

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
TOR VERGATA



Facoltà di Ingegneria  
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Tesi di Master di Secondo livello in Protezione da Eventi CBRN

**Tecniche innovative per la rivelazione di  
agenti biologici da guerra e bio-terroristici**

Candidato

Dr.ssa Tiziana Barletta

Relatore

Chiar.mo Prof. Roberto Fiorito

Correlatore

Dott. Orlando Cenciarelli

Anno Accademico 2012/2013

# INDICE

<b>1. Riassunto</b>	<b>p. 1</b>
<b>2. Il rischio biologico</b>	<b>p. 2</b>
2.1 Naturale, antropico, bellico, terroristico	p. 5
2.2 Psicologia del rischio biologico	p. 11
2.3 Difficoltà di identificazione	p. 15
<b>3. La guerra biologica ed il bioterrorismo</b>	<b>p. 16</b>
3.1 Storia della guerra biologica e convenzioni internazionali	p. 17
3.2 Agenti biologici da guerra e bioterroristici	p. 23
3.2.1 Batteri	p. 23
3.2.2 Virus	p. 33
3.3 Nuovi scenari	p. 32
<b>4. Rivelazione</b>	<b>p. 36</b>
4.1 Stato dell'arte	p. 36
4.1.1 <i>Background</i> ambientale	p. 36
4.1.1.1 <i>Background</i> costituito dal particolato	p. 37
4.1.1.2 <i>Background</i> biologico	p. 37
4.1.1.3 <i>Background</i> ottico	p. 38
4.1.2 Selettività del sistema di rivelazione	p. 38
4.1.3 Sensibilità del sistema di rivelazione	p. 39
4.1.4 Sensibilità del sistema di campionamento	p. 39
4.2 Tecnologie puntiformi di rivelazione di agenti biologici	p. 40
4.2.1 Componenti di un sistema <i>point-detection</i> di rivelazione biologica	p. 40

4.2.1.1 Attivatore	p. 41
4.2.1.2 Collettore	p. 41
4.2.1.3 Rivelatore	p. 42
4.2.1.4 Identificatore	p. 42
4.2.2 Rivelatori non specifici	p. 43
4.2.2.1 Misuratori di particelle	p. 43
4.2.2.2 Metodi di fluorescenza	p. 44
4.2.2.3 Campionatori dimensionali di particelle vitali (impattatori)	p. 46
4.2.2.4 Campionatori virtuali	p. 47
4.2.2.5 Campionatori con tecnologia <i>Cyclone</i>	p. 48
4.2.2.6 Kit di campionamento manuali	p. 49
4.2.2.7 Dispositivi di campionamento palmari	p. 50
4.2.3 Rivelatori specifici	p. 51
4.2.3.1 Rivelamento umido (citometria a flusso)	p. 51
4.2.3.2 Rivelamento secco (spettrometria di massa)	p. 52
4.2.3.3 Identificatori immunologici	p. 53
4.2.3.3.1 Dispositivi a matrice monouso	p. 54
4.2.3.4 Approcci attraverso biosensori	p. 55
4.2.3.5 Amplificazione di acidi nucleici	p. 56
4.3 Tecnologie <i>stand-off</i> di rivelazione di agenti biologici	p. 57
4.4 Proposte di miglioramento al sistema di rivelazione	p. 60
<b>5. Discussione e conclusioni</b>	<b>p. 62</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>p. 64</b>
<i>Ringraziamenti</i>	<b>p. 68</b>

## 1. Riassunto

Le armi biologiche rappresentano una questione complessa nel contesto di difesa CBRNe, sia per le loro capacità distruttive che per il potenziale di generare panico e terrore nei soggetti colpiti. Utilizzate sin dai tempi pre-cristiani, le armi biologiche hanno portato alla decimazione di intere popolazioni e hanno talvolta inciso sulla geopolitica globale. In questo lavoro, oltre a presentare una rassegna delle principali attività belliche e terroristiche condotte grazie all'uso di armi biologiche ed i principali agenti ad esse correlati, viene focalizzata l'attenzione sulle tecniche di rivelazione di agenti biologici in ambito CBRNe. Questo aspetto è di fondamentale importanza in quanto, mentre per gli agenti C ed R sono disponibili apparecchiature in grado di fornire risposte sufficientemente rapide sulla quantità e spesso anche sulla qualità dell'aggressivo/contaminante presente, per quanto riguarda gli agenti B questa risposta, se si escludono pochissimi agenti ritenuti "potenzialmente utilizzabili" come armi biologiche, è tutt'ora pressoché utopica, soprattutto in aree aperte. L'analisi delle tecnologie di rilevazione si è incentrata sulle due macroaree di azione di un potenziale rilevatore: aree circoscritte, utilizzando una tecnologia *point detection*, ed aree aperte, con tecnologie *stand-off detection*. Alla luce delle analisi condotte, vengono proposti alcuni spunti di miglioramento ed implementazione al sistema di rilevazione, anche sulla base di evidenze sperimentali.

## **2. Il rischio biologico**

Il rischio biologico rappresenta, tra le minacce non convenzionali, il più difficile da gestire, sia per la difficoltà oggettiva nella determinazione dell'agente biologico responsabile dell'insorgenza di una patologia (sia esso un batterio, un virus, un micete o una tossina) sia per la mancanza di adeguate misure preventive e di profilassi nonché, per numerosi patogeni, anche di strategie terapeutiche.

Il rischio biologico si manifesta nel suo potenziale distruttivo sia dal punto di vista meramente naturale (basti pensare alle recenti pandemie influenzali) sia se diventa oggetto di atti terroristici con armi non convenzionali, tenuto conto anche dei bassi costi e delle relativamente modeste conoscenze necessarie per porre in essere un attacco di tipo bio-terroristico.

A queste evidenze, si aggiunge l'oggettiva difficoltà di rivelazione e rilevazione di agenti biologici, siano essi dispersi in aria, in acqua o nel suolo, attraverso tecnologie *stand-off*. Piccoli passi sono stati effettuati dalla ricerca nella rilevazione di agenti biologici con sistemi *point-detection*, tuttavia in questo caso si tratta di una rivelazione in grado di fornire risposte ON/OFF, piuttosto che informazioni quantitative e qualitative.

Il rischio biologico nasce dalla diffusione nell'ambiente di agenti biologici patogeni con conseguente induzione di uno stato di malattia infettiva nei soggetti colpiti.

Tale minaccia può originarsi dai seguenti principali eventi:

- la diffusione naturale dell'agente dovuta a cause indipendenti dalla volontà dell'uomo;
- la diffusione accidentale dell'agente dovuta a cause indipendenti dalla volontà dell'uomo ma in cui l'uomo ha delle responsabilità;
- la disseminazione intenzionale nell'ambiente da parte dell'uomo con conseguente eventuale ulteriore diffusione.

Per agente biologico si intende un qualsiasi microrganismo anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni (*D.Lgs. 81/08*, titolo X, art. 267).

Esistono numerose tipologie di agenti biologici (quali batteri, virus, miceti, etc.) che sono comunemente presenti nell'ambiente ed in alcuni casi possono provocare l'insorgenza di malattie nell'uomo. Tale possibilità dipende da diversi fattori legati alle caratteristiche del singolo agente biologico, alle condizioni del soggetto esposto, alle condizioni ambientali ed alle modalità di esposizione e/o contatto.

Secondo il *D.Lgs. 81/08*, in recepimento di normative internazionali, gli agenti biologici possono essere così generalmente ripartiti in base alla loro capacità di provocare malattia ed in base alla disponibilità di misure profilattiche e terapeutiche:

- agenti di gruppo 1: presentano poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;
- agenti di gruppo 2: possono causare malattie nell'uomo e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghino nella comunità e sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche;
- agenti di gruppo 3: possono causare malattie gravi nell'uomo e costituire un serio rischio per i lavoratori; possono propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche;
- agenti di gruppo 4: possono provocare malattie gravi in soggetti umani e possono presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili di norma, efficaci misure profilattiche e terapeutiche.

I diversi agenti biologici possono essere ulteriormente classificati in relazione ad alcune caratteristiche che ne definiscono la pericolosità nei confronti della salute:

- Infettività: è la capacità di un agente di penetrare e moltiplicarsi nell'ospite;
- Patogenicità: è la capacità di produrre malattia in seguito alla penetrazione nell'organismo;
- Trasmissibilità: è la capacità dell'agente di essere trasmesso da un soggetto infetto ad uno sano;
- Neutralizzabilità: è la possibilità di essere in possesso di strumenti preventivi e/o terapeutici.

La via di trasmissione di un determinato agente può essere singola o multipla. Alcuni agenti infettivi possono essere trasmessi attraverso vie multiple. Si è soliti suddividere le modalità di trasmissione di un agente biologico in:

- Modalità parenterale: trasmissione degli agenti biologici attraverso il sangue o liquidi biologici contenenti sangue. Malattie trasmesse con questo meccanismo sono ad esempio l'AIDS, l'epatite B, l'epatite C.
- Modalità aerea: gli agenti patogeni sono emessi dalle vie aeree dei soggetti infettati in piccolissime particelle in grado di essere ri-respirate da soggetti recettivi. Malattie trasmesse con questo meccanismo sono ad esempio la tubercolosi, il morbillo, la varicella.
- Per goccioline (*droplets*): gli agenti patogeni sono emessi dalle vie aeree dei soggetti infettati in particelle più grossolane che in un breve spazio (1 metro) cadono a terra. In caso di contatto ravvicinato (entro 1 metro) tali particelle possono contaminare soggetti recettivi. Malattie trasmesse con questo meccanismo sono ad esempio la meningite meningococcica e la pertosse.
- Per contatto: gli agenti patogeni presenti sulla superficie corporea dell'organismo infetto possono infettare la superficie corporea di un soggetto suscettibile. Malattie trasmesse con questo meccanismo sono ad esempio l'herpes, la scabbia. Il meccanismo descritto riguarda le malattie trasmesse per contatto diretto. Esiste anche la possibilità che alcuni agenti patogeni possano

- Modalità orofecale: oggetti, cibi, o altro contaminati con le feci di malati infetti portati alla bocca di soggetti recettivi possono comportare in questi ultimi infezioni. Un esempio di malattia trasmessa con questo meccanismo è la salmonellosi.
- Modalità sessuale: trasmissione attraverso il contatto sessuale. Generalmente per agenti patogeni che non sopravvivono all'ambiente esterno se non per periodi molto brevi. Malattie trasmesse con questo meccanismo sono ad esempio la sifilide e la gonorrea.

## 2.1 Naturale, antropico, bellico, terroristico

E possibile suddividere i nuovi scenari di rischio biologico in:

- Naturali (epidemie e pandemie), legati anche alla più celere distribuzione dei patogeni a causa dell'odierna - potenziata - mobilità degli individui.
- Accidentali: rischio di incidenti ad impianti e strutture industriali o ad aziende che prevedono la lavorazione e/o lo stoccaggio di agenti biologici; rischio di fughe di agenti biologici da laboratori biotecnologici.
- Bellico/terroristici, in relazione alla minaccia internazionale, rappresentata soprattutto dai paesi arabo-islamici.

Nel 1962, il medico statunitense Frank *Macfarlane Burnet* scriveva "si può pensare alla metà del ventesimo secolo come alla fine della più importante rivoluzione sociale della

storia, l'eliminazione virtuale delle malattie infettive come un fattore significativo nella vita sociale".

La quanto mai ottimistica previsione di Macfarlane Burnet si scontra con le attuali stime che correlano il 25% dei decessi annuali alle malattie infettive. E' interessante notare inoltre come questa stima non contempli le complicanze tardive associate a precedenti infezioni acute (eg. scompenso cardiaco da precedente malattia reumatica valvolare da streptococco o cirrosi in seguito ad epatite cronica da HCV o HBV).

Gli agenti biologici esistono da molto prima che esistesse l'uomo; sono presenti in enorme quantità e varietà nell'ambiente, sulla superficie corporea umana ed all'interno dell'organismo stesso. Gli esseri umani, nella loro evoluzione, si sono sviluppati tenendo conto di questa realtà: ciò vuol dire che non sono destinati a vivere in un ambiente sterile (privo cioè di agenti biologici), ma al contrario sono naturalmente attrezzati per convivere con essi e per difendersene se necessario. D'altro canto, il rapporto che intercorre tra agenti biologici ed esseri umani è così stretto che non sarebbe possibile altrimenti; un solo esempio: gran parte delle vitamine sono prodotte dai batteri che colonizzano l'intestino umano (Alberts, 2002).

Generalmente (con le dovute eccezioni) gli agenti biologici dannosi per l'uomo sono suoi ospiti stretti: vivono cioè bene all'interno dell'organismo in condizioni per loro ideali di temperatura, umidità, ossigenazione, nutrimento, etc. Al contrario, al di fuori dell'organismo quasi tutti sopravvivono con difficoltà e, se sopravvivono, stentano a moltiplicarsi, perdendo sovente gran parte delle capacità aggressive. Oltre che per queste criticità ambientali, il contatto fra uomo ed agenti biologici in grado di provocare infezione non comporta automaticamente che si verifichi la malattia anche in considerazione del fatto che l'essere umano è dotato di un potente sistema immunitario. Perché l'evento malattia si verifichi è necessario quindi che si verifichi una o più delle seguenti condizioni (Nester et al., 1978; Prescott et al., 1996; Bistoni; La Placa, 2012):

- Vengano saltate le difese naturali (eg. ferita cutanea che produce una lesione di continuità);
- Sia presente un adeguato numero di agenti infettanti;

- L'agente biologico sia in grado di infettare l'ospite;
- Le difese dell'organismo siano indebolite (eg. malattie che immuno-deprimono, come l'AIDS o il diabete).

Numerose sono le attività lavorative ed antropiche che espongono i soggetti ad un rischio biologico più o meno elevato. Tranne poche eccezioni legate ad alcune attività lavorative tra cui gli ambienti sanitari, il rischio biologico è spesso poco conosciuto e presumibilmente sottostimato in molti luoghi di lavoro, dagli ambienti *indoor* non industriali (uffici, scuole), ai settori della filiera agroalimentare (allevamenti, trasformazione di prodotti alimentari, mangimifici, ecc.), al comparto dei rifiuti solidi urbani e della depurazione di acque reflue civili, e così via, proprio a dimostrare che nessun ambiente può considerarsi esente dalla presenza di agenti biologici. Infatti, sono diversi i fattori che possono favorire lo sviluppo e la diffusione di agenti biologici: il tipo di attività, il processo o la fase lavorativa, le materie utilizzate, il contatto con fluidi biologici umani o animali potenzialmente infetti, la presenza di polvere, la scarsa igiene, il cattivo funzionamento e la manutenzione degli impianti idraulici, la presenza ed il numero di occupanti, il microclima, etc.

Il rischio biologico è dunque trasversale e presente tanto in attività lavorative in cui "tradizionalmente" è riconosciuta la presenza di agenti biologici quali allevamenti o macelli, quanto in attività caratterizzate sempre più spesso da rischi "emergenti", quali gli aeroporti e il trasporto aereo, o attività frutto della moda degli ultimi anni, come i centri che effettuano *piercing* e tatuaggi. A ciò va sicuramente aggiunto anche quel mondo professionale, in crescita esponenziale negli ultimi anni, che riguarda l'assistenza familiare ad anziani, disabili e malati.

Le preoccupazioni sul rischio di contagi ed epidemie, provocati da attacchi terroristici con agenti biologici, sono cresciute nel corso degli ultimi anni in modo parallelo all'allarme terrorismo. Tuttavia la guerra biologica non è una novità dei nostri giorni: la storia ci fornisce esempi di impiego di tali armi fin dai tempi più remoti. La prassi di catapultare cadaveri morti di peste o colera nelle fortezze in fase di assedio, ovvero contaminare pozzi e rifornimenti di acqua o di alimenti sono eventi ampiamente

documentati nell'antichità: all'epoca infatti l'arma biologica era l'unico mezzo che poteva essere impiegato per colpire molte persone contemporaneamente (Cenciarelli et al., 2013b).

I progressi della scienza ed in particolare della biologia molecolare, della genetica e delle biotecnologie hanno aperto nuove frontiere, rivoluzionando la concezione di arma biologica: non più un'arma costituita da agenti biologici naturali, ma aggressivi progettati e costruiti secondo le esigenze operative. Le attuali conoscenze tecnico-scientifiche potrebbero essere impiegate a scopo bellico per aumentare la virulenza di agenti patogeni già naturalmente presenti in ambiente o rendere patogeni agenti biologici normalmente innocui.

La resistenza ai farmaci, l'insensibilità ai tradizionali vaccini e ai fattori immunologici, la possibilità di influire sulla persistenza all'ambiente naturale e all'azione di sostanze bonificanti sono caratteristiche che possono conferire agli aggressivi biologici particolare gravità. Le nuove conoscenze di biologia molecolare e le innovative tecniche di ingegneria genetica, tuttavia, non hanno comportato solamente un aumento della minaccia dell'arma biologica: esse sono infatti di grandissimo aiuto per sviluppare sistemi utili per la rivelazione e la protezione, elementi indispensabili per attuare una efficace difesa biologica.

Il CDC statunitense (*Centers for Disease Control and Prevention*) suddivide le armi biologiche usate nel bioterrorismo in tre categorie, a seconda della facilità di diffusione e del rischio maggiore o minore di malattia letale che provocano (Tabella 1):

<b>Gruppo</b>	<b>Patologia</b>	<b>Agente eziologico</b>
A	Antrace	<i>Bacillus anthracis</i>
	Botulino	<i>Clostridium botulinum</i> toxin
	Peste	<i>Yersinia pestis</i>
	Vaiolo	<i>Variola major</i>
	Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>
	Febbri emorragiche virali	<i>Filoviruses and Arenaviruses</i>
B	Brucellosi	<i>Brucella spp.</i>
	Tossina Y	<i>Clostridium perfringens</i>
	Salmonellosi	<i>Salmonella spp., E.coli O157:H7, Shigella</i>
	Morva	<i>Burkholderia mallei</i>
	Melioidosi	<i>Burkholderia pseudomallei</i>

	Psittacosi	<i>Chlamydia psittaci</i>
	Febbre Q	<i>Coxiella burnetii</i>
	Tossina ricinica	<i>Ricinus communis</i>
	Enterotossina stafilococcica B	<i>Staphylococcus spp.</i>
	Febbre tifoide	<i>Rickettsia prowazekii</i>
	Encefalite virale	<i>Alphaviruses</i>
	Gastroenteriti	<i>Vibrio cholerae, Cryptosporidium parvum</i>
C	Patologie infettive emergenti	<i>Nipahvirus and Hantavirus</i>

**Tabella 1: Principali agenti biologici potenzialmente utilizzabili come armi (CDC, 2013).**

Categoria A; comprende organismi e tossine altamente pericolose per la collettività per:

- la facile diffusibilità o trasmissione da persona a persona;
- il loro potere altamente letale;
- i fenomeni di panico e di isteria collettiva che possono causare;
- la necessità di adottare speciali contromisure su vasta scala per la tutela della salute pubblica.

Categoria B; comprende organismi moderatamente pericolosi per:

- la loro diffusibilità su scala ridotta;
- la capacità di provocare malattie potenzialmente meno letali;
- la necessità di misure di monitoraggio della salute pubblica meno intensive rispetto alla categoria A

Categoria C; comprende organismi patogeni emergenti, potenzialmente modificabili attraverso l'ingegneria genetica per essere trasformati in armi biologiche. Questi agenti presentano:

- facile disponibilità nell'ambiente;
- facile produzione;
- alto potenziale in termini di virulenza e di impatto sulla salute pubblica.

I metodi di disseminazione degli agenti biologici si basano sull'esistenza di diversi criteri e le vie di penetrazione attraverso cui gli aggressivi possono introdursi nell'organismo umano sono prevalentemente tre: l'apparato respiratorio, quello cutaneo e quello digerente (Nester et al., 1978; Prescott et al., 1996; Bistoni; La Placa, 2012).

La contaminazione può pertanto avvenire per via inalatoria con aggressivi disseminati sotto forma di aerosol; attraverso la pelle attraverso la puntura di alcune specie di insetti che possono svolgere il ruolo di vettori per determinate malattie o per ingestione di acqua o viveri contaminati.

La deliberata disseminazione di aggressivi biologici, sia direttamente che per contagio, mira a 1) colpire un elevato numero di persone; 2) provocare malattie gravi che necessitano di trattamenti intensi e prolungati e 3) diffondere la malattia mediante contagio. Si presenta inoltre con le seguenti caratteristiche: capacità di sfuggire agli usuali sistemi di rilevamento e di produrre sintomi aspecifici simili a comuni malattie endemiche, rendendo così complicata l'esatta diagnosi.

Un attacco terroristico, di qualsiasi tipo esso sia, mette a dura prova il sistema sanitario dell'area in cui si verifica e, nel caso di un attacco con agenti biologici, dell'intero Paese o addirittura del mondo. A differenza dell'attacco con esplosivi o con agenti chimici, gli attacchi con agenti biologici determinano una potenziale disseminazione di microrganismi o tossine con conseguenze non facilmente prevedibili e, comunque, potenzialmente catastrofiche (Cenciarelli et al., 2013). Il problema è quanto mai rilevante alla luce di numerosi fattori, tra cui:

- l'esistenza nel mondo di numerosi conflitti attivi;
- la prevenzione di azioni terroristiche, che risulta estremamente difficile dal punto di vista organizzativo e dispendiosa da quello finanziario;
- la pronta identificazione e l'interdizione di terroristi intenzionati ad utilizzare armi biologiche, che rimane una sfida estremamente difficile da realizzare;
- il progressivo disfacimento dell'ex blocco sovietico, che ha potenzialmente reso disponibili, ed a basso costo, tecnologie, competenze ed esperienze per la manipolazione e la produzione di agenti biologici utilizzabili a fini offensivi;

- la produzione di armi biologiche, meno costose delle armi convenzionali e del nucleare; non a caso gli agenti biologici vengono detti “l’atomica dei poveri”;
- la facile accessibilità, specialmente in passato, ad informazioni su agenti biologici altamente patogeni attraverso Internet, con descrizione estremamente dettagliata delle tecniche di isolamento e coltura;
- l’esistenza di numerose fonti di agenti patogeni. Al mondo esistono diverse centinaia di collezioni ufficiali di colture di microrganismi, e di queste si calcola che almeno 54 comprendano l’antrace e 18 la peste.

La diffusione intenzionale di agenti biologici è assimilabile alla comparsa e diffusione epidemica di un pericoloso agente infettivo in una comunità, con le relative conseguenze in termini di sofferenza, morte, sconvolgimento dell’assetto organizzativo e della struttura sociale dell’area o del paese in cui l’evento si verifica. I microrganismi hanno sempre condizionato la storia del pianeta e, fin dall’antichità, gli stati sono stati chiamati a mettere in atto misure di sanità pubblica per limitare l’impatto negativo delle epidemie.

La recente epidemia di SARS ha dimostrato, specialmente in Cina ed in Canada, quale può essere l’impatto negativo di un evento epidemico ed ha evidenziato i dilemmi con i quali si debbono confrontare i “decisionari” di un paese per affrontare l’evento, tra cui la crisi del sistema sanitario che si determina rapidamente e l’impatto negativo sull’economia. Il modello di risposta ad un evento terroristico con agenti biologici rispecchia quello da mettere in atto per affrontare un’epidemia grave e letale. Nel caso dell’attacco bioterroristico i problemi possono essere amplificati dalle implicazioni politiche, dalla paura di altri attentati, dai rischi di limitazione dei valori e dei diritti democratici, dalle distorsioni delle informazioni riportate dai mezzi di comunicazione di massa.

Di fronte ad una minaccia di tale portata è diventato obbligatorio definire le politiche per approntare con immediatezza l’intervento preventivo e stabilire le reali necessità per finanziare tali attività ed i settori in cui privilegiare l’intervento. L’approccio della sanità pubblica al bioterrorismo è sostanzialmente sovrapponibile alla battaglia per il controllo delle infezioni emergenti e riemergenti. Nel caso di attacchi con agenti

biologici, analogamente ai casi non immediatamente identificabili e numericamente quantificabili, il contagio interumano può determinare casi secondari prima che la malattia si manifesti. Solo l'identificazione precoce dei casi, la disponibilità di strutture diagnostiche adeguate, la possibilità di mettere prontamente in atto misure di isolamento per i casi accertati o sospetti, la capacità di adottare una stretta sorveglianza sanitaria, possono limitare la diffusione dell'infezione.

## 2.2 Psicologia del rischio biologico

Un evento biologico, sia esso di tipo naturale, accidentale o terroristico, genera nella popolazione un elevato stress psicologico. Non dovendo andare troppo in là con la memoria, basti pensare alle recenti psicosi da pandemia influenzale che hanno coinvolto la popolazione mondiale, addizionando problemi alle criticità già presenti nella gestione dell'emergenza (corsa ai farmaci, intasamento delle linee telefoniche di ospedali e centri specializzati, abuso di antibiotici, ipocondria diffusa). A livello militare, in particolare, le armi biologiche sono particolarmente inefficaci, se confrontate con le armi convenzionali, eppure generalmente sono in grado di generare terrore in maniera sensibilmente maggiore rispetto a quest'ultime. A livello comunicativo, i *mass media* associano il termine arma biologica con il termine terrore, utilizzando il neologismo bioterrorismo. Questo vocabolo viene associato mentalmente a sensazioni quali paura, confusione ed incertezza, legate soprattutto all'insidiosità ed all'invisibilità dell'agente biologico. Gli effetti psicologici di un evento biologico di qualsiasi natura possono essere a breve e a lungo termine. A breve termine, quello che si verifica è la diffusione di panico su larga scala, indipendentemente dal fatto che l'agente biologico sia effettivamente in via di diffusione o questa sia soltanto un'ipotesi. Studi effettuati da psicologi hanno evidenziato che il panico che si diffonde in seguito all'avviso della potenzialità di diffusione di un agente biologico è maggiore della paura per un rischio di bombardamento. A titolo esemplificativo, basti pensare che il 29.11.2001 l'odore di vernice in una scuola dello stato di Washington (USA) fu scambiato per un attacco bioterroristico, causando il ricovero ospedaliero di 17 persone tra docenti e studenti. Pochi giorni dopo oltre 1000 studenti di diverse scuole di Manila (Filippine) sommersero gli ospedali locali con sintomi come tosse e raffreddore dopo la notizia di un possibile attacco bioterroristico nella zona. Questo dimostra come l'amplificazione

mediatica di un evento biologico possa creare il panico diffuso, aggiungendo quindi al potenziale effetto dannoso dell'agente stesso il rischio di importanti danni psico-sociali. Il governo americano ha stimato che il panico per un eventuale attacco bioterroristico nella metropolitana di Washington DC provocherebbe maggiori danni alla struttura ed interruzioni del servizio che lo stesso attacco e le conseguenze ad esso strettamente correlate. Basti pensare che durante la Guerra del Golfo ci furono 4500 allarmi di attacco bioterroristico nella sola Washington DC, anche se nessuno fu confermato. Seppure le conseguenze a breve termine di un potenziale attacco con armi biologiche possono essere in linea di massima meno gravi degli scenari apocalittici propinati dai media, le conseguenze a lungo termine possono essere peggiori delle previsioni; l'esperienza di passati eventi, confermati o presunti, fornisce alcuni argomenti sui quali si focalizzano le preoccupazioni circa la salute dei colpiti a lungo termine:

- Lesioni croniche derivanti direttamente dalle malattie causate dall'agente;
- Esiti avversi sulla fertilità e sulla capacità riproduttiva;
- Effetti psicologici generalizzati;
- Aumento dei livelli di sintomatologie per patologie diverse da quelle causate dall'agente;

Il livello generale di malessere, paura ed ansia può rimanere molto elevato per diversi anni dopo l'evento, esacerbando disturbi psichiatrici preesistenti ed intensificando ulteriormente il rischio di patologie sociali di massa; inoltre l'intrinseca incertezza circa gli effetti a lungo termine sulla salute aumenterà ulteriormente il livello di ansia nei colpiti. Poiché le autorità sanitarie non possono essere in grado di fornire garanzie circa l'assenza di effetti a lungo termine, generalmente in seguito ad un evento di tipo B si genera una frustrazione negli esposti ed in seguito una sfiducia crescente nel sistema di sicurezza sanitaria del paese, privando di fatto le istituzioni statali della fiducia di cui necessitano per gestire le fasi di recupero e mantenimento della stabilità. Infine, dalle ipotesi generalmente controverse circa gli effetti a lungo termine sulla salute in seguito all'esposizione ad agenti B, deriveranno probabilmente questioni scientifiche negli anni successivi, provocando un continuo riemergere della problematica con conseguente acutizzazione delle conseguenze psicologiche nei colpiti.

Un aspetto da non sottovalutare durante un'emergenza di tipo B è la comunicazione, sia tra gli attori impegnati nella risposta (comunicazione interna) che tra i rappresentanti delle istituzioni e la popolazione (comunicazione esterna). La comunicazione interna comprende tutte le comunicazioni (formali ed informali) che un'organizzazione mantiene con tutte le persone che operano all'interno dell'organizzazione stessa. Allargando il panorama di studio, per comunicazione interna si può intendere anche l'insieme di messaggi che intercorrono tra tutte le strutture che conducono l'emergenza, al fine di ottenere un'azione il più possibile sinergica e coordinata. Non volendo entrare nei meriti della comunicazione interna, è invece interessante discutere circa la comunicazione esterna, ossia circa "cosa, quando e in che modo" devono essere fornite le informazioni alla popolazione circa l'emergenza biologica, sia essa presunta o accertata.

Una comunicazione ideale in emergenza dovrebbe contenere un numero medio molto basso di concetti elementari; inoltre spesso in situazioni critiche il numero di canali di comunicazione è inferiore alle richieste (interruzione delle linee telefoniche, interferenze sulle frequenze radio-televisive, ecc.): a tal fine quanto più le persone sanno già cosa deve essere fatto e cosa evitato tanto più i canali di comunicazione andranno lasciati liberi.

E' di estrema importanza valutare quali informazioni vengono fornite, in quanto il loro contenuto influenza il comportamento delle persone coinvolte nella crisi; in particolare:

- Quanto più si sa, tanto più definito il repertorio di comportamenti "utili" tra i quali il soggetto coinvolto può scegliere;
- Quanto più si sa, tanto più si abbassano i livelli di ansia e di incertezza dei soggetti coinvolti.

La tendenza, a volte diffusa, a minimizzare le informazioni circa una crisi – anche se fatta in buona fede nel tentativo di evitare l'insorgenza del panico – in realtà provoca l'effetto opposto; il panico infatti si scatena generalmente quando sono compresenti:

- Scarse o contraddittorie informazioni;
- Sensazione che sia rimasto pochissimo tempo per mettersi in salvo.

In emergenza è importante ricordare che le persone pensano in termini binari: accadrà/non accadrà – bianco/nero. Inoltre, il cittadino medio è normalmente più disposto a seguire un *modus operandi* che gli viene proposto da un'autorità (se ha la sensazione di potersi fidare) piuttosto che i consigli forniti da tecnici esperti.

Un messaggio in emergenza deve quindi contenere contenuti (al minimo) relativi a:

- Cosa sta accadendo e potrebbe accadere, dove, quando (messaggio informativo);
- Quanto ciò che sta accadendo è pericoloso (messaggio interpretativo);
- Chi è a rischio;
- Potenziali perdite;
- Come contenere le perdite (messaggio operativo).

Chi divulga le informazioni in emergenza deve essere una fonte:

- Accreditata;
- Autorevole agli occhi del pubblico;
- Conosciuta già prima della crisi;
- Credibile agli occhi del pubblico;
- Rispettata dal pubblico.

In molte situazioni critiche (come ad esempio un'emergenza B) il rischio non è direttamente percepibile con i sensi (tatto, udito, vista, ecc.) dal pubblico, ma può essere conosciuto soltanto in base alle informazioni fornite dai media. Avere i media dalla propria parte risulta vantaggioso in quanto:

- Il Pubblico spesso è portato a credere a quanto detto in televisione;
- Crede ancora di più se le informazioni sono portate dai propri beniamini televisivi (influenza degli *Opinion Leader*);
- Radio e televisione possono divenire strumento per diffondere informazioni tranquillizzanti e comportamenti adattativi.

In conclusione, lo sviluppo di una subcultura dell'emergenza come formazione ed informazione risulta essere una strategia fondamentale per dare il giusto livello di percezione del rischio, cercando di ricondurlo all'interno di parametri ancorati alla realtà.

### 2.3 Difficoltà di identificazione

A differenza di un agente chimico, radiologico o nucleare (esclusi i casi di dispersioni/diffusioni croniche a basse dosi), un agente biologico può restare silente per ore, giorni, o potenzialmente settimane (a seconda dell'agente) fino a che persone, animali o piante presentino sintomi di malattia. Se non ci sono evidenti ed immediati segnali di dispersione, come nel caso delle lettere all'antrace, un attacco biologico, prima essere rilevato dalle autorità sanitarie, in seguito all'osservazione di un'insolita distribuzione di sintomatologie, può essere soltanto identificato attraverso sistemi di monitoraggio che rivelino agenti patogeni dispersi in aria, in acqua o su superfici. Questo aspetto è di fondamentale importanza in quanto, mentre per gli agenti C ed R sono disponibili apparecchiature in grado di fornire risposte sufficientemente rapide sulla qualità dell'aggressivo presente, per quanto riguarda gli agenti B questa risposta, se si escludono pochissimi agenti ritenuti "potenzialmente utilizzabili" come armi biologiche, è tutt'ora pressoché utopica.

Risulta essenziale evidenziare come un agente biologico goda della capacità di moltiplicazione e diffusione successivamente alla sua naturale comparsa o rilascio, potenzialità che lo distingue sostanzialmente dagli agenti C ed R. Seppure come per questi, infatti, nel caso del rilascio di un agente B è necessario valutare l'area interessata, le quantità disperse e le condizioni meteorologiche, si aggiunge come fattore discriminante la necessità di seguire i percorsi compiuti dai possibili colpiti e la valutazione ed il monitoraggio sanitario di tutti gli individui con cui essi sono entrati in contatto.

Appare chiaro quindi che la gestione della diffusione di un agente B è addizionata di un fattore rischio non trascurabile, in quanto alla estrema difficoltà di identificazione dell'agente si aggiunge la pressoché impossibilità di tracciare i flussi e i contatti di tutti gli esposti, rischiando quindi di rendere vane le azioni intraprese al fine di limitare la diffusibilità e la diffusione dell'agente stesso.

## **3. La guerra biologica ed il bioterrorismo**

Da Silva (1999) ha definito la guerra biologica come l'uso intenzionale di microrganismi e tossine, generalmente di origine microbica, vegetale o animale, per produrre patologie tra gli esseri umani, tra gli animali e nelle coltivazioni. Guerra biologica e bio-terrorismo sono argomenti molto complessi, soprattutto a causa dei diversi agenti che possono essere utilizzati come armi e per la vasta gamma di modalità per la diffusione nell'ambiente e la popolazione. Un evento biologico prevede la presenza di almeno due variabili: uno o più agenti patogeni (batteri, virus o tossine) e un veicolo per la loro diffusione. Oltre all'elevata capacità di diffusione ed alla letalità degli agenti biologici, loro invisibilità e le oggettive difficoltà di rilevazione a breve termine rendono impossibile l'immediata identificazione. Le armi biologiche (tranne, ad esempio, le tossine e le spore batteriche), possiedono inoltre una qualità unica che non hanno altre armi non convenzionali (come sostanze chimiche e radiologiche); gli agenti biologici infatti sono in grado di moltiplicarsi nell'organismo ospite e di trasmettersi a loro volta in nuovi ospiti, generando in questo modo effetti imprevedibili nella popolazione, sia in termini di numero di vittime che di diffusione geografica (Rotz et al., 2002).

Tra le ragioni che rendono attraenti le armi biologiche, è importante considerare il loro costo molto basso rispetto sia alle armi convenzionali che non convenzionali. Secondo dati elaborati dalla NATO (1996) nel 1969 da esperti statunitensi, i costi per un attacco su una superficie di 1 km<sup>2</sup> sono di 1\$/km<sup>2</sup> utilizzando armi biologiche, 600\$/km<sup>2</sup> con armi chimiche, 800\$/km<sup>2</sup> con armi nucleari e 2,000\$/km<sup>2</sup> utilizzando armamenti convenzionali. Inoltre, i recenti progressi nelle biotecnologie hanno reso relativamente semplice produrre grandi quantità di agenti biologici con strumenti e competenze a disposizione di tutti, anche di gruppi terroristici e paramilitari.

### 3.1 Storia della guerra biologica e convenzioni internazionali

L'uso di agenti biologici come armi di guerra non è una novità dell'era moderna. Anche se non è facile individuare il preciso momento in cui l'uso di armi biologiche ha preso piede, antichi documenti dimostrano che in epoca pre-cristiana, intorno al 300 aC, i Greci erano soliti contaminare i pozzi d'acqua dei nemici con cadaveri di animali.

Questa strategia è stata utilizzata anche la dai Romani e Persiani (SIPRI, 1971a). In epoca successiva, durante la battaglia di Tortona nel 1155, sono stati usati i cadaveri dei soldati e degli animali per contaminare i pozzi d'acqua da parte delle truppe dell'imperatore Barbarossa (Clarke, 1968). Nel 14° secolo, durante l'assedio di Caffa (ora Teodosia, Ucraina, una città vicino al Mar Nero, a quel tempo sotto il controllo dei genovesi) da parte dei Tartari, si diffuse un'epidemia di peste nel loro esercito. Gli assediati pensarono di catapultare i cadaveri dei loro compagni morti entro le mura della città di Kaffa: ciò fu un punto di svolta nella guerra. I genovesi fuggirono da Kaffa, portando con sé i loro malati e durante il viaggio di ritorno a Genova, essi toccarono diversi porti nel Mar Mediterraneo. Alcune fonti ritengono una possibile correlazione tra l'epidemia di peste di Kaffa e la pandemia che ha decimato la maggior parte della popolazione europea nei decenni successivi (Morte Nera), tuttavia la maggior parte autori ritengono i due eventi indipendenti (Wheelis, 2002).

Nel 1422, durante l'assedio di Carolstein, soldati lituani catapultati all'interno della città cadaveri ed escrementi, terrorizzando la popolazione colpita e diffondendo, in molti casi, febbri letali (Newark, 1988). Il successivo uso documentato di agenti biologici come arma si è verificato più di tre secoli dopo. Durante la guerra franco-indiana (1754-1767), il comandante britannico Sir Jeffrey Amherst, ordinò la distribuzione di coperte infette con il vaiolo per decimare la popolazione delle tribù indiane ostili agli inglesi. La distribuzione di coperte infette avvenuto nell'estate del 1763 provocò la recrudescenza del virus tra gli indigeni per oltre 200 anni (Bhalla & Warheit, 2004).

Durante la prima guerra mondiale avvennero diverse azioni di guerra biologica, tuttavia molte di queste non sono sufficientemente confermate in letteratura. Tuttavia, diverse fonti riportano che i tedeschi inocularono bestiame con *Bacillus anthracis* e con *Pseudomonas mallei*, responsabili di causare malattie gravi come antrace e morva, prima di inviarli in stati nemici (SIPRI, 1971a; Poupard e Miller, 1992; Hugh-Jones, 1992). La prima guerra mondiale ha visto l'uso su vasta scala di armi non convenzionali di tipo chimico, mentre la seconda guerra mondiale vide un più ampio uso di armi biologiche. Durante questa guerra, molti paesi hanno condotto programmi di ricerca per lo sviluppo di armi biologiche; il programma giapponese, condotto sotto la direzione del generale Shiro Ishii, è stato sicuramente il più ambizioso (1892-1959). La ricerca in

questa direzione è iniziata nel 1928; nel corso di questo anno, il generale Ishii ha visitato diversi paesi europei e americani per imparare tecniche ed informazioni utili circa i possibili usi delle armi biologiche. Al ritorno in patria, al generale venne fornito un contributo sostanziale al fine di costituire un enorme centro di ricerca sulle armi biologiche, conosciuto come Unità 731, che venne costruito a Beiyinhe in Manciuria. Il gruppo di ricerca era composto da oltre 3.000 scienziati, principalmente microbiologi. Vennero condotti numerosi esperimenti su prigionieri di guerra, principalmente soldati coreani, cinesi e russi. I prigionieri sono stati usati per testare numerose armi biologiche, tra cui *Yersinia pestis*, *Vibrio colera*, *Neisseria meningitidis* e *Bacillus anthracis* (Leitenberg, 2001). Christopher et al. (1997) riportano che durante questa ricerca, diverse migliaia di prigionieri morirono a causa degli esperimenti condotti; il tasso di mortalità intorno alla zona della 731 è rimasto inoltre molto elevato per diversi anni. Se nel computo totale si considerano anche questi decessi, si raggiunge la considerevole cifra di 200.000 morti a seguito delle attività svolte dal capitano Ishii (Harris, 2002). Nel 1942, lo scarso controllo della diffusione di un'infezione nell'area 731 ha provocato la morte di 1.700 soldati giapponesi (Sokolski & Ludes, 2001).

Molte altre nazioni hanno condotto esperimenti su potenziali agenti biologici, tuttavia le informazioni riportate in letteratura sono piuttosto limitate. E' importante citare gli esperimenti condotti nel 1942 da parte dell'esercito britannico sull'isola di Gruinard, al largo della costa Scozia, dove sono state testate bombe sporche contaminate con spore di antrace (Manchee et al., 1981). L'isola è stata contaminata e resa inabitabile fino al 1990, quando è stata effettuata una vasta bonifica del territorio utilizzando formaldeide miscelata ad acqua di mare (Aldhous, 1990).

Fino alla seconda guerra mondiale, gli Stati Uniti rimasero notevolmente indietro rispetto ad altri paesi nel campo della ricerca sulle armi biologiche. L'età d'oro per lo sviluppo di armi biologiche negli Stati Uniti fu subito dopo la conclusione della seconda guerra mondiale, quando poté esaminare i risultati degli esperimenti condotti dall'unità giapponese 731. Gli Stati Uniti inoltre hanno collaborato direttamente con il generale Ishii, l'ex direttore della Unità 731 (Christopher et al., 1997).

Nel settembre del 1950 la Marina degli Stati Uniti ha condotto un esperimento sui civili al fine di valutare la vulnerabilità di una grande città costiera americana ad un attacco

biologico. Una nube di *Serratia marcescens* (un batterio a bassa patogenicità principalmente responsabile di infezioni della pelle e delle vie respiratorie), venne diffuso da una barca nella baia di San Francisco. A seguito di verifiche successive, risultò che quasi tutta la popolazione (1 milione di persone) venne colpita dall'infezione. Anche se il batterio era quasi innocuo, alcuni individui mostrarono effetti di malattie respiratorie ed alcuni di loro morirono (Christopher et al., 1997). Pochi anni dopo (1956-1958), in Georgia e Florida, vennero rilasciati sciame di zanzare, probabilmente portatrici di febbre gialla, al fine di verificare la vulnerabilità ad un attacco aereo. Anche se i documenti circa quest'operazione sono ancora *top secret*, diverse fonti riportano che diversi individui morirono in seguito alle punture degli insetti. L'ultimo esperimento su larga scala, consistette nella diffusione di *Bacillus subtilis* nella metropolitana di New York nell'estate del 1966. L'esperimento causò infezioni, anche se asintomatiche, di più di un milione di persone. Questo test dimostrò che, a causa dello spostamento di aria nei tunnel, era possibile la diffusione di un agente patogeno in tutta la rete metropolitana a partire da un'unica stazione (Zygmunt, 2006).

Nel 1970, l'URSS ha condotto un ambizioso programma di ricerca sulle armi biologiche, ma, a differenza dei programmi degli Stati Uniti, su cui il segreto è stato parzialmente rimosso, un alone di mistero permane ancora sui programmi di ricerca russi. Secondo Davis (1999), l'Unione Sovietica, tra il 1973 ed il 1974, costituì un'organizzazione chiamata "Direzione Principale per le Preparazioni Biologiche (Biopreparat), con lo scopo di sviluppare e produrre armi biologiche. Anche se non esistono dati univoci circa il numero di individui impiegati nel Biopreparat, si ritiene che più di 50.000 persone lavorarono nel sistema, tra scienziati e tecnici, distribuiti in 52 stabilimenti di ricerca e produzione. In queste strutture sono stati studiate e prodotte elevate quantità di agenti eziologici di peste, tularemia, antrace, morva, vaiolo ed encefalomielite. Oltre ad utilizzare agenti biologici provenienti da fonti naturali, nei Biopreparat vennero applicate tecnologie di ingegneria genetica per aumentare l'aggressività degli agenti naturali al fine di generarne di più patogeni e facilmente diffusibili, nonché per renderne l'identificazione più complessa.

Tra i paesi che hanno sviluppato un massiccio programma di ricerca sulle armi biologiche, nell'era post II guerra mondiale, un posto di sicuro interesse spetta all'Iraq.

Il programma di ricerca iracheno nel campo della guerra biologica è ufficialmente iniziato nel 1974, contestualizzato in un'organizzazione chiamata "Organizzazione di Stato per il Commercio e l'Industria" (Davis, 1999). Il programma prevedeva lo studio e la produzione di tossina botulinica, antrace, aflatoxina e ricina, nonché agenti antipianta ed agenti virali, come il rotavirus, congiuntivite infettiva emorragica e vaiolo di cammello. Il programma ha coinvolto circa 300 scienziati, che hanno completato la loro formazione nei paesi dell'Europa occidentale (Leitenberg, 2001).

Anche dopo la ratifica del BWC, un gran numero di paesi ha continuato a sviluppare, produrre e testare agenti biologici per scopi militari. Dal 1980, diversi gruppi terroristici hanno considerato le armi biologiche come uno strumento altamente destabilizzante per la società civile e per l'economia. L'avvento su larga scala delle biotecnologie e la ridotta difficoltà nella produzione di organismi geneticamente modificati hanno reso possibile la produzione di agenti patogeni multiresistenti ai farmaci e con fattori di virulenza potenziati. L'uso di agenti biologici negli ultimi decenni risulta quindi principalmente attribuibile a celle terroristiche, più o meno isolate, che hanno utilizzato armi biologiche come strategia per difendere idee religiose estremiste colpendo le popolazioni civili o obiettivi governativi sensibili (Cronin, 2004). Ciò crea forti preoccupazioni poiché l'uso di armi biologiche da parte dei terroristi potrebbe creare scenari inaspettati caratterizzati da un enorme potenziale distruttivo.

Nel 1984, in The Dalles, Oregon, Stati Uniti, un gruppo di estremisti seguaci di Bhagwan Shree Rajneesh (anche conosciuto come Osho) contaminarono l'insalata in 10 diversi *salad-bar* con l'agente patogeno della salmonellosi, *Salmonella thyphimurium*, al fine di disabilitare la popolazione in vista delle vicine elezioni. Un totale di 751 persone contrassero la malattia e molti di loro sono ebbero bisogno di ricovero in ospedale. Anche se non ci sono stati decessi, questo atto è considerato il più massiccio attacco bioterroristico nella storia degli Stati Uniti (Török et al., 1997). Nel 1990, il culto giapponese Aum Shinrikyo testato diverse armi biologiche, tra cui la tossina botulinica, l'antrace, il colera e la febbre Q e, nel 1993, durante una missione umanitaria in Africa, cercarono di ottenere campioni del virus Ebola. Tra il 1990 e il 1995, il culto ha tentato di effettuare, con scarso successo, una serie di atti di bioterrorismo a Tokyo con agenti biologici vaporizzati, tra cui tossina botulinica e spore di antrace (Olson, 1999).

Un significativo evento bioterroristico si è verificato negli Stati Uniti, contestualmente ai drammatici attentati al World Trade Center di New York nel settembre 2001. Attraverso il sistema postale degli Stati Uniti sono state rilasciate spore di *Bacillus anthracis* attraverso lettere indirizzate alla stampa ed ai funzionari governativi. In seguito a quest'atto terroristico, si sono verificati 22 casi di contaminazione da antrace, distribuiti in 12 cutanei e 10 inalatori. I 12 pazienti affetti da antrace cutanea hanno risposto positivamente al trattamento antibiotico, mentre dei 10 casi di antrace inalatoria, 4 sono risultati fatali (McCarthy, 2001). Nel 2002, a Manchester, Regno Unito, sei terroristi sono stati arrestati per essere stati trovati in possesso di ricina, e nel 2004, tracce della stessa tossina sono stati trovati al Dirksen Senate Office Building a Washington DC (Bhalla & Warheit, 2004).

L'uso degli aggressivi biologici utilizzabili per offesa di tipo bellico è proibito a livello internazionale. Ciò è regolato da specifiche convenzioni ratificate da gran parte degli stati della comunità internazionale.

Le prime misure contro l'uso di armi biologiche sono state prese nel 19° secolo durante la conferenza dell'Aja del 1899 e successivamente, confermate ed ampliate nel 1907, con un documento firmato e ratificato da 24 paesi (Leitenberg, 2001). Nel 1925, la consapevolezza degli orrori della prima guerra mondiale, soprattutto per quanto riguarda l'uso di armi chimiche, ha portato a concepire il protocollo di Ginevra circa il divieto dell'uso in guerra di gas asfissianti, tossici o simili e di mezzi batteriologici. Anche se questo trattato è stato firmato da un considerevole numero di nazioni (gli Stati Uniti lo ratificarono tuttavia solo negli anni '70), esso vieta solo l'uso di agenti biologici come armi, ma non il loro sviluppo né il loro stoccaggio (Christopher et al., 1997).

In considerazione della limitata efficacia del protocollo di Ginevra nel controllo dello sviluppo di armi biologiche e della loro proliferazione, nel 1972 è stata stipulata la convenzione sulla proibizione dello sviluppo, produzione ed immagazzinamento delle armi batteriologiche (biologiche) e sulla loro distruzione (BWC). Inizialmente firmata da più di 100 nazioni, la convenzione è entrata in vigore nel 1975. Tuttavia, questa convenzione, simile al protocollo di Ginevra, presentava diverse lacune. Innanzitutto, non ha fornito linee guida circa le verifiche di applicazione. Inoltre, essa vieta solo l'uso e lo sviluppo di armi biologiche in quantità che non hanno alcuna giustificazione per

scopi pacifici o protettivi (Riedel, 2004). Appare evidente come questa affermazione sia suscettibile di interpretazione, in quanto non definisce le quantità limite o limitazioni sostanziali per lo sviluppo e la produzione di armi biologiche (SIPRI 1971b, 1973). Gli eventi conseguenti alla ratifica della convenzione sulle armi biologiche (BWC) nel 1972, fino alle più recenti, hanno confermato questa osservazione: basti pensare al numero di eventi bioterroristici verificatisi dopo il 1972 (vedi paragrafo precedente) per capire che la convenzione non ha impedito la proliferazione delle armi biologiche .

### 3.2 Agenti biologici da guerra e bioterroristici

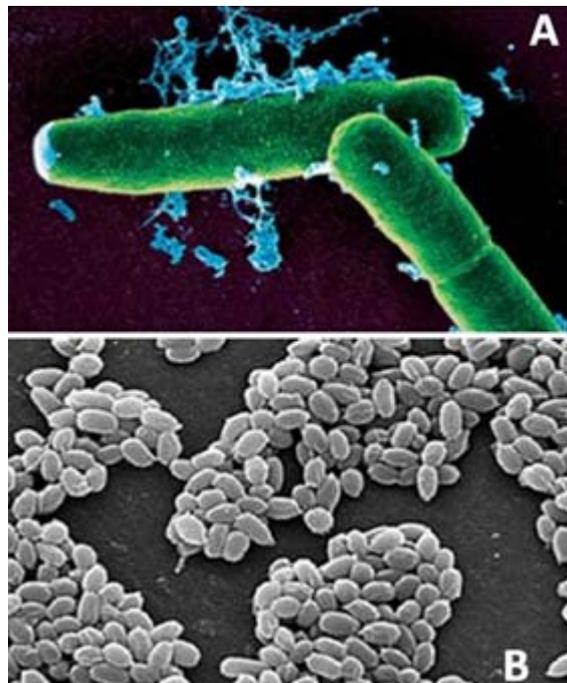
Esistono numerosi agenti patogeni (batteri, virus e tossine) in grado di provocare patologie negli esseri umani, in animali e nelle piante, tuttavia solo pochissimi possiedono le caratteristiche ideali per essere un arma biologica. Eitzen (1997) ha descritto le caratteristiche che fanno di un agente biologico una potenziale arma biologica; un arma biologica dovrebbe innanzitutto essere facile da trovare o produrre, in quanto per sviluppare un attacco biologico verso obiettivi sensibili, sono necessari grandi quantità di agenti biologici. Bisogna infatti tenere in considerazione che è necessario utilizzare un buon numero di agenti biologici (o una certa quantità di tossina) per generare la patologia. L'arma biologica ideale deve avere una elevata capacità di inabilitare il bersaglio o, in alternativa, possedere un'elevata letalità; è opportuno scegliere un agente con un periodo di incubazione più o meno lungo a seconda se sono richiesti effetti differiti o immediati. Altre caratteristiche importanti per un'arma biologica sono la via di trasmissione e, quindi, la facilità di diffusione attraverso una determinata via. Infine, deve essere considerata la stabilità dell'agente, soprattutto quando devono essere conservati grandi quantitativi per periodi indefiniti (Kortepeter & Parker, 1999).

#### 3.2.1 batteri

- *Bacillus anthracis* è un batterio sporigeno Gram-positivo, non mobile, anaerobio facoltativo, solitamente circondato da una capsula. È l'agente eziologico del

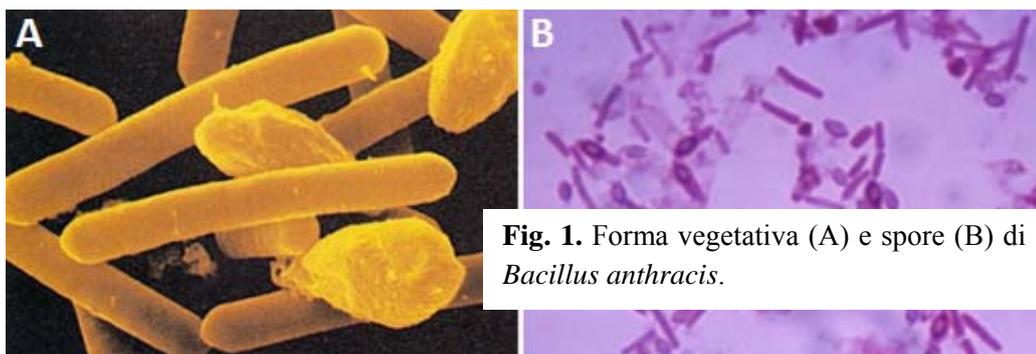


La patologia è causata dall'azione di una tossina prodotta dalla forma vegetativa del bacillo, che consta di tre componenti: un antigene protettivo (PA), un fattore di edema (EF) ed un fattore letale (LF). PA si lega ai recettori cellulari, mediando l'ingresso di EF e LF nella cellula. Un ulteriore fattore di virulenza dell'antrace è rappresentato dall'acido D-glutammico, un polipeptide che riveste la capsula della forma vegetativa (WHO, 2004). Si possono verificare tre forme di antrace: cutanea, respiratoria e gastrointestinale. La forma cutanea è la più comune ed è caratterizzata da ulcere cutanee e pruriginose che evolvono in un'escara di colore nero con gonfiore delle ghiandole linfatiche adiacenti ed edema (WHO, 2004). Sintomi accessori sono una locale linfadenite e la febbre, mentre è raro l'insorgere di setticemia (Moquin & Moquin, 2002). L'antrace cutanea, se non trattata, può diventare sistemica ed è fatale nel 5-20% dei casi. Le forme inalatoria e gastrointestinale sono meno comuni. La forma inalatoria inizia con sintomi simil-influenzali che includono febbre, stanchezza, brividi, tosse secca, vomito, sudorazione, mialgia, dispnea, confusione, mal di testa e dolori toraco-addominali, seguiti dallo sviluppo di cianosi, shock, coma ed, infine, morte. La forma gastrointestinale è caratterizzata da febbre, nausea, vomito, dolore addominale e sangue nelle feci. L'infezione orofaringea, d'altra parte, è accompagnata da gonfiore edematoso del collo, spesso seguito da febbre e da coinvolgimento linfoide (WHO, 2004). Non esistono prove di diffusione diretta della patologia tra individui (Yuen, 2001). Dopo l'esposizione, il periodo d'incubazione può variare da 1 a 7 giorni, con possibile estensione



fino a diverse settimane, a seconda di fattori diversi, tra cui la carica batterica iniziale. E' disponibile un vaccino, che tuttavia viene attualmente somministrato a scopo preventivo solo nei militari negli USA (WHO, 2004). Per quanto riguarda la terapia, esistono tre tipi di antibiotici efficaci contro *B. anthracis*: ciprofloxacina, tetracicline e penicilline (Bhalla & Warheit, 2004). Per la diagnosi e la ricerca di laboratorio, le manipolazioni che coinvolgono campioni clinici richiedono un livello di biosicurezza 2 (BSL-2), mentre per le manipolazioni che prevedono una produzione significativa di aerosol è strettamente richiesto un BSL-3 (WHO, 2004).

- *Clostridium botulinum* è un batterio sporigeno anaerobio obbligato, agente eziologico del botulismo; può essere isolato dal suolo, che rappresenta il suo *habitat* naturale. Sono conosciute quattro specie di *C. botulinum*, caratterizzate da diversi genomi. Inoltre, vengono distinti sette tipi antigenici di tossina botulinica (AG) per l'assenza di cross-neutralizzazione. La tossina è responsabile dell'insorgere della patologia; è un polipeptide a doppia catena, costituita da una catena pesante di 100 KDa connessa attraverso un ponte disolfuro ad una catena leggera di 50 KDa. La tossina è una endopeptidasi contenente zinco che blocca le vescicole contenenti acetilcolina, impedendone la fusione con la membrana terminale dei motoneuroni, con conseguente paralisi muscolare flaccida (Arnon et al., 2001). La tossina botulinica è la tossina più letale finora scoperta, e tutti i sette tipi di agiscono in modo simile. La morte spesso si verifica come conseguenza di una paralisi dei muscoli faringei e diaframmatica, seguite da arresto respiratorio (Bhalla & Warheit, 2004). Esistono tre forme di botulismo umano, distinte a seconda dell'origine di contaminazione in alimentare, cutanea ed intestinale.

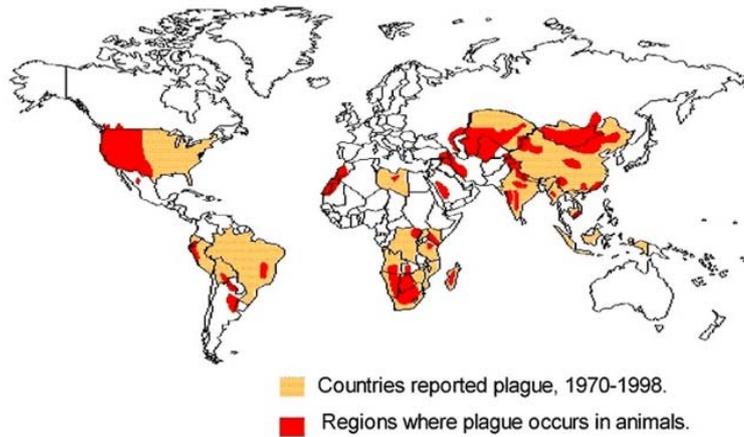


**Fig. 1.** Forma vegetativa (A) e spore (B) di *Bacillus anthracis*.

**Fig. 2.** Forma vegetativa (A) e forma vegetativa e spore (B) di *Clostridium botulinum*.

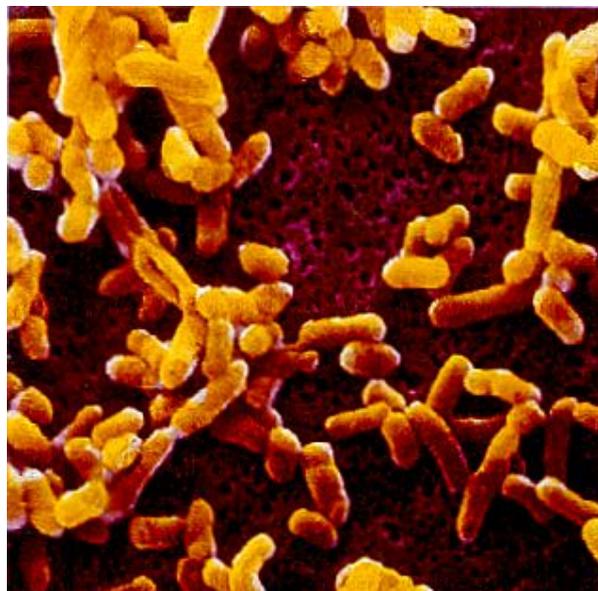
Tutte le forme di botulismo sono causate dall'assorbimento ematico della tossina botulinica da una ferita o dalla superficie mucosale; dopo l'infezione, il periodo di incubazione dipende dalla velocità e dalla quantità di tossina assorbita, e può andare da due ore ad otto giorni. I pazienti affetti da botulismo mostrano stati febbrili e presentano paralisi flaccida discendente con associata paralisi bulbare. La terapia consiste nell'immunizzazione passiva con antitossina equina, accompagnata da terapia di supporto. Il botulismo può essere prevenuto con la somministrazione di un vaccino pentavalente costituito da varie tossine (ABCDE); è inoltre in fase di sviluppo un vaccino ricombinante. Per le pratiche di laboratorio, le manipolazioni richiedono un livello di biosicurezza 2 (BSL-2), mentre per le pratiche che prevedono una produzione significativa di aerosol è richiesto un BSL-3 (Arnon et al., 2001).

- *Yersinia pestis* è un coccobacillo non-mobile, Gram-negativo non sporigeno, in grado di crescere sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Può rimanere vitale per giorni in terreno umido o acqua, ma viene ucciso dall'esposizione diretta alla luce solare (WHO, 2004). Rappresenta l'agente eziologico della peste, una malattia che può colpire gli esseri umani e gli animali (La Placa, 2010). I roditori selvatici sono i portatori dell'agente patogeno e la trasmissione ad altri animali avviene attraverso le pulci infette, i tessuti, il suolo contaminato o l'esposizione a goccioline respiratorie. Nelle zone rurali in cui la patologia è endemica, gli individui che entrano in contatto con gli ospiti selvatici di *Y. pestis* possono essere colpiti dalla peste, che esiste in due forme, bubbonica e polmonare (WHO, 2004).



**Fig. 3.** Diffusione mondiale di peste nel 1998 (WHO, 2000).

La peste bubbonica si presenta se il vettore della patologia è rappresentato dalle pulci; il periodo di incubazione è di 2-6 giorni dopo l'esposizione. A livello sintomatologico, si verifica un ingrossamento dei linfonodi (bubboni), associata a comparsa di febbre, brividi, mal di testa, nausea e vomito; se non trattata, la peste bubbonica può decorrere in setticemia. La peste polmonare è provocata dall'inalazione di microorganismi o dall'esposizione a sangue infetto. Il tipico sintomo della peste polmonare è la tosse produttiva con espettorato striato di sangue; può diffondersi da persona a persona con le goccioline di espettorato (La Placa, 2010). La terapia antimicrobica risulta efficace se iniziata immediatamente dopo il presentarsi dei sintomi: essa consiste nella somministrazione di antibiotici quali streptomina o gentamicina. Sostanze antimicrobiche alternative sono rappresentate dalle tetracicline, doxicilline, cloramfenicolo, fluorochinoloni, ciprofloxacina e sulfamidici. Il vaccino contro la peste è consigliato solo per i gruppi ad alto rischio, come ad esempio il personale di laboratorio. La vaccinazione con il batterio morto o attenuato è efficace contro la peste bubbonica, ma non contro la peste polmonare. Per le pratiche di laboratorio che coinvolgono materiali infetti e colture è richiesto un livello di biosicurezza 2 (BSL-2), mentre per le pratiche che prevedono una produzione significativa di



**Fig. 4.** Bacilli di *Yersinia pestis*.

aerosol o il contatto diretto con le pulci infette è richiesto un BSL-3 (WHO, 2004).

- *Francisella tularensis* è un piccolo coccobacillo aerobico Gram-negativo, non mobile, intracellulare facoltativo. Esso è responsabile di una seria zoonosi chiamata tularemia. Esistono due sotto-specie del batterio: *F. tularensis tularensis* (tipo A) e *F. tularensis palaeartica* (tipo B). Il tipo A è più virulento del tipo B (WHO, 2004). Il microorganismo può sopravvivere fino a diverse settimane nel suolo, nell'acqua, nella paglia e nella terra (Bhalla & Warheit, 2004). Molti animali selvatici (conigli, castori, topi muschiati, lepri, arvicole) rappresentano il bacino naturale dell'agente patogeno; gli esseri umani possono



**Fig. 5.** Bacilli di *Francisella tularensis*.

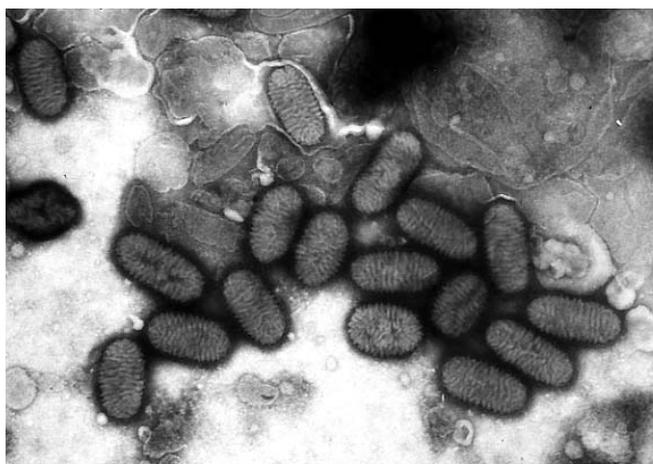
essere infettati se morsi da artropodi, attraverso l'ingestione di cibo e di acqua contaminati, e per inalazione di particelle aerosoliche. Anche il contatto diretto con animali infetti può risultare

pericoloso per l'uomo, tuttavia non è mai stata osservata la trasmissione interpersonale (Bhalla & Warheit, 2004). Il periodo d'incubazione è generalmente pari a 3-5 giorni, può tuttavia estendersi fino a 14 giorni. I sintomi della malattia dipendono dalla virulenza dell'agente infettivo. Esistono due differenti manifestazioni cliniche, una tularemia ulcero-ghiandolare (75% dei casi) ed una tularemia tifoidea (25% dei casi). La prima è caratterizzata da ulcere a livello del sito di contaminazione e dal gonfiore delle ghiandole linfatiche locali; mentre la tularemia tifoidea indica una patologia sistemica senza apparente sito di infezione primaria, caratterizzata da faringite e linfadenite cervicali (Bhalla & Warheit, 2004). Il trattamento farmacologico d'elezione consiste nella somministrazione di streptomina intramuscolare. Come farmaco alternativo può essere utilizzata la gentamicina per via parenterale, mentre per la profilassi pre-esposizione, è attualmente disponibile un vaccino vivo attenuato.

Per la profilassi antimicrobica, in caso di contatto con potenziali fonti d'infezione, si consiglia la somministrazione orale di doxicicline o di ciprofloxacina per 14 giorni dopo l'ultimo giorno di esposizione. Per le manipolazioni routinarie di campioni clinici umani ed animali sono raccomandate pratiche BSL - 2, mentre per le manipolazioni che prevedano il rischio di produzione di aerosol infettivi sono raccomandate pratiche BSL- 3 (Bhalla & Warheit, 2004).

### 3.2.2 Virus

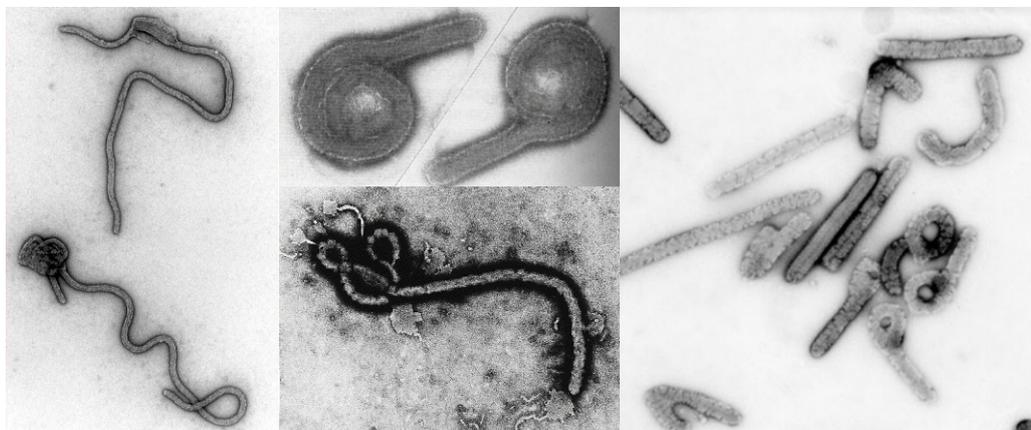
- *I Poxviridae* comprendono una famiglia di virus geneticamente correlati, di grandi dimensioni, forniti di *envelope*, con genoma a DNA, che si replicano esclusivamente all'interno del citoplasma delle cellule (Moss, 2007). Solo i membri del genere *Orthopoxvirus*, che include il vaiolo umano, il vaiolo delle scimmie e il vaiolo bovino possono infettare l'uomo. Tra questi, solo il vaiolo è facilmente trasmissibile da persona a persona attraverso le goccioline di saliva, le secrezioni nasali e gli oggetti contaminati. La manifestazione clinico-patologica più comune di vaiolo è rappresentata da una forma sistemica della malattia nota come *Variola major* caratterizzata da una mortalità compresa tra il 30 ed il 40%. Dopo la fase infettiva iniziale della mucosa orofaringea o respiratoria, ed il periodo asintomatico di incubazione (7-17 giorni), molti pazienti presentano febbre alta e malessere. Appaiono quindi, sulla mucosa della bocca e della faringe, sul viso e sugli avambracci, dei *rash* maculopapulari che si diffondono man mano al tronco ed alle gambe. Questa rappresenta la fase più contagiosa a causa degli alti titoli virali presenti nei tessuti orofaringei. Entro 1-2 giorni, il *rash* diviene vescicolare e successivamente pustoloso. Successivamente si sviluppano croste che, se l'individuo sopravvive, lasciano cicatrici caratteristiche (Knipe et al., 2001). Una manifestazione più grave ma molto meno comune di *Variola major*, nota come vaiolo maligno o



**Fig. 6.** Microfotografia elettronica di virus del vaiolo.

emorragico, è associato ad un tasso di mortalità vicino al 100% (Fenner et al., 1988). Gli esseri umani sono gli unici ospiti noti del virus; ciò ne ha facilitato l'eradicazione globale nel 1980, dopo il successo della campagna di vaccinazione globale da parte dell'OMS, che è stata pertanto successivamente interrotta (Fenner et al., 1988). La cessazione della vaccinazione ha esposto non solo le popolazioni al rischio di un attacco bioterroristico, ma anche alla possibile infezione con poxvirus zoonotici (Rimoin et al., 2010). Attualmente, non ci sono trattamenti disponibili per l'infezione da vaiolo; il trattamento prevede terapia di supporto con antipiretici e trattamenti anti-infiammatori per alleviare il dolore e la febbre. Gli antibiotici sono indicati solo in caso di eventuali super-infezioni batteriche (Knipe et al., 2001; Bhalla & Warheit, 2004). Qualsiasi utilizzo del vaiolo *in vivo* a scopo di ricerca deve essere approvato dal WHO e necessita di un BSL- 4: tra i laboratori autorizzati, uno è situato presso il CDC di Atlanta (USA) e l'altro è presso il State Research Center di Virologia e Biotecnologie a Koltsovo (Russia) (DHHS, 2009).

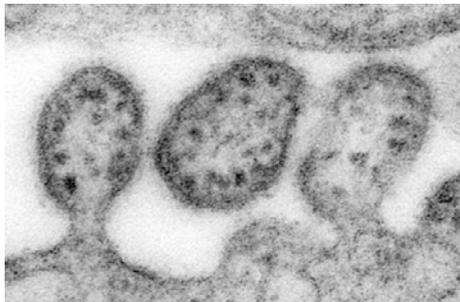
- La famiglia *Filoviridae* (dal termine latino *philum*, riferendosi alla forma del virione), comprende virus a RNA con genoma a polarità negativa, con *envelope*, che provocano febbri emorragiche negli esseri umani e nei primati non umani. La famiglia comprende due generi distinti: *Marburgvirus* ed *Ebolavirus*. Il genere *Marburgvirus* comprende una sola specie e due membri, Marburg (MARV) e Ravn (RAVV). Il genere *Ebolavirus* comprende cinque specie, ognuna delle quali consta di un solo membro; Zaire *Ebolavirus* (EBOV), Sudan *Ebolavirus* (SUDV), Tai Forest *Ebolavirus* (TAFV), Bundibugyo *Ebolavirus* (BDBV) e Reston *Ebolavirus* (RESTV) (Adams & Carstens, 2012). I *carrier* naturali di questi virus non sono stati ancora identificati; l'RNA di *Ebolavirus* è stato trovato nei mammiferi in Africa centrale. Numerosi gruppi di ricerca hanno identificato i pipistrelli africani, asiatici e forse anche europei come *reservoir* naturali dei *filovirus*. I pipistrelli possono trasmettere il virus agli esseri umani direttamente o tramite ospiti intermedi, tra cui i primati ed i suini. A seguito della trasmissione agli esseri umani, la diffusione del virus tra gli individui avviene per contatto diretto con il sangue o altri liquidi biologici da pazienti



**Fig. 7.** Microfotografia elettronica di membri della famiglia *filoviridae*.

- La famiglia *arenaviridae* comprende virus con genoma a RNA a singolo filamento di polarità negativa, con *envelope*, che causano infezioni croniche nei roditori ed una malattia zoonotica negli esseri umani (Salvato et al., 2011). Il genere *arenavirus* comprende 22 specie virali che, sulla base dei dati genetici e geografici, sono divise in due gruppi: quello del “Vecchio Mondo” (OW) e

quello del “Nuovo Mondo” (NW). Il gruppo OW comprende il virus della coriomeningite linfocitaria (LCMV), distribuito a livello mondiale, che causa meningoencefalite asettica acuta negli esseri umani, ed altri virus endemici nel continente africano, tra cui *Lassavirus* (LASV) e *Lujovirus* (LUJV), che causano febbre emorragica (HF). Il gruppo NO è ulteriormente suddiviso in tre cladi: A, B e C, di cui B è il più rilevante in termini di patologia umana, dal momento che comprende la maggior parte degli *arenavirus* responsabili di febbri emorragiche in Sud America (Charrel & de Lamballerie, 2003). La trasmissione del virus avviene generalmente attraverso il contatto con secrezioni umane infette o con materiali contaminati con gli escrementi di un roditore infetto, mentre la trasmissione secondaria tra individui umani può verificarsi solo con specifici virus, tra cui Lassa, Machupo e Lujo (Weber & Rutala, 2001). Per quanto concerne la febbre emorragica, dopo 1-2 settimane di incubazione, l’infezione produce una vasta gamma di sintomi, tra cui mal di testa, tosse, mal di gola, nausea, vomito e diarrea. Possono insorgere diverse complicazioni, quali versamenti pleurici, complicanze neurologiche, edema facciale e sanguinamento delle mucose. Fasi avanzate della malattia sono spesso associate a *shock* e morte (Schattner et al., 2013). Non sono disponibili né vaccini approvati né trattamenti profilattici o terapeutici contro l’infezione da *arenavirus*. Attualmente la terapia consiste nella somministrazione della ribavirina, associata ad una terapia di supporto (Vela, 2012). È richiesto il BSL-4 per la manipolazione di tutti gli *arenavirus* che provocano febbre emorragica, mentre è consigliato servirsi di laboratori con BSL-2/3 per la manipolazione degli altri *arenavirus* (DHHS, 2009).



**Fig. 8.** Microfotografia elettronica di virioni di virus Lassa.

### 3.3 Nuovi scenari

La diffusibilità dei patogeni, siano essi utilizzati dall'uomo volontariamente per un attacco bellico/terroristico, ossia si tratti di nuovi ceppi patogeni naturalmente presenti dopo fenomeni di mutazione, rappresenta un importante argomento di analisi al fine di valutarne la rapidità di diffusione e le potenziali conseguenze per la salute. I movimenti di masse di popolazioni umane sono state un fattore importante nella storia della diffusione delle malattie infettive. Gli esempi più lampanti sono stati forse l'esplorazione e la colonizzazione delle Americhe da parte degli Europei e la successiva importazione di schiavi dall'Africa che ha portato, con sé infezioni come l'influenza, la malaria, il morbillo, il vaiolo, la scarlattina o la febbre gialla. Nei paesi europei, gli stranieri – soprattutto lavoratori immigrati – sono responsabili tra il 4 ed il 50% dei casi di tubercolosi riportati nel 1992, e l'incidenza di malattie infettive tra gli stranieri è da due a venti volte più alta che quella registrata tra le popolazioni indigene. È importante sottolineare come la tipologia più comune dell'emigrante sia quella di essere giovane, maschio e sano e l'incidenza di malattie infettive dell'emigrante nel paese ospite aumenta significativamente con il degrado delle condizioni socio-sanitarie. Le scienze demografiche sono estremamente utili ed avranno sempre più influenza sullo studio delle infezioni emergenti e riemergenti. Nel 1990, solo il 5% della popolazione mondiale viveva in città con più di 100.000 abitanti. Si stima che nel 2025, il 61% dell'umanità, o più di 5 miliardi di persone vivranno in città. In passato, l'isolamento geografico impediva che un episodio isolato di colera, febbre gialla, peste od ebola diventasse un'epidemia. Questo tipo di protezione non esiste più. Le barriere che impedivano la circolazione di agenti infettivi stanno scomparendo rapidamente e nuovi metodi di trasmissione di agenti infettivi stanno facendo la loro apparizione sul mondo. L'esempio del volo Hong-Kong Pechino del 15 marzo 2003 con a bordo numerosi casi di SARS è la più chiara esemplificazione della circolazione microbica nel mondo globale. Negli ultimi decenni la mobilità di individui e merci ha subito un incremento esponenziale, basti pensare che il 20% degli individui dei paesi industrializzati compiono annualmente viaggi extrafrontalieri, e che il 5% di questi sono viaggi intercontinentali. Conseguentemente risulta semplice comprendere come un patogeno

sia potenzialmente diffusibile a livello globale con tempi che sono sensibilmente inferiori alla settimana, considerato soprattutto che il periodo maggiormente critico al fine della diffusibilità è rappresentato dal periodo di incubazione. Nel periodo di incubazione infatti non appaiono generalmente sintomi rilevanti, o per lo meno specifici, della patologia in essere, per cui il soggetto colpito prosegue invariate le sue attività. In tal senso è necessario notare come i patogeni maggiormente aggressivi (eg. Ebola virus) restino generalmente localizzati in quanto, a fronte della loro letalità e rapidità di azione, non permettono ai colpiti una mobilità in grado di far propagare l'infezione. Secondo questo principio, è possibile considerare questi patogeni come "autolimitanti". Altre infezioni invece, come ad esempio i ceppi virali influenzali, hanno potenzialità di diffusione globali in brevissimo tempo. Con l'avvento delle biotecnologie si è verificato un potenziamento della distribuzione su larga scala, a livello mondiale, di strutture industriali e laboratori che dispongono di microorganismi (batteri e virus) non soltanto per ricerca di base ma sui quali applicano ingegnerizzazioni al fine di adattarli agli scopi più disparati, dall'applicazione in agricoltura alla terapia di patologie umane. L'aumento di luoghi dove si manipolano microorganismi, soprattutto in paesi in via di sviluppo, dove non è possibile verificare la corretta applicazione di tutte le norme di sicurezza, pone in essere un forte rischio di rilasci accidentali, che possono avvenire sia per errori di progettazione o gestione delle strutture come pure per errori umani o in seguito a calamità naturali qualora le strutture non siano perfettamente in grado di rispondere ad eventi quali terremoti o incendi.

Risulta perciò evidente come la possibilità di un rilascio accidentale sia tutt'altro che remota; differenti studi (su cui gravitano tuttavia numerose perplessità da parte della comunità scientifica) propongono che si tratti di rilasci accidentali di microorganismi bioingegnerizzati anche la diffusione delle ultime pandemie influenzali (aviaria e suina). Tuttavia nessun dato può dare una conferma definitiva di questa eventualità.

Una ricorrente problematica in ambito di nuovi ed imprevedibili scenari è quella rappresentata dalle patologie emergenti e riemergenti. Queste sono causate da agenti infettivi identificati negli ultimi venti anni o di cui si è osservato negli ultimi anni un'importante recrudescenza. Tali patologie sono causa importante di mortalità nei paesi sottosviluppati, particolarmente tra neonati, minori di 5 anni ed anziani, mentre

nelle nazioni sviluppate esse colpiscono quasi esclusivamente settori di popolazioni minoritarie e svantaggiate dal punto di vista socio-economico. D'altro canto però, nei paesi più sviluppati, tali patologie sono oggetto di sempre maggiore interesse: alcuni degli agenti infettivi identificati come emergenti o riemergenti, ad esempio le febbri emorragiche, possono essere infatti considerati agenti potenzialmente utilizzabili come arma biologica mediante la produzione di aerosol di particelle microbiche o mediante il contatto diretto ed indiretto. Emerge con forza quindi la stridente contraddizione secondo cui patologie che da decenni sono tra le prime 5 cause di mortalità nei paesi poveri stanno ora ricevendo un'inattesa attenzione per l'ipotetica minaccia di rilascio intenzionale nei paesi ricchi. L'elemento comune di molti agenti infettivi che causano le infezioni emergenti o riemergenti è quello di essere virus ad RNA a singola elica: il SARS-coronavirus, HIV, HCV, le febbri emorragiche tra cui Ebola, e la West Nile appartengono tutti a questa classe. Tali virus sono intrinsecamente caratterizzati dall'elevato numero di mutazioni genomiche che, in assenza di meccanismi di riparazione/correzione, possono produrre strutture proteiche tali da rendere il virus stesso capace di adattarsi ad un nuovo ospite: ecco il razionale per il salto di specie dal serbatoio animale all'uomo. È questo il caso dell'epidemia di *Severe Acute Respiratory Syndrome* – SARS, la prima malattia trasmissibile del XXI secolo. Sembra che questa infezione sia stata causata dal salto di specie di un nuovo coronavirus da un roditore presente nel sud della Cina, lo zibetto, le cui carni sono ampiamente utilizzate ed apprezzate nella cucina cinese. L'esempio classico del salto di specie è rappresentato dal virus influenzale "A" che periodicamente va incontro a meccanismi di riassortimento genetico, chiamati *antigenic shift*, tra virus influenzale umano ed aviario. Tale *antigenic shift* ha portato alle pandemie influenzali del 1888, 1918, 1957 and 1968. Prima del 1997, erano però stati segnalati pochi casi di influenza aviaria nell'uomo (cioè senza riassorbimento genetico con un virus influenzale umano); al contrario, a partire da quella data i casi umani di influenza aviaria sono diventati sempre più frequenti: l'epidemia del 1997 da virus influenzale aviario H5N1, l'epidemia del 2003 da H7N7 in Olanda, sino alla recente epidemia dei primi mesi del 2004 da H5N1 in Vietnam e Thailandia. Il timore che nell'uomo o in un animale intermedio (il maiale, ad esempio) co-infetto con virus influenzale aviario ed umano si potesse assistere ad un riassortimento di materiale genetico è stato certamente elevato; la nuova ondata

epidemica aviaria da H5N1 attualmente in corso in Asia fa supporre che la minaccia di una nuova pandemia influenzale possa ugualmente ripresentarsi nel prossimo autunno-inverno.

## **4. Rivelazione**

### 4.1 Stato dell'arte

Gli agenti biologici risultano efficaci a dosi molto basse. Pertanto, i sistemi di rivelazione devono possedere un'elevata sensibilità; devono cioè essere in grado di rilevare quantità di particelle estremamente limitate. Un *background* ambientale variabile ed in rapida evoluzione, richiede inoltre che i sistemi di rilevamento posseggano un elevato grado di selettività, siano cioè in grado di discriminare agenti biologici pericolosi da altre componenti biologiche e non biologiche innocue presenti nell'ambiente. Una ulteriore necessità che deve essere valutata è la velocità della risposta. Questi requisiti, combinati, rendono possibile comprendere come la sfida tecnica, al fine di ottenere dei sistemi di rilevamento efficaci sia ardua. A questa evidenza è da aggiungere che lo sviluppo delle apparecchiature di rilevamento di agenti biologici è stato, storicamente, meno presente nel mercato commerciale rispetto allo sviluppo di sistemi di rilevamento per agenti chimici o radiologici.

Alcuni promettenti strumenti per la rilevazione di agenti biologici sono stati sviluppati e testati soprattutto in ambito militare. Si tratta tuttavia, di sistemi complessi, il cui utilizzo richiede una corposa formazione, sia per il corretto funzionamento che per la manutenzione; questi strumenti sono inoltre molto costosi da acquistare e mantenere. Negli ultimi anni, soprattutto dopo l'attentato al World Trade Center di New York e la diffusione delle "lettere all'antrace" attraverso il sistema postale degli Stati Uniti (2001), numerose aziende hanno posto l'attenzione sullo sviluppo di strumenti di rilevazione biologica con costi e capacità di utilizzo più contenute rispetto ai prodotti di derivazione militare.

#### *4.1.1 Background ambientale*

L'ambiente è un mezzo estremamente complesso e dinamico. I cambiamenti fisici, chimici, biologici e meteorologici dei costituenti ambientali possono alterare la capacità di individuare particelle biologiche. Per comprendere l'effetto complessivo che l'ambiente può avere sulla rilevazione degli agenti biologici, bisogna considerare il *background* fornito dal particolato, il *background* biologico ed il *background* ottico.

#### 4.1.1.1 *Background* costituito dal particolato

Il particolato presente nell'atmosfera può provenire da diverse fonti. La polvere, il polline, e la nebbia sono tutti esempi di particelle naturalmente presenti nell'aria. Anche le particelle artificiali come i prodotti di scarico dei motori e il fumo provenienti dagli effluenti industriali (ciminiere) contribuiscono in modo significativo al particolato ambientale. Pertanto, il particolato può essere definito come la combinazione di particelle non patogene di origine naturale ed antropica in atmosfera. Gli agenti biologici (escluse le tossine) sono costituiti da cellule, costituiscono quindi il particolato patogeno. Il *background* fornito dal particolato può cambiare nel giro di un minuto in funzione delle condizioni meteorologiche del momento. Ad esempio, il particolato nei pressi di una strada cambierà radicalmente a seconda che ci sia traffico o se la strada sia vuota, allo stesso modo, se c'è poco vento, vengono mosse poche particelle in atmosfera, tuttavia, quando il vento inizia a soffiare, può trasportare molto particolato. Un buon sistema di rilevamento biologico deve pertanto essere in grado di discriminare tra le particelle naturalmente presenti in atmosfera e gli agenti biologici aereodispersi. Per monitorare in tempo reale le variazioni del *background* costituito dal particolato possono essere utilizzati contatori di particelle. Se il numero di particelle aumenta rapidamente, è possibile che sia avvenuta una diffusione/rilascio di agenti biologici; tuttavia va sottolineato che i contatori di particelle non sono in grado di determinare se le particelle siano polvere, polline, scarichi di motore, o agenti biologici. Altri test, più sensibili e selettivi, possono essere eseguiti sui particolati per determinare se sono presenti agenti biologici. Alcuni contatori di particelle sono pertanto equipaggiati con un sistema in cui il contatore di particelle attiva un campionatore in grado di raccogliere un campione di particolato per successive analisi di laboratorio più dettagliate.

#### 4.1.1.2 *Background* biologico

L'ambiente naturale è ricco di organismi viventi che costituiscono un complesso *background* biologico dal quale è necessario individuare agenti biologici non naturalmente presenti. La sfida per un sistema di rilevamento biologico è di essere in grado di discriminare un segnale specifico fornito da agenti biologici patogeni escludendo o minimizzando eventuali segnali provenienti dal *background* biologico non patogeno; se si considera la varietà e la quantità di agenti biologici presenti naturalmente nell'ambiente, è possibile comprendere come questa sfida sia tutt'altro che semplice. La ricerca ha identificato una varietà di potenziali fonti di bio-aerosol: inceneritori di immondizia, discariche, aree industriali, caseifici, etc. Diversi studi hanno dimostrato che la concentrazione di bioaerosols dipende dal luogo: in un contesto urbano è sei volte maggiore rispetto alle zone costiere e quasi tre volte superiore di un ambiente rurale.

#### 4.1.1.3 *Background* ottico

Sistemi come il laser sfruttano le proprietà ottiche per il rilevamento di agenti biologici. I sistemi ottici possono essere influenzati da particolato di dimensioni micrometriche, oltre che da altri ostacoli alla trasmissione della luce come pioggia, nebbia, neve e polvere. Gli aerosol e le precipitazioni possono agire come specchi, riflettendo e diffondendo l'energia luminosa, e nel caso di alcuni aerosol, possono restituire falsi segnali. Pertanto, numerosi sistemi di rilevazione a distanza risentono in varia misura delle precipitazioni e della presenza di aerosol. L'interferenza atmosferica, generalmente, tende ad essere minore nei sistemi che sfruttano i raggi infrarossi rispetto ai sistemi che sfruttano raggi UV.

#### 4.1.2 Selettività del sistema di rivelazione

I sistemi di rilevamento per agenti biologici devono presentare un elevato grado di selettività. La selettività di un sistema di rilevamento può essere definita come la capacità di discriminare in bersagli dagli interferenti ambientali. Il livello con cui la selettività di un sistema è affetta da interferenti dipende dal tipo di misura da effettuare. Ad esempio, la polvere ed i pollini possono essere considerati interferenti per un contatore di particelle, mentre il vapore acqueo e la nebbia rappresentano degli interferenti per i sistemi di rilevazione a distanza nel campo dell'IR. Per il monitoraggio

degli agenti biologici, gli interferenti principali provengono dal *background* biologico. Generalmente, una maggiore selettività del sistema è correlata ad una maggiore elaborazione dei dati ed a più rivelatori; attualmente non esiste in commercio un sistema per la rilevazione di agenti biologici nell'ambiente ad elevata selettività che non combini i dati rilevati da più sistemi.

#### 4.1.3 Sensibilità del sistema di rivelazione

I sistemi di rivelazione devono inoltre presentare un'elevata sensibilità, al fine di essere in grado di rilevare efficacemente basse dosi dell'agente. La sensibilità può essere definita come la più piccola quantità di agente che può essere rilevato in maniera riproducibile superando il rumore di fondo del sistema. Il rumore del sistema può essere definito come la fluttuazione casuale della risposta del rivelatore ed è generalmente associato a piccole variazioni nella composizione elettronica. Altro rumore che inficia la sensibilità è costituito da interferenti ambientali. In un sistema di rilevamento ideale, la sensibilità del sistema definisce la quantità di agente in grado di essere identificata. Gli interferenti riducono la sensibilità, in quanto il sistema necessita di quantità maggiori di agenti per essere discriminati dagli interferenti.

#### 4.1.4 Sensibilità del sistema di campionamento

La via d'esposizione d'elezione per gli agenti biologici è quella inalatoria, pertanto l'identificazione precoce di aerosol risulta essenziale in un sistema di risposta ad un'emergenza biologica. L'identificazione precoce, pur non riducendo le possibilità d'infezione nelle prime fasi di diffusione, permette l'approntamento di opportune strategie di risposta in linea con una tendenza di riduzione del rischio. Ciò può risultare critico per un campionamento ambientale in emergenza (suolo/acqua) per determinare se l'agente biologico è ancora presente. Dal momento che il campionamento è una questione fondamentale per tutti i dispositivi di analisi non *standoff*, il modo in cui si preleva un campione e come esso è gestito può influire sul risultato delle analisi. In uno scenario di raccolta/rilevazione, il campionamento di particolato contenente agenti biologici in aria è particolarmente difficile a causa delle basse efficaci di questi agenti. Per campionare agenti biologici in modo efficace, vengono utilizzati campionatori che

passano gran volumi di aria attraverso il campionatore, concentrando la piccola quantità di agente contenuta in un grande volume di aria in un piccolo volume di acqua, formando così una miscela concentrata di particolato in acqua.

#### 4.2 Tecnologie puntiformi di rilevamento di agenti biologici

L'utilizzo ottimale delle apparecchiature di rilevamento degli agenti biologici in contesti emergenziali dipende essenzialmente dalle caratteristiche delle apparecchiature di rilevamento e dal tipo di agente biologico che deve essere individuato. L'efficacia dello strumento dipenderà pertanto dalla capacità di campionare efficacemente l'ambiente e di fornire una quantità di agenti biologici sufficientemente pura e concentrata per essere identificata attraverso la strumentazione analitica. Attualmente sono in fase di sviluppo numerosi sistemi di rilevamento biologico: in commercio sono disponibili alcuni dispositivi a capacità identificativa limitata (in grado cioè di identificare un numero limitato di agenti) che tuttavia presentano costi proibitivi. Una situazione radicalmente diversa è quella che si osserva quando si considerano le apparecchiature di rilevamento chimico: esistono in commercio varie tecnologie per la rilevazione di agenti chimici e di materiali tossici industriali (TIM), che possono essere acquistate anche a prezzi ragionevoli. La ragione della minore disponibilità di tecnologie di rilevamento biologico è imputabile alla sensibilità estremamente elevata richiesta per l'identificazione bio (a causa, anche, delle basse dosi sufficienti per infettare e diffondere la malattia) ed all'alto grado di selettività necessario (a causa del diversificato *background* biologico nell'ambiente). Un altro motivo per la mancanza di apparecchiature di rilevamento biologico è che gli agenti biologici, rispetto ad agenti chimici, sono sistemi di molecole molto complessi, il che li rende molto più complessi da identificare. La spettrometria a mobilità ionica (IMS), ad esempio, un sistema eccellente (anche se costoso) per la raccolta, il rilevamento e l'identificazione di sostanze chimiche, non è in grado di rilevare o discriminare, nella sua forma attuale, agenti biologici; la necessità utilizzare campioni fortemente concentrati, la relativamente bassa sensibilità e selettività fanno di tutti i rivelatori chimici, nella loro forma attuale, inutilizzabili per il rilevamento di agenti biologici. A causa della necessità di elevate selettività e sensibilità, i sistemi di rilevamento biologici sono dispositivi complessi, costituiti da diverse subunità, ciascuna deputata a svolgere una specifica attività.

#### 4.2.1 Componenti di un sistema *point-deteccion* di rilevazione biologica

L'efficace rilevazione di agenti biologici nell'ambiente richiede un sistema di analisi multicomponente a causa della complessità delle variabili coinvolte nella rilevazione. Anche il processo di rilevamento stesso e l'efficiente uso di materiali di consumo influenzano le performances di rilevazione. I sistemi di rivelazione di agenti biologici sono generalmente costituiti da quattro componenti: 1) l'attivatore, 2) il collettore, 3) il rivelatore e 4) l'identificatore.

##### 4.2.1.1 Attivatore

L'attivatore rappresenta il primo livello di rilevamento; esso è in grado di identificare una variazione nel particolato di fondo, indicando una possibile diffusione di agenti biologici. La rilevazione di un aumento della concentrazione del particolato da parte dell'attivatore provoca l'attivazione dei restanti componenti della sistema di rilevamento. L'attivatore tipicamente monitora continuamente l'aria senza la necessità di utilizzare materiali di consumo, riducendo così i costi logistici. Per ridurre i falsi positivi (allarmi senza la presenza di alcun agente biologico) e i falsi negativi (nessun allarme in presenza di agenti biologici), molti sistemi di rilevamento combinano più tecnologie (utilizzando anche tecnologie di fluorescenza, che offrono maggiore selettività) in un unico strumento. Le più efficaci tecnologie attualmente disponibili sono in grado di rilevare particelle aereosoliche in tempo reale e possono discriminare tra particelle di aerosol biologico ed altre particelle in aria, evitando inutili allerte inviate dal sistema. Ad esempio, un dispositivo di monitoraggio per il particolato dell'aria è allertato da un aumento della concentrazione delle particelle in aria; tuttavia il segnale di allerta parte solo nel caso in cui le particelle vengano riconosciute di origine biologica. Il dispositivo generalmente utilizza un rivelatore a fluorescenza per discriminare le particelle di origine biologica; se si evidenzia un particolato di origine biologica, il dispositivo attiva il collettore per la raccolta del campione.

##### 4.2.1.2 Collettore

Il campionamento di un agente biologico rappresenta una parte cruciale del processo nel sistema di identificazione. La dose efficace per alcuni agenti è estremamente piccola, pertanto devono essere impiegati dispositivi di raccolta altamente efficienti. Un tipo di

collettore sfrutta delle pompe che mescolano volumi d'aria con l'acqua in un compartimento isolato. Attraverso questo strumento tutto il particolato presente in un determinato volume d'aria viene solubilizzato in acqua; quindi viene concentrato attraverso parziale evaporazione dell'acqua. Dopo la concentrazione, il campione viene spostato nella porzione analitica del sistema di rivelazione.

#### 4.2.1.3 Rivelatore

Dopo che il campione è stato raccolto e concentrato, occorre determinare l'origine biologica delle particelle. A questo scopo, il campione viene flussato attraverso un componente analitico di rilevamento generico, che è in grado di classificare il campione in macrocategorie (eg. spore, batteri, tossina, virus). Semplificando quindi, il rivelatore agisce come "gateway" per successive analisi. Se il campione presenta caratteristiche biologiche, viene indirizzato al successivo livello di analisi. Se il campione non presenta tali caratteristiche, non viene passato al successivo livello di analisi, riducendo così il consumo di materiale.

#### 4.2.1.4 Identificatore

Un identificatore è un dispositivo che identifica il particolare tipo di agente biologico prelevato dal sistema. Le potenzialità degli identificatori sono generalmente limitate ad un gruppo prelezionato di agenti e non sono pertanto in grado di identificare agenti al di fuori di questo insieme senza l'aggiunta di nuovi reagenti e programmi analitici. Poiché l'identificatore svolge il compito principale di tutto il sistema di rivelazione, ossia la puntuale determinazione dell'agente, rappresenta il componente più critico dell'architettura del sistema di rilevamento. Esso possiede pertanto la più ampia varietà di tecnologie ed attrezzature disponibili.



**Fig. 9.** Biological Integrated Detection System (BIDS)

4.2.2 Rilevatori non specifici

4.2.2.1 Misuratori di particelle

- *Aerodynamic Particle Sizing (APS)*; tecnica utilizzata per il rilevamento aspecifico consta nel conto del numero di particelle in un *range* dimensionale determinato (tipicamente 0,5  $\mu\text{m}$  - 30  $\mu\text{m}$ ). Per il monitoraggio ed il conteggio delle particelle possono essere utilizzate numerose strategie; tra queste è stato applicato, anche in campo, il dimensionamento delle particelle attraverso rilevatori aereodinamici (*APS, Aerosol Particle Sizer*): il flusso d'aria contenente le particelle entra nel dispositivo APS attraverso un ugello, producendo un getto di aerosol controllato ad alta velocità. Durante il tempo di misurazione, la velocità dell'aria rimane costante ma, a causa delle diverse dimensioni delle singole particelle all'interno del getto, la loro accelerazione relativa varia in base alla loro misura (le particelle di calibro minore avranno una maggiore accelerazione rispetto a quelle di calibro maggiore). Un raggio laser misura contemporaneamente il tempo di volo delle singole particelle.
- *High Volume Aerodynamic Particle Sizer (HVAPS)*; consta di un flusso d'aria accelerato e concentrato passato attraverso un contatore laser di particelle, al fine di ottenere informazioni circa le dimensioni, la distribuzione e le concentrazioni delle particelle di aerosol. Questo strumento non è in grado di discriminare aerosol biologici da non biologici.
- *Met-One*; è un dimensionatore di particelle di aerosol compatto, di potenza ridotta e delle dimensioni di una calcolatrice tascabile. Questo dispositivo è disponibile in commercio ed è tipicamente utilizzato per monitorare le camere pulite. Il Met-One analizza un campione d'aria attraverso un raggio laser che

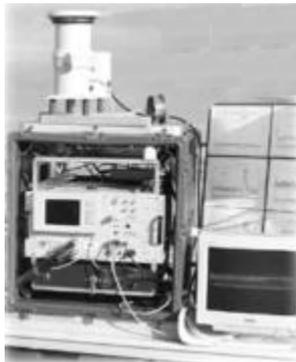
#### 4.2.2.2 Metodi di fluorescenza

Gli approcci che sfruttano le proprietà di fluorofori endogeni constano nell'eccitazione delle componenti molecolari con fasci luminosi, di solito nella regione ultravioletta dello spettro (UV). La componente eccitata spontaneamente ritorna ad uno stato non eccitato attraverso l'emissione di luce a diverse lunghezze d'onda. Poiché lo spettro di emissione è caratteristico del componente molecolare irradiato ad una determinata lunghezza d'onda, questo fenomeno può essere sfruttato per la rivelazione di materiale biologico (bio-fluorescenza). Le tecniche basate sulla bio-fluorescenza forniscono informazioni solo su alcune componenti molecolari del materiale biologico, permettendo così di identificare gli agenti biologici a partire dallo spettro di emissione di un materiale comune (eg. triptofano) dopo irraggiamento.

Esistono due tipi di approcci alle misurazioni di fluorescenza: primari e secondari. Nella bio-fluorescenza primaria viene valutata una componente comune nei biomateriali, naturalmente fluorescente, come ad esempio il triptofano. I metodi di fluorescenza secondaria implicano invece l'introduzione un fluoroforo non endogeno (fluorocromo flag) al campione prima dell'irradiazione UV. Pertanto i metodi di rilevamento secondario richiedono un tempo di misura più lungo e aggiungono complessità al processo di misurazione.

Tra i dispositivi che utilizzano tecnologie di fluorescenza nel rilevamento di agenti biologici, è necessario riportare:

- *Fluorescent Aerodynamic Particle Sizer (FLAPS)*: il FLAPS è un determinatore dimensionale aereodinamico implementato di un un laser supplementare (nella



**Fig. 10.** FLAPS II (componente del sistema 4WARN)

- *Ultra Violet Aerodynamic Particle Sizer (UVAPS)*: rappresenta una variante del FLAPS è sfrutta, per il dimensionamento, il tempo di volo delle particelle, la dispersione della luce e l'intensità di fluorescenza UV per individuare agenti biologici in campioni d'aria.



**Fig. 11.** Biological-Chemical Agent Detection System (CIBADS)/4WARN

- *Biological Aerosol Warning System (BAWS)*: si tratta di un sistema che utilizza una tecnologia basata su microlaser in grado di analizzare due lunghezze d'onda per generare spettri di fluorescenza al fine di rilevare se sta accadendo un evento

- *Portable Biofluorosensor (PBS)*: tale tecnica, utilizzata durante l'operazione Desert Storm, si basa sull'utilizzo di impulsi di luce UV generati da una lampada allo xeno per eccitare gli aerosol presenti nell'aria e quelli disciolti in acqua. La lunghezza d'onda di eccitazione minimizza le interferenze da polvere, ecc, ma non elimina i falsi positivi; campioni in fase liquida rappresentano la migliore condizione analitica rispetto a campioni aerodispersi.
- *Single-Particle Fluorescence Counter (SPFC)*: sviluppato dal Naval Research Laboratory (NRL), questa tecnologia prevede il passaggio di flusso d'aria continuo attraverso un fascio luminoso a  $\lambda = 780$  nm, con successiva dispersione della luce da parte delle singole particelle di aerosol presenti nell'aria. Attraverso questa tecnica viene misurata intensità totale di luce diffusa e conseguentemente calcolata la dimensione delle particelle.

#### 4.2.2.3 Campionatori dimensionali di particelle vitali (impattori)

Un campionatore dimensionale di particelle vitali funziona accelerando un flusso d'aria contenente particelle attraverso un ugello e deviando il flusso d'aria verso una superficie di impatto mantenuta ad una distanza fissa dall'ugello. Le particelle di dimensioni maggiori, che non sono in grado di seguire il flusso d'aria a causa della loro grande inerzia, vengono sperate dalle particelle più piccole, che sono in grado di seguire il flusso d'aria e possono uscire dal campionatore. I campionatori sono generalmente costituiti da più camere successive, ciascuna caratterizzata da orifizi con una dimensione progressiva, costante per ogni comparto. Il getto d'aria carico di particelle entra nello strumento e le particelle sospese sono dirette verso le superfici di raccolta da passando attraverso ugelli di dimensione progressiva, che fungono da setaccio dimensionale. Le particelle non raccolte in una specifica fase, passano alla fase successiva seguendo il flusso d'aria. La piastra di raccolta è generalmente rappresentata

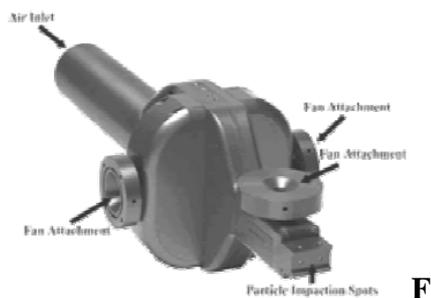
da una capsula di Petri contenente agar selettivo (per permettere la crescita di specifici organismi). Le piastre vengono incubate (tipicamente da 24 a 48 ore) e successivamente viene rilevato il numero di colonie su ogni piastra.

#### 4.2.2.4 Campionatori virtuali

Un campionatore virtuale è simile ad un dispositivo di campionamento convenzionale, ma è caratterizzato da una superficie di impatto differente.

La piastra utilizzata nel campionamento convenzionale viene sostituita da una sonda di raccolta; le particelle più grandi pertanto penetrano la sonda di raccolta invece di colpire la piastra. Attraverso un opportuno controllo del flusso d'aria nel dispositivo di campionamento, è possibile raccogliere le particelle appartenenti ad uno specifico intervallo dimensionale. Inoltre, nella fase finale, il flusso di particelle può essere diretto su un liquido, risultando in un campione altamente concentrato in fase liquida.

- Il campionatore liquido (PEM-0020), prodotto da Power Engineering e Manufacturing Inc., utilizza la simulazione virtuale per raccogliere e concentrare particelle aeree su un film liquido. L'operatore può selezionare il numero di campioni da raccogliere (fino a 10) e può scegliere tra diversi protocolli di campionamento pre-programmati, che variano per volume e per tempo di raccolta di ciascun campione. L'unità riposiziona automaticamente il caricatore al termine del ciclo di raccolta, che può essere rapidamente rimosso e sostituito.
- Il campionatore *BioVIC™ Aerosol Collector*, sviluppato dalla MesoSystems Technology Inc., è uno strumento di rilevazione che utilizza un'aspirazione direzionale dall'estremità anteriore. Lo strumento è in grado di pre-concentrare il flusso d'aria, sospendendo un elevato numero di particelle in un ridotto volume di liquido, in un piccolo flusso d'aria, o su una superficie solida, per il successivo rilevamento da parte del sensore. Il BioVIC™ può essere utilizzato associandolo ad analisi in PCR, con sensori basati sulla fluorescenza ottica, con la spettrometria di massa o con la citometria a flusso.



**Fig. 12.** BioVIC™ Aerosol Collector, MesoSystems Technology, Inc.

#### 4.2.2.5 Campionatori con tecnologia *Cyclone*

Il *cyclone* è un dispositivo inerziale che viene comunemente utilizzato nelle applicazioni industriali per la rimozione di particelle da grandi flussi d'aria (filtrazione di grandi volumi). Un flusso d'aria carico di particolato entra nel corpo dello strumento e forma una spirale centrifuga diretta verso il fondo dell'apparecchio. Le particelle più grandi sono raccolte sulla parete esterna grazie alla forza centrifuga; le particelle più piccole seguono il flusso d'aria che forma la spirale interna ed escono attraverso il tubo di uscita. Il trattamento con acqua nebulizzata alle pareti esterne dello strumento facilita la raccolta e la conservazione delle particelle. Tra i principali strumenti con tecnologia *Cyclone*, è necessario menzionare:

- L'*Interim Biological Agent Detector System* (IBADS), che è stato inizialmente sviluppato per la Marina. E' caratterizzato da un corpo con pareti umidificate per raccogliere le particelle di aerosol in una matrice acquosa. Varianti di questo dispositivo sono in uso nel *Portal Shield Biological Detection System* e nella attuale versione del comune *Biological Point Detection System* (JBPDS).
- Lo *Smart Air Sampler System* (SASS 2000) è un dispositivo che è stato sviluppato in modo indipendente dalla Research International; anch'esso si serve della tecnologia *Cyclone* con pareti umidificate. Tale dispositivo portatile può funzionare a batteria.



**Fig. 13.** Joint Biological Point Detection System (JBPDS)

- Il *Portable High-Throughput Liquid Aerosol Air Sampler System* (PHTLAAS) è un piccolo dispositivo portatile che utilizza una tecnologia simile alla tecnologia *Cyclone* con pareti umidificate. Questo strumento concentra le particelle presenti in un grande volume di aria in un piccolo volume di liquido per una determinazione semiquantitativa ultrasensibile. Questo dispositivo è stato sviluppato autonomamente dalla Zaromb Research Corporation.



**Fig. 14.** Smart Air Sampler System (SASS 2000), Research International

#### 4.2.2.6 Kit di campionamento manuali

Il *Department of Defense Biological Sampling Kit* (DoD BSK) è un kit preconfezionato contenente un set di otto dispositivi per saggi immunocromatografici (HHA) (è in grado, cioè, di individuare contemporaneamente fino a otto differenti agenti biologici), una bottiglia contagocce contenente una soluzione tampone, due tamponi sterili con punta in cotone, ed una scheda di istruzioni. Il kit non può essere utilizzato per lo

screening di campioni di terreno, dal momento che alcuni elementi del suolo possono cross-reagire con i reagenti HHA, se presenti in concentrazioni sufficientemente elevate. Inoltre il kit non è abbastanza sensibile da poter rilevare piccole quantità di particolato risultante da un rilascio proveniente da un luogo ad una distanza elevata (ad esempio, una sorgente di rilascio a diversi chilometri di distanza). I vantaggi principali del DoD BSK sono rappresentati dal costo ridotto, dall'affidabilità in termini di risultato e dalla facilità nell'uso anche da parte di operatori non esperti. Gli svantaggi del DoD BSK sono che non possiede una capacità di rilevamento ad ampio spettro (si tratta di un identificatore) ed ogni kit può essere utilizzato una sola volta.

#### 4.2.2.7 Dispositivi di campionamento palmari

Il BioCapture™ Sampler BT-500 Air è stato sviluppato dalla MesoSystems Technology Inc., e incorpora il BioVIC™ Collector Aerosol, anch'esso sviluppato da MesoSystems Technology Inc. Si tratta di un campionatore d'aria portatile, a batteria, che raccoglie campioni aerodispersi per quantificare i livelli di concentrazione del particolato. I patogeni vengono catturati e concentrati in un campione acquoso per la successiva analisi, che viene espletata attraverso la rapida individuazione delle componenti cellulari, degli acidi nucleici, o di altre componenti identificabili su matrice liquida. La cartuccia monouso rimovibile può anche essere archiviata per essere mantenuta come documentazione (ad esempio, utilizzabile in sede giudiziaria come evidenza di reato).



**Fig. 15.** BioCapture™ BT-500 Air Sampler, MesoSystems Technology, Inc.

#### 4.2.3 Rivelatori specifici

#### 4.2.3.1 Rilevamento umido (citometria a flusso)

La citometria è un procedimento che permette la misura delle caratteristiche fisiche e chimiche delle cellule. La citometria a flusso (ampiamente usata come rivelatore per agenti biologici) si basa sulla stessa tecnica della citometria, ma effettua misurazioni di cellule o di altre particelle presenti in un flusso di aria in movimento, quando esse attraversano un *testing point*. Esso misura le dimensioni delle particelle e conta le particelle in sospensioni liquide, attraverso l'uso di un sistema a diffrazione laser che si basa sulla cattura di tutta la *luce* diffusa dalle particelle che si stanno analizzando. I citofluorimetri sono caratterizzati da una sofisticata fluidica, da un'ottica laser, da rivelatori elettronici, da convertitori analogico-digitali e sono equipaggiati con un computer che fornisce le metodologie automatizzate per analisi bio-chimiche di migliaia di cellule in pochi secondi. Generalmente il campione viene anche trattato mediante l'aggiunta di un colorante fluorescente che reagisce con il materiale biologico (ad esempio DNA). I citofluorimetri sono commercialmente disponibili dai primi anni '70 e da allora il loro utilizzo ha subito un incremento esponenziale. Tale tecnologia è utilizzata, ad esempio, dai citofluorimetri prodotti dalla Los Alamos National Laboratory (LANL) e dalla Becton Dickinson (FACSCaliber).

- Il LANL impiega un diodo laser verde (HeNe). La dimensione delle particelle è valutata attraverso due rivelatori della luce dispersa e la fluorescenza viene misurata due tubi fotomoltiplicatori. Questo strumento, commercialmente conosciuto come *Cytometer Mini-Flow*, possiede dimensioni ridotte (30 lb) in peso e richiede 1 kW di potenza.
- Il FACSCaliber, prodotto da Becton Dickinson, è un citofluorimetro modulare analitico a quattro colori, che utilizza un laser blu a ioni di argon della potenza di 15 mW raffreddato ad aria ed un diodo laser rosso. Il FACSCaliber possiede anche un fascicolatore opzionale.



**Fig. 16.** B-D Flow Cytometer FACSCalibe, Becton Dickenson

#### 4.2.3.2 Rilevamento secco (spettrometria di massa)

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica microanalitica che richiede solo pochi nanogrammi di analita per ottenere informazioni sulla struttura e sul peso molecolare dell'analita stesso.

La tecnica prevede la ionizzazione delle molecole e la loro successiva frammentazione (il pattern di frammentazione costituisce lo "spettro di massa"). La spettrometria di massa richiede che i campioni siano introdotti nel sistema allo stato gassoso. L'introduzione del campione nello spettrometro di massa può essere effettuata tramite differenti metodi (campionamento diretto aria/gas, introduzione attraverso sonde, ecc). Sono discussi di seguito diversi esempi di apparecchiature di rilevamento che si basano sulla spettrometria di massa:

- La Pyrolysis-Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometer (PY-GC-IMS) brucia, o pirolizza, le particelle biologiche. I prodotti di pirolisi biologici vengono quindi separati usando gas-cromatografia. Una volta separati, i singoli prodotti di pirolisi sono inseriti in uno spettrometro a mobilità ionica per l'analisi. Questa tecnologia è discretamente nuova ed è stata sviluppata grazie alla collaborazione tra l'Edgewood Chemical Biological Center (ECBC) e l'Università dello Utah.
- Il Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) è una variante della spettrometria di massa, che utilizza un metodo di ionizzazione dell'agente biologico più delicato rispetto alla pirolisi, per consentire l'identificazione dell'agente rispetto ad un'ampia caratterizzazione.

- Il Chemical Biological Mass Spectrometer (CBMS) utilizza un processo a più stadi per analizzare il contenuto biologico di aerosol e classificare eventuali componenti biologiche. Lo strumento dapprima concentra l'aerosol, lo brucia o pirolizza, poi introduce il campione in uno spettrometro di massa per l'analisi. Per analizzare gli spettri di massa per definire le distribuzioni indicative di sostanze biologiche viene utilizzato un computer. Lo strumento è in grado di classificare elementi biologici come spore, cellule, o tossine.



**Fig. 17.** Chemical Biological Mass Spectrometer (CBMS), Bruker

#### 4.2.3.3 Identificatori immunologici

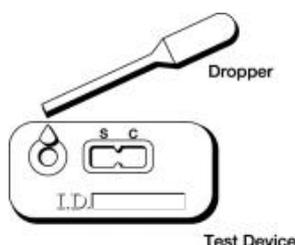
Le tecnologie che prevedono saggi immunologici rilevano e valutano il legame altamente specifico degli antigeni con i corrispondenti anticorpi, costituendo un complesso antigene-anticorpo. In un sistema immunologico di identificazione di agenti biologici, l'agente viene rilevato ed identificato, basandosi sulla specificità del legame antigene - anticorpo. I test immunologici possono essere raggruppati in tre categorie: 1) dispositivi a matrice monouso (cartine o kit); 2) biosensori che utilizzano reagenti come *tag* per misurare il legame indirettamente; 3) biosensori che non richiedono un *tag* (saggi diretti di affinità).

##### 4.2.3.3.1 Dispositivi a matrice monouso

Si tratta di cartine o kit pronti all'uso. Di solito utilizzano reagenti liofilizzati, che vengono ricostituiti all'aggiunta del campione da analizzare. Esistono formati del saggio *one-step*, così come formati più complessi che comprendono più passaggi, eseguiti utilizzando uno o più reagenti. Questi saggi possono essere automatizzati utilizzando una strumentazione per eseguire i passaggi manuali del teste fornire una lettura semiquantitativa del test. Sono attualmente in fase di sviluppo saggi portatili rapidi ad

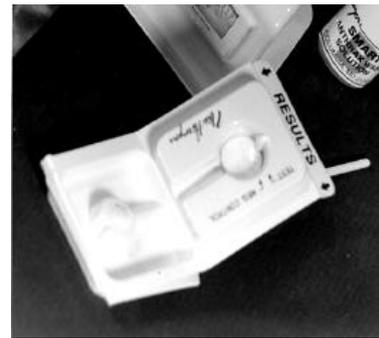
elevata sensibilità, specificità e riproducibilità, per una vasta gamma di agenti batterici e tossine. Questi test hanno ottime caratteristiche di stabilità ed i risultati sono facili da ottenere.

- Saggi immunocromatografici portatili (HHAs); si tratta di semplici dispositivi monouso che sono molto simili alle strisce per le urine utilizzati nei test di gravidanza. Esistono attualmente in commercio 10 saggi differenti; questi test forniscono una risposta qualitativa (positiva o negativa), ma un osservatore esperto può determinare la quantità di agente presente (misura semiquantitativa) in base al grado di viraggio di colore. Gli HHAs sono attualmente in uso in quasi tutti i sistemi di rilevamento biologico militari, si tratta tuttavia di sistemi in continua evoluzione e sviluppo. La loro utilità è dovuta in larga misura alla loro adattabilità ai sistemi di lettura automatica ed a quella manuale. Non è necessaria energia per utilizzare manualmente gli HHAs.
- BTA Test Strips™; sono strisce di rilevamento che vengono prodotte dalla Tetracore, LLC e distribuite da Alexeter Technologies, LLC. La tecnica alla base di tale metodologia (immunocromatografia a flusso laterale) utilizza anticorpi monoclonali, che sono specificamente attratti dal sostanza bersaglio. Quando la sostanza bersaglio è presente nel campione al di sopra di una certa concentrazione, la sostanza bersaglio si lega agli anticorpi nella striscia di test BTA™ a formare una banda rossastra, che appare in un finestra. Il test risulta positivo se appaiono due linee colorate. Questa tecnica fornisce un minor numero di falsi positivi in campioni raccolti nell'ambiente. Attualmente sono disponibili i test per la ricina e l'antrace ed altri test sono in via di sviluppo.



**Fig. 18.** BTA™ Test Strip testing procedure, Tetracore, LCC

- Test SMART; si tratta di un sistema basato su cartine colorimetriche, per rilevare ed identificare analiti multipli. Questa tecnologia rileva gli antigeni nel campione, attraverso l'utilizzo di anticorpi marcati con oro. I risultati positivi (la formazione di un punto rosso) sono rilevati da uno strumento che misura la capacità di riflessione della membrana. Un sistema automatizzato basato sulle cartine colorimetriche può essere utilizzato per eseguire saggi immunologici SMART.



**Fig. 19.** Cartina Smart NDI

#### 4.2.3.4 Approcci attraverso biosensori

In tale approccio, i biosensori integrano l'elemento sensibile (ottico o elettronico) con una componente biologica per consentire una rapida e semplice analisi. A differenza delle cartine colorimetriche, i biosensori per il rilevamento di agenti biologici consistono in un elemento sensore, generalmente racchiuso in una cella, ed in uno strumento associato per la lettura quantitativa. Per attuare un saggio immunologico automatizzato multi-analita è necessario un sistema di fluidica per introdurre il campione ed uno o più reagenti nella cella e nel passaggio da cella all'elemento sensore nell'esecuzione dei test; i saggi basati su biosensori sono pertanto progettati per essere automatizzati e spesso hanno una funzionalità intrinseca per il rilevamento multianalita.

- Un esempio di tecnologia a biosensore che utilizza proprietà di fluorescenza è la Fiber Optic Wave-Guide (FOWG). La FOWG utilizza sonde in fibra ottica rivestite da anticorpi e un anticorpo "reporter" fluorescente per determinare la presenza di un agente sospetto. Se un agente è presente nella soluzione acquosa circolante nello strumento, si legherà all'anticorpo sulla sonda. Nello strumento circola poi una seconda soluzione contenente un anticorpo fluorescente, che si

Esistono anche biosensori che non prevedono la presenza di tag fluorescenti; in questi strumenti il legame antigene - anticorpo viene rilevato direttamente attraverso metodiche differenti (i.e. affinità diretta o saggi di omogeneità). I vantaggi di questa procedura includono la semplificazione del processo di analisi (meno passaggi, meno componenti), la riduzione nell'uso di reagenti, la possibilità di riutilizzare i sensori già utilizzati (che non abbiano dato una risposta positiva). Inoltre gli strumenti che non prevedono l'utilizzo di tag fluorescenti sono più piccoli, più leggeri, e richiedono un apporto minore di energia.

- Esempi di metodi per biosensori senza l'utilizzo di tag includono l'interferometria, la risonanza plasmonica di superficie, la microbilancia a cristallo piezoelettrico, l'accoppiatore ad onda guidata, e la capacitance elettrica. Un esempio di biorilevatore che non utilizza tag fluorescenti è rappresentato dal Bi-Diffractive Grating Coupler (BDG), un trasduttore ottico che è stato sviluppato da Battelle Memorial Institute e Hoffman – LaRoche.

#### 4.2.3.5 Amplificazione di acidi nucleici

L'amplificazione di acidi nucleici può essere utilizzata per rilevare la presenza di DNA o RNA di agenti biologici batterici e virali ( l'amplificazione degli acidi nucleici non può rilevare direttamente la presenza delle tossine). I campioni per l'analisi degli acidi nucleici possono essere prelevati dall'ambiente, da colture di laboratorio, da tessuti di animali umani. La reazione a catena della polimerasi (PCR) è il metodo più utilizzato per amplificare piccole quantità di DNA, al fine di effettuare l'analisi.

- Tra gli strumenti per effettuare l'amplificazione di acidi nucleici, Il Mini-PCR (Ten Chamber PCR, sviluppato dalla Lawrence Livermore National Laboratory ( LLNL), rappresenta uno dei primi tentativi di ottenere tecnologie genetiche di identificazione in un formato facilmente utilizzabile . Questo dispositivo si basa

- Il LightCycler<sup>®</sup>, sviluppato dalla Idaho Technology, è un termociclatore che utilizza un unico sistema di rilevazione fluorimetrica incorporato, con coloranti fluorescenti appositamente sviluppati (così come la tecnologia Taq -Man<sup>®</sup>) per la quantificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. E' realizzata, su licenza, da Roche Diagnostics. Il Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device (RAPID), prodotto dalla Idaho Technology, è uno strumento campale robusto e portatile che integra la tecnologia del LightCycler<sup>®</sup>. Il RAPID può eseguire una reazione di amplificazione ed analizzare automaticamente i risultati in meno di 30 min. Un software specifico consente di gestire il RAPID consentendo una rapida, sicura e accurata identificazione degli agenti patogeni potenzialmente pericolosi. E' attualmente disponibile per gli ospedali militari da campo e per i laboratori shelterizzati.

**Fig. 20.** Rapid LightCycler, Idaho Technology



**Fig. 21.** RAPID, Idaho Technology

#### 4.3 Tecnologie *stand-off* di rivelazione di agenti biologici

I sistemi *standoff* sono progettati per rilevare ed identificare agenti biologici a distanza dal punto di rilascio, prima che essi raggiungano la posizione del sistema rivelatore. I sistemi *standoff* non possiedono le stesse componenti dei sistemi puntuali, ma utilizzano una sorgente luminosa come strumento per il rilevamento di agenti biologici.

La tecnologia *standoff* sfrutta il concetto di rilevare e misurare le proprietà di agenti biologici diffusi in atmosfere attraverso sistemi LIDAR (LIght Detection And Ranging). Nel LIDAR, un breve impulso laser viene trasmesso attraverso l'atmosfera; una parte di tale radiazione viene riflessa indietro da particelle atmosferiche come molecole, aerosol, pollini o polveri.

Poiché i sistemi LIDAR utilizzano segnali luminosi costituiti da energie a breve lunghezza d'onda, sono in grado di identificare piccole particelle di aerosol tipiche degli agenti biologici (dimensioni inferiori a 20  $\mu\text{m}$  di diametro).

Sistemi LIDAR basati su lunghezze d'onda nell'IR sono in grado di raggiungere distanze pari a 30-50 km in atmosfera se questa è abbastanza trasparente da permettere l'ottimale diffusione di questa lunghezza d'onda. Tra i fattori limitanti l'evoluzione di questi sistemi è la mancanza di disponibilità di laser piccoli e relativamente poco costosi ad alta potenza. I LIDAR basati su lunghezze d'onda nell'IR non possono discriminare tra aerosol biologico e non biologico, quindi per la rilevazione a distanza di agenti biologici è preferibile utilizzare la tecnologia LIF (Laser Induced Fluorescence), che

utilizza fasci luminosi nella lunghezza d'onda degli UV. Ciò si traduce nell'illuminazione dell'aerosol biologico con un forte impulso laser UV, che provoca l'emissione di fluorescenza da parte di molecole eccitabili nell'agente biologico. Il sistema LIF è più efficace durante le condizioni di bassa luce atmosferica e nelle ore notturne, mentre l'opacità dell'atmosfera e l'elevato background luminoso diurno riducono sensibilmente la capacità di rivelazione.

- Il Compact LIDAR è un sistema che è stato sviluppato presso il *Soldier Biological and Chemical Command* (SBCCOM) e l'*Edgewood Chemical and Biological Center* (ECBC) a partire dal 1996. L'obiettivo del programma è stato quello di sviluppare un sistema leggero, con tecnologia *standoff* in grado di monitorare l'atmosfera, calcolare le concentrazioni relative e mappare la presenza di potenziali aerosol biologici. Il sistema utilizza un sistema laser IR e non può discriminare tra aerosol biologici e non biologici.
- L'Hybrid LIDAR è un sistema in fase di sviluppo da parte della Electro Optics Organization Inc. (EEO) e dello Stanford Research Institute (SRI), sotto il patrocinio della Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA). L'obiettivo di questo progetto è quello di sviluppare un sistema che può essere montato su un veicolo aereo senza pilota (UAV). Il goal del progetto è quello di produrre uno strumento che potrà essere utilizzato per scansionare autonomamente, con la sua componente LIDAR IR, l'atmosfera. Quando viene rilevata una nube sospetta, l'UAV si muoverà in direzione della nube e ne valuta il contenuto biologico utilizzando la sua componente ultravioletta (LIF).
- MIRELA è un LIDAR IR a infrarossi che è stato sviluppato da SBCCOM in Francia. Il sistema, originariamente sviluppato per la rilevazione a distanza delle nubi chimiche, viene ora utilizzato per il rilevamento di bio-aerosol. Questo sistema non è in grado di discriminare tra aerosol biologici e non biologici.
- Il MPL 1000 ed il MPL 2000 sono sistemi LIDAR IR disponibili in commercio (prodotti da Science and Engineering Services, Inc. - SESI), sviluppati originariamente in collaborazione con NASA - Goddard Space Flight Center, per monitorare nubi atmosferiche e componenti aerosoliche. NASA e DOE possiedono attualmente più di una dozzina di strumenti MPL in uso. Questi

- Il Long-Range Biological Standoff Detection System (LR-BSDS) è grado di rilevare nubi di aerosol fino a 30 km dal rivelatore posizionato su una piattaforma aerea, generalmente un elicottero. Questo sistema utilizza fasci di luce pulsata laser nel vicino IR (1  $\mu\text{m}$ ) per la rilevazione. Tuttavia, poiché vengono rilevate solo nubi di aerosol, vi è la discriminazione tra nubi di materiale biologico da altre nubi, come nubi di polvere.



**Fig. 22.** Long-Range Biological Standoff Detection System (LIDARS)

#### 4.4 Proposte di miglioramento al sistema di rivelazione *stand-off*

Come risulta dai sistemi presentati nelle precedenti sezioni, attualmente non esiste uno strumento in grado di rilevare a distanza, con un valido margine di sicurezza, un determinato agente biologico disperso in aria, discriminandolo sia dal background costituito dai contaminanti ambientali, sia dagli altri agenti biologici patogeni e non patogeni.

Negli ultimi anni, diversi gruppi di ricerca stanno concentrando la loro attenzione nell'applicazione delle tecnologie UV-LIF per la creazione di un sistema di rivelazione LIDAR per agenti biologici, sfruttando le componenti molecolari intrinsecamente fluorescenti presenti, in quantità e proporzione variabile, in tutti gli agenti biologici. Un

tale tipo di approccio permetterebbe una rivelazione rapida, lavorando in continuo, e precisa dell'agente biologico utilizzato per un potenziale attacco.

Uno dei vantaggi del rilevamento attraverso la tecnologia UV-LIF è che le sezioni d'urto (nel range 1-10  $\mu\text{m}$ ) sono sufficientemente grandi da rendere fattibile l'individuazione di singole particelle. Inoltre, questi tipi di sistemi utilizzano sorgenti di eccitazione laser che sono facilmente reperibili in commercio; utilizzando sia la lunghezza d'onda di 349 nm che la 266 nm.

Queste due diverse lunghezze d'onda di eccitazione inducono fluorescenza in diversi cromofori endogeni in target biologici: il fascio a 266 nm eccita gli amminoacidi aromatici, tirosina, triptofano e fenilalanina, che mostrano bande di emissione caratteristiche tra 300 nm e 400 nm. Questi cromofori naturali rappresentano dei marcatori universali per materiali biologici; essi sono infatti presenti in una misura variabile in quasi tutte le proteine. La lunghezza d'onda di eccitazione di 349 nm è in grado di eccitare componenti molecolari biochimiche associate con il metabolismo cellulare, come il NADH e le riboflavine, che mostrano rispettivamente picchi di emissione caratteristici a lunghezze d'onda di 450 nm e 560 nm. Diversi esperimenti svolti in laboratorio hanno mostrato tuttavia come diverse specie batteriche mostrino pattern di fluorescenza discretamente simili, tali da rendere molto difficile (Cheng et al., 1999), allo stato attuale e senza alcun database di spettri di emissione, una discriminazione specifica dei diversi agenti biologici.

Bisogna considerare che l'individuazione di agenti biologici attraverso metodiche di fluorescenza spesso risulta complicata da interferenze da parte di aerosol non biologici contenenti idrocarburi aromatici (provenienti, ad esempio, da processi chimici industriali e da scarichi di motore) così come da aerosol biologici costituenti il background, come pollini, funghi e batteri normalmente presenti nell'ambiente. Dati recenti mostrano che alla lunghezza d'onda pari a 266 nm è in grado di distinguere meglio tra particelle inorganiche ed organiche fluorescenti, senza però riuscire a distinguere tra agenti patogeni e non patogeni. Risulta evidente pertanto come ulteriori sforzi debbano essere concentrati al fine di riuscire in questa distinzione.

## **5. Discussione e conclusioni**

Le armi biologiche hanno assunto, negli ultimi decenni, un sempre maggiore rilievo negli scenari militari e civili. Esse sono relativamente poco costose da produrre e possono generare un impatto significativo ed imprevedibile sulla popolazione civile.

L'individuazione precoce di un attacco biologico è indispensabile per istituire una attività di contrasto puntuale e per permettere una corretta gestione e risoluzione dell'emergenza. Pertanto risulta essenziale sviluppare metodi e tecnologie per rilevare attacchi biologici a distanza che siano in grado anche di discriminare i diversi agenti utilizzabili, distinguendoli dal background costituito dall'aerosol di fondo e dagli agenti biologici naturalmente presenti nell'ambiente.

Discriminare agenti biologici da guerra dal *background* di fondo, attraverso tecnologie di rilevamento *stand-off*, è estremamente impegnativo, poiché gli agenti biologici innocui, i microbi patogeni ed il biota di fondo spesso differiscono tra loro solo a livello molecolare e di antigeni superficiali. Poiché le variazioni a livello molecolare risultano in lievi variazioni a livello degli spettri di assorbimento e di emissione delle molecole interessate, considerando anche che possono influire sensibilmente anche i mezzi di coltura e i contaminanti associati agli agenti, risulta comprensibile come sia estremamente complessa una rilevazione *stand-off* di agenti biologici dannosi.

Diversi gruppi di ricerca internazionali stanno concentrando la loro attenzione sullo studio di sistemi *stand-off* di rilevazione di agenti biologici attraverso tecnologie UV-LIF. L'idea alla base di tali studi è la rivelazione di variazioni nei pattern di fluorescenza in caso di attacchi biologici, grazie all'eccitamento con lunghezze d'onda appropriate di fluorofori endogeni, quali ad esempio gli amminoacidi aromatici Tirosina, Triptofano e Fenilalanina o le molecole energetiche (nicotinaminadenindinucleotide e flavine). Studi preliminari hanno mostrato che, seppure differenti agenti mostrino pattern specifici di fluorescenza, è molto difficile discriminare tra agenti patogeni e non patogeni attraverso questa metodica, in quanto essa permette di apprezzare la forma degli spettri piuttosto che la loro intensità. Inoltre, al momento non esistono banche con cui confrontare gli spettri rilevati attraverso tecnologie UV-LIF. E' evidente pertanto come strategie di rilevamento *stand-off* con tecniche ottiche siano ad uno stato embrionale. Risulta essenziale quindi che a tale scopo siano investite risorse, sia economiche che umane, al fine di ottimizzare sistemi in grado di rilevare attacchi biologici e di discriminare gli agenti implicati, anche attraverso l'implementazione ed il perfezionamento di tecnologie già esistenti.

## 6. Bibliografia

- 1 Acheson, N.H. (2011). *Fundamentals of Molecular Virology*. Wiley, New York.
- 2 Adams, M..J. & Carstens, E.B. (2012). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 157:1411–1422.
- 3 Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell in Cell* 4th.
- 4 Aldhous P. (1990). Biological warfare: Gruinard Island handed back. *Nature*, 344:801.
- 5 Arnon, S.S., Schechter, R., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Swerdlow,

- 6 Bhalla, D.K. & Warheit, D.B. (2004). Biological agents with potential for misuse: a historical perspective and defensive measures. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 199:71-84.
- 7 Bistoni, F., Nicoletti, G. and Nicolosi, V.M. (1998). *Microbiologia e microbiologia clinica*. Elsevier.
- 8 Brauburger, K., Hume, A.J., Mühlberger, E. & Olejnik, J. (2012). Forty-five years of Marburg virus research. *Viruses*, 4:1878-1927.
- 9 Cenciarelli, O., Rea, S., Carestia, M., D'Amico, F., Malizia, A., Bellecci, C., Gaudio, P., Gucciardino A. and Fiorito R. (2013). Bioweapons and Bioterrorism: A Review of History and Biological Agents. *Defence S&T Tech Bull* 6:111-129.
- 10 Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Bioterrorism Agents / Diseases*. Available online at: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (Last access date: 14 December 2013).
- 11 Charrel, R.N. & de Lamballerie, X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res.*, 57: 89-100.
- 12 Cheng, Y.S., Barr, E.B., Fan, B.J., Hargis, P.J., Rader, D.J., O'Hern, T.J., Torczynski, J.R., Tisone, G.C., Preppernau, B.L., Young S.A. et al. (1999). Detection of bioaerosols using multiwavelength UV fluorescence spectroscopy. *Aerosol Science and Technology* 30:186-201.
- 13 Christopher, G.W., Cieslak, T.J., Pavlin J.A. & Eitzen, E.M. (1997). Biological warfare: a historical perspective. *JAMA*, 278: 412-417.
- 14 Clark, D.V., Jahrling, P.B. & Lawler, J.V. (2012). Clinical management of filovirus-infected patients. *Viruses*, 4:1668-1686.
- 15 Clarke, R. (1968). *The Silent Weapons*. David McKay Co. New York.
- 16 D.Lgs. 81/2008. Testo unico in materia di salute e sicurezza nei luoghi di lavoro. G.U. del 30 aprile 2008.
- 17 DaSilva, E. (1999). Biological warfare, bioterrorism, biodefence and toxin weapons convention. *EJB*, 2:99-129.
- 18 Davis, C.J. (1999). Nuclear blindness: An overview of the biological weapons programs of the former Soviet Union and Iraq. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 509-512.

- 19 Department of Health and Human Services (DHHS) (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5<sup>th</sup> ed.* U.S. Department of Health and Human Services (DHHS), Washington, D.C.
- 20 Eitzen, E.M. (1997). Use of biological weapons. In Zajtchuk, R. & Bellamy, R.F. (Eds.), *Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Office of the Surgeon General. U.S. Department of the Army, Washington. D.C., pp. 437-450.
- 21 Harris, S. (2002). *Factories of Death: Japanese Biological Warfare, 1932-1945, and the American Cover-Up*. Routledge, London.
- 22 Hugh-Hones, M. (1992). Wickham Steed and German biological warfare research. *Intell. Nat. Secur.*, 7:379-402.
- 23 Knipe, D.M., Howley, P.M., Esposito, J.J. & Fenner, F. (2001). Poxviruses. In: Knipe D.M. and Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, pp. 2885–2921.
- 24 Kortepeter, M.G. & Parker, G.W. (1999). Potential biological weapons threats. *Emerg. Infect. Dis.* 5:523– 527.
- 25 La Placa, M. (2010). *Principi di microbiologia medica*. Esculapio, Lahore.
- 26 La Placa, M. (2012). *Principi di microbiologia medica*. Società Editrice Esculapio.
- 27 Leitenberg, M. (2001). Biological weapons in twentieth century: A review and analysis. *Crit. Rev. Microbiol.*, 27: 267-320.
- 28 Manchee, R.J., Broster, M.G., Melling, J., Henstridge, R.M. & Stagg A.J. (1981). Bacillus anthracis on Gruinard Island. *Nature*, 294:254-255.
- 29 McCarthy, M. (2001). Anthrax attack in the USA. *Lancet Infect. Dis.* 1:288-289.
- 30 Moquin, R.R. & Moquin, M.E. (2002). Weapons of mass destruction: biological. *Neurosurg. Focus*, 12: E2.
- 31 Moss, B. (2007). Poxviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D.M. and Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 2905–2946.
- 32 Nester, E.W., Roberts, C.E., Pearsall, N.N., and McCarthy, B. J. (1978). *Microbiology* 2<sup>nd</sup> ed. Holt, Rinehart and Winston.
- 33 Newark, T. (1988). *Medieval Warfare*. Bloomsbury Bools, London.

- 34 North Atlantic Treaty Organization (NATO) (1996). *NATO Handbook on the Medical Aspects of NBC Defensive Operations AMedP-6(B). Part II - Biological*. U.S. Department of the Army, Washington DC.
- 35 Olson, K.B. (1999). Aum Shinrikyo: Once and future threat? *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 513-516.
- 36 Poupard, J.A. & Miller, L.A. (1992). History of biological warfare: Catapults to capsomers. *Ann. N. Y. Aca. Sci.*, 666: 9-20.
- 37 Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (1996). *Microbiology*, Wm.C.
- 38 Rotz, L.D., Khan, A.S., Lillibridge, S.R., Ostroff, S.M. and Hughes, J.M. (2002). Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 225-230
- 39 Salvato, M.S., Clegg, J.C.S., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Gonzalez, J.P., Lukashevich, I.S., Peters, C.J. & Romanowski, V. (2011). Arenaviridae. In King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J. (Eds). *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier-Academic Press, Oxford, pp. 715–724.
- 40 Schattner, M., Rivadeneyra, L., Pozner, R.G. & Gómez, R.M. (2013). Pathogenic mechanisms involved in the hematological alterations of arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *Viruses*, 5:340-351.
- 41 Sokolski, H.D. & James M. Ludes. (2001). *Twenty-First Century Weapons Proliferation*. Routledge, London.
- 42 Stockholm International Peace Research Institute (SIPRI) (1971a). *The Problem of Chemical and Biological Warfare, Vol. 1: The Rise of CB Weapons*. Humanity Press. New York.
- 43 Stockholm International Peace Research Institute (SIPRI) (1971b). *The Problem of Chemical and Biological Warfare, Vol. 2: Technical Aspects of Early Warning and Verification*. Humanity Press. New York.
- 44 Stockholm International Peace Research Institute (SIPRI) (1973). *The Problem of Chemical and Biological Warfare, Vol. 3: CBW and the Law of War*. Humanity Press. New York.

- 45 Török, T.J., Tauxe, R.V., Wise, R.P., Livengood, J.R., Sokolow, R., Mauvais, S., Birkness, K.A., Skeels, M.R., Horan J.M. & Foster L.R. (1997). A large community outbreak of Salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *JAMA*, 278: 389-395.
- 46 Vela, E. (2012). Animal models, prophylaxis, and therapeutics for arenavirus infections. *Viruses*, 4:1802-1829.
- 47 Weber, D.J. & Rutala, W.A. (2001). Risks and prevention of nosocomial transmission of rare zoonotic diseases. *Clin Infect Dis.*, 32:446-456.
- 48 Weelis, M. (2002). Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 971-975.
- 49 World Health Organization (WHO) (2004). Public Health Response to Biological and Chemical Weapons. World Health Organization (WHO), Geneva.
- 50 World Health Organization (WHO) (2004). *Public Health Response to Biological and Chemical Weapons*. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland.
- 51 Yuen, E.C.P. (2001). Biological warfare: The facts. *Hong Kong J. of Emerg. Med.* 8:232-240.
- 52 Zygmunt, M. S., Hagijs, S. D., Walker, J. V., & Elzer, P. H. (2006). Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes and infection*, 8:2849-2854.

## ***Ringraziamenti***

Desidero innanzitutto ringraziare la Direzione Centrale di Sanità della Polizia di Stato per avermi permesso di frequentare questo Master.

Un ringraziamento speciale va al Primo Dirigente della Polizia di Stato Dott. Vincenzo Trombadore, per i preziosi consigli scientifici e didattici; ho trovato in Lui una vivacità intellettuale veramente eccezionale, che è stata per me uno spunto continuo a migliorare.

Vorrei ringraziare inoltre il Direttivo del Master Universitario di II Livello in Protezione da Eventi CBRN, nelle Persone dei Proff. Carlo Bellecci, Pasquale Gaudio, del Ten. Gen. Antonio Gucciardino e dell'Ing. Andrea Malizia per la disponibilità dimostrata durante questo percorso di Studi.

Ringrazio il Prof. Roberto Fiorito, l'Ing. Andrea Malizia ed il Dott. Orlando Cenciarelli per il supporto che mi hanno fornito nella stesura e nella revisione di questo elaborato di tesi.

Ringrazio infine tutti i miei Colleghi di corso che hanno condiviso con me questo bellissimo anno di Studio.