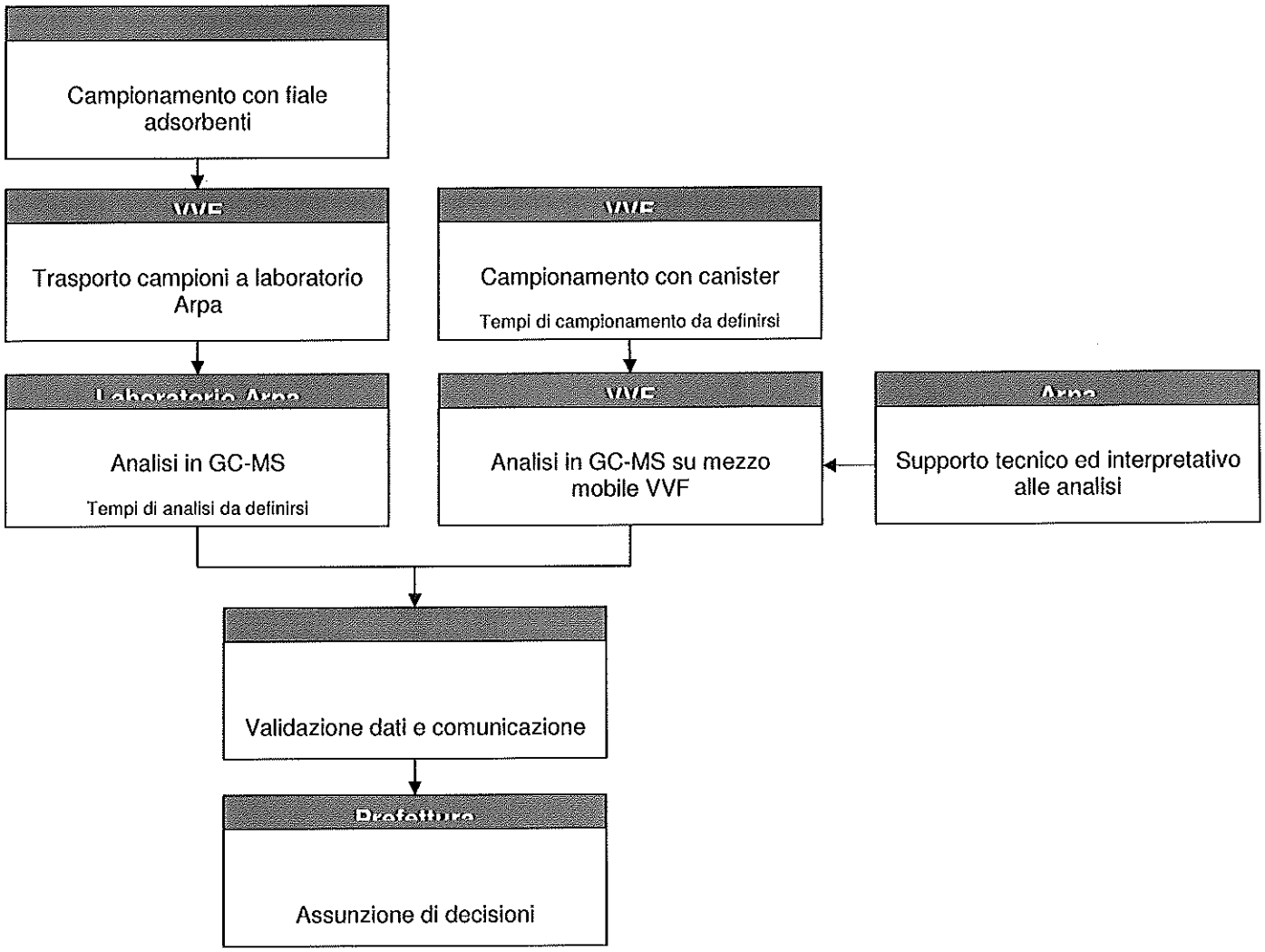
L'analisi qualitativa delle componenti organiche volatili sarà svolta dai VVF mediante la strumentazione portatile installata sul medesimo mezzo mobile VVF. I tempi di analisi saranno da definirsi nell'ambito della organizzazione tecnico-analitica del laboratorio mobile dei VVF.

Arpa fornirà ai VVF il supporto specialistico per la conduzione delle fase analitica ed interpretativa dei dati. Come già detto al punto precedente, si propone l'individuazione di due tecnici di Arpa esperti nell'analisi chimica strumentale per fornire ai VVF il supporto nell'utilizzo delle dotazioni strumentali installate sul mezzo mobile.

## Aeriformi in fase di monitoraggio dei siti olimpici



## Aeriformi in fase di emergenza



| | | |
|---|---|---|
| **"Portable Real Time PCR platform"**<br>**Collaborazione IZSVe - Vigili del Fuoco**<br><br>**REPORT** | | |
| Data emissione:<br>**20-07-2009** | Revisione: 1<br>N° pag complessive: | **Autori:**<br>Cristian De Battisti,<br>Dipartimento Ricerca e Sviluppo, SC6,<br>IZS Venezie, Legnaro (PD), cdebattisti@izsvenezie.it<br>Salvatore Minghetti<br>Ministero dell'Interno<br>Dipartimanto dei Vigili del Fuoco del Soccorso Pubblico e della Difesa Civile<br>Comando Provinciale VV.F. di Venezia,<br>salvatore.minghetti@vigilfuoco.it |

## Premessa

L'utilizzo di laboratori di analisi mobili per interventi in zone contaminate o a rischio biologico, ha avuto notevole sviluppo negli ultimi anni. La possibilità di intervenire rapidamente con sistemi e procedure d'analisi efficaci e sensibili può ridurre notevolmente il pericolo di diffusione di agenti batteriologici, virali o chimici. In particolare, l'impiego di sistemi di analisi biomolecolari, come la metodica Real Time può consentire la rapida identificazione di agenti biologici patogeni o potenzialmente pericolosi come batteri, funghi e virus. L'utilizzo di laboratori mobili di dimensioni ridotte rende difficoltoso l'impiego di molte delle piattaforme Real Time in commercio, imponendo lo sviluppo di alcune piattaforme portatili, più versatili e trasportabili, adatte ad essere usate in condizioni estreme. Pochi dati esistono riguardo le performance di queste piattaforme mobili soprattutto circa la sensibilità quando utilizzate in campo, su campioni prelevati in condizioni di emergenza.
Nell'ambito della collaborazione istituita tra l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie e il Comando dei Vigili del Fuoco di Mestre, si propone un programma di test da effettuare sulla piattaforma "portable Real Time" del laboratorio biologico mobile di cui il nucleo regionale avanzato (NBCR) di Venezia è dotato. Si tratta della piattaforma R.A.P.I.D. System (Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device) della ditta "Idaho Technologies Inc.".
Tali test rientrano nelle attività del progetto europeo "Fluaid" tese a valutare l'efficacia di piattaforme Real Time mobili al fine di un loro possibile utilizzo in zone con condizioni di emergenza, ad es. focolai di infezione di Influenza Aviaria.

## Obbiettivi

Testare la sensibilità analitica dei protocolli di Real Time per influenza aviaria, in uso presso il laboratorio di riferimento europeo VLA (Weybridge, UK), sulla piattaforma Real Time mobile RAPID System, per valutarne il possibile utilizzo in situazioni di emergenza o per interventi in zone altamente infette. Valutare la ripetibilità dei risultati su più piattaforme mobili.

## Materiali e metodi

### Campioni

Il materiale da testare consisteva in due matrici di influenza aviaria:

- Sottotipo H5N1: dose infettante $10^{5.83}$, lotto L40/06 09/2006
- Sottotipo H7N1: dose infettante $10^{7.375}$, lotto L2/06 02/2006

Ogni matrice è stata diluita (diluizione 1:10) in doppio (serie I e II) in PBS fino ad ottenere 7 punti di diluizione da utilizzare come campioni per i test. Da entrambe le serie di diluizioni è stato estratto l'RNA virale (estrazione 1 e 2) utilizzando il kit commerciale "NucleoSpin RNA II" della ditta Macherey-Nagel (Lotto 811/004) seguendo le indicazioni del fornitore. La sensibilità della r-RT PCR è stata valutata testando ogni diluizione in triplo.

L'RNA ottenuto dalla matrice H5N1 è stato utilizzato come templato nelle analisi per la determinazione del tipo influenzale A e del sottotipo H5 mentre l'RNA ottenuto dalla matrice H7N1 è stato utilizzato come templato nelle analisi per la determinazione dei sottotipi H7 ed N1.

**Analisi effettuate**

Le analisi sono state condotte in modo da testare lo stesso protocollo su entrambe le piattaforme mobili disponibili, ma in giorni diversi, per valutare la ripetibilità dei risultati tra strumenti (Fig.1).

| | RTn°1 | RTn°2 |
|---|---|---|
| **18.03.09** | H7 1°serie VLA | Gene M 1° serie VLA |
| | H5 1°serie VLA | N1 1°serie VLA |
| **19.03.09** | H7 2°serie VLA | Gene M 2° serie VLA |
| | H5 2°serie VLA | N1 2°serie VLA |
| **24.03.09** | gene M 1°serie VLA | H7 1°serie VLA |
| | N1 1°serie VLA | H5 2°serie VLA |

Figura 1: Schema delle analisi eseguite. RT=RealTime, 1°Serie=estrazione numero 1, 2°Serie=estrazione numero 2.

| | | |
|---|---|---|
| **"Portable Real Time PCR platform"**<br>**Collaborazione IZSVe - Vigili del Fuoco**<br><br>**REPORT** | | |
| Data emissione:<br>**20-07-2009** | Revisione: 1<br>N° pag complessive: | **Autori:**<br>Cristian De Battisti,<br>Dipartimento Ricerca e Sviluppo, SC6,<br>IZS Venezie, Legnaro (PD), cdebattisti@izsvenezie.it<br>Salvatore Minghetti<br>Ministero dell'Interno<br>Dipartimanto dei Vigili del Fuoco del Soccorso Pubblico e della Difesa Civile<br>Comando Provinciale VV.F. di Venezia,<br>salvatore.minghetti@vigilfuoco.it |

**RT-Real Time PCR**

Sono stati utilizzati i protocolli di analisi per influenza aviaria in uso presso il laboratorio di riferimento europeo VLA (Weybridge, UK), per l'identificazione di influenza tipo A (gene della matrice), sottotipo H5 e H7 (gene HA) e sottotipo N1 (gene NA). Vedi allegato 1. Si tratta di protocolli Real Time con sonda TaqMan (fluoroforo FAM per l'analisi H5, H7 e GeneM, e fluoroforo VIC nel caso dell'analisi N1).

Tutti i protocolli sono stati testati sulle due piattaforme "RAPID System" in dotazione al Nucleo NBCR (Nucleare, Biologico, Chimico, Radiologico). Le due piattaforme sono state identificate come RT1 e RT2 e su entrambe sono stati testati gli stessi protocolli, consentendo di valutare la ripetibilità dei risultati tra strumenti.

Gli stessi campioni sono anche stati testati sulla piattaforma Real Time "Light Cycler 2.0" (ditta Roche) in dotazione presso il laboratorio di Ricerca e Sviluppo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, che presenta le stesse caratteristiche tecniche della piattaforma RAPID System.

## Risultati

I risultati ottenuti impiegando le piattaforme mobili in dotazione del Nucleo NBCR (Allegato 2) sono stati comparati con i dati ottenuti utilizzando la piattaforma Light Cycler 2.0 in dotazione al laboratorio di Ricerca e Sviluppo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Allegato 3). L'analisi dei dati ha riguardato la sensibilità del metodo, cioè la quantità minima di target che il sistema (protocollo più piattaforma) è in grado di rilevare (LoD, Limit of Detection), nonché la ripetibilità dei risultati valutando saggi eseguiti su piattaforme diverse ma con lo stesso templato.

Per ogni triplicato sono stati calcolati la media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione percentuale come indicatori di precisione e ripetibilità. I dati sono stati analizzati tenendo conto dell'ultima diluizione che mostrava un risultato positivo, in un range lineare e che fosse ripetibile nella maggior parte delle altre ripetizioni.

Le prove effettuate sulla piattaforma Light Cycler (IZSVe) riguardavano solo una delle due serie, la I o la II, non entrambe. La comparazione con i dati delle piattaforme mobili può quindi essere eseguita solo per la serie corrispondente.

**Sensibilità**

**Gene M.** LoD:$10^{1.375}$, in alcune ripetizioni la sensibilità scendeva a $10^{0.375}$, ma al di fuori del range lineare

**H5.** LoD: si arriva a valori di $10^{0.83}$ ma non in tutte le ripetizioni, in alcune la sensibilità si ferma a valori di $10^{2.83}$ $10^{1.83}$

**H7.** LoD: $10^{1.375}$, tutte le ripetizioni mostrano la medesima sensibilità.

**N1**. LoD: $10^{0.83}$, solo una ripetizione mostra una sensibilità minore, a $10^{1.83}$

Tutti questi valori di sensibilità sono in linea con quelli ottenuti nella piattaforma Light Cycler (Roche).

**Ripetibilità**

Tutte le prove effettuate sono state eseguite dallo stesso operatore, il parametro da testare era quindi solo la ripetibilità tra piattaforme diverse. I risultati ottenuti esprimono una discreta ripetibilità, soprattutto con il protocollo H7, mentre si rileva una scarsa ripetibilità per quanto riguarda i risultati ottenuti con il protocollo H5.

## Discussione e conclusioni

Le analisi effettuate mostrano una sensibilità in linea con quella ottenuta con la piattaforma Light Cycler, Roche. Per tutti i protocolli la LoD raggiungeva la stessa diluizione delle analisi comparative, in serie I e/o in serie II. La ripetibilità delle analisi non ha soddisfatto le attese, mostrando una certa variabilità sia a livello della media dei Ct che del livello di sensibilità ottenuto. Sulla base dei risultati ottenuti si può comunque concludere che le piattaforme in dotazione presso il Nucleo NBCR mostrano dei livelli di sensibilità e ripetibilità comparabili con altre piattaforme in uso presso laboratori di diagnostica. I risultati ottenuti si possono considerare buoni, permettendo di effettuare analisi simili su piattaforme diverse con risultati paragonabili. Le piattaforme mobili in questione non sono state sottoposte a programmi di manutenzione regolari, avvalorando ancora di più i risultati ottenuti.

## Allegato 1

### PROTOCOL FOR THE DETECTION OF H5 AVIAN INFLUENZA VIRUS BY REALTIME RT-PCR

#### Primers and hydrolysis ("TaqMan") probe

Primers and probe have been designed at VLA. These are a modification of those designed originally by Spackman *et al* (J Clin Microbiol (2002) **40**; 3256-3260). The VLA modified sequences are as follows:

H5LH1: ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G

H5RH1: AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC

H5PRO: FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA

Note degenerate nucleotides indicated in bold. The above primers and probe include modifications to detect current H5 (including HPAI viruses) Eurasian avian influenza viruses: These also include the HPAI H5N1 isolates circulating in poultry in several Asian countries in 2003-5, plus other LPAI H5 strains from Europe and Asia isolated from poultry and wild birds in recent years. While the above been modified in order to detect current H5 Eurasian avian influenza viruses, experiments have revealed that North American H5 strains may also be detected, albeit more weakly.

## Cycling conditions

These are currently in use on Stratagene Mx3000 & Mx4000 instruments at VLA. Other laboratories using different instrumentation platforms should first critically and carefully examine these cycling conditions as they may ***not*** perform optimally on non-Stratagene RealTime instruments. Hence cycling temperatures, times and ramp speeds may all need to be modified by a non-Stratagene user:

30 mins at 50C, 15 mins at 95C;
Then x40 cycles of:
10 secs at 95C
30 secs at 54C
10 secs at 72C
**NB**: Fluorescence data is gathered at the end of each 54C annealing step.

## H5 RealTime PCR Master Mix

This is based on the Methods section of Spackman *et al* (2002), which utilises the OneStep RT-PCR Kit (Cat # 210212, Qiagen). Reagents not provided in the kit can be obtained from other suppliers as indicated in below table (overleaf) which describes a H5 RealTime Master Mix for 10 x 25ul reactions:

Cristian De Battisti,
Dipartimento Ricerca e Sviluppo, SC6,
IZS Venezie, Legnaro (PD), cdebattisti@izsvenezie.it
Salvatore Minghetti
Ministero dell'Interno
Dipartimanto dei Vigili del Fuoco del Soccorso Pubblico e della Difesa Civile
Comando Provinciale VV.F. di Venezia,
salvatore.minghetti@vigilfuoco.it


| Ingredients - all except primers & probe are from Qiagen OneStep RT-PCR Kit (cat # 210212) & other stated suppliers: | Volumes (ul) for 10 reaction recipe: |
|---|---|
| DEPC-H2O (Ambion): | 137.5 |
| (x5) Qiagen 1-step RT PCR buffer: | 50 |
| ROX ref dye (pre-diluted to 1:500 in DEPC-H2O) (neat stock from Stratagene): | 3.75 |
| Qiagen dNTP mix: | 10 |
| H5LH1 (50uM): | 2 |
| H5RH1 (50uM): | 2 |
| H5PRO (30uM):<br>(Remember to reconstitute a freeze-dried probe in (x1) TE buffer*) | 2.5 |
| 25mM MgCl2 (Promega): | 12.5 |
| RNAsin (40U/ul, Promega): | 1 |
| Qiagen 1-step RT PCR enzyme mix: | 10 |
| Total | 231.25 |

Mix the Master Mix tube thoroughly by inversion & flicking, spin approx 30" to remove bubbles.
Then aliquot 23ul per well using P100, then add 2ul extracted RNA as target.

*TE buffer (x1): 10mM Tris-HCl (pH7.5) 1mM EDTA

## Reference


Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J, Shell W, McNally A, Essen S and Brown IH (2007). Validated H5 Eurasian Real-Time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. Avian Diseases, **51:** 373-377.


MJS, VLA, 27 July 2007