

IMPIANTO DI RISPOSTA DEL C.N.VV.F. ALLE EMERGENZE DI TIPO BIOLOGICO. L'ESPERIENZA DELLE OLIMPIADI INVERNALI TORINO 2006.

Pilo F.¹, Blotta P.² e Bennardo V.³, Ru G.⁴, Dondo A.⁴ Marocco C.⁵ Gorla M.⁴.

¹ C.N.VV.F. – Comando Provinciale VV.F. Venezia, Dorsoduro 3862, Venezia, 30100 Italia

² C.N.VV.F. – Direzione Centrale per l’Emergenza e il Soccorso Tecnico – Controllo del Rischio BC, Ministero dell’Interno, Piazza del Viminale 1, Roma, 00184 Italia

³ C.N.VV.F. – Comando Provinciale VV.F. Torino, Corso Regina Margherita 330, Torino 10100, Italia

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte Liguria Valle d’Aosta, Via Bologna 148, Torino, 10154, Italia

⁵ Regione Piemonte – Assessorato alla Sanità Pubblica, Corso Stati Uniti 1, Torino, 10100, Italia

SOMMARIO

La gestione del rischio biologico e degli eventi ad esso connessi è una “novità” nel campo del soccorso tecnico urgente, compito istituzionale proprio del C.N.VV.F.. Di fronte alla “nuova” minaccia biologica il C.N.VV.F. ha intrapreso tutte le strade possibili e necessarie per accrescere le proprie competenze in materia ed implementare la propria capacità di risposta ad emergenze di questo tipo. A tal fine si è intrapresa la duplice strada dell’acquisizione di strumenti/mezzi di rilevazione biologica e di una attenta formazione volta al corretto utilizzo degli strumenti stessi. Il tutto nell’ambito più generale dell’organizzazione della risposta del C.N.VV.F. alle emergenze di tipo chimico, biologico, nucleare e radiologico. Si è provveduto così ad acquisire strumentazioni di rilevazioni biologica utilizzando la tecnica PCR (Polimerase Chain Reaction) e a dare corso a stage formativi mirati all’ottenimento, oltre che delle capacità operative necessarie alle analisi, anche di quelle necessarie nella fase di campionamento sul campo. L’impianto di risposta alle emergenze di tipo biologico è il risultato dell’integrazione di tali esperienze formative con la non trascurabile esperienza interventistica dei vigili del fuoco relativamente ad eventi e minacce di tipo biologico. La presente pubblicazione ha l’obiettivo di illustrare il sopraccitato impianto di risposta con riferimento alle recenti esperienze maturate dal C.N.VV.F. durante le trascorse Olimpiadi Invernali Torino 2006, soprattutto in termini di campionamento, trattamento dei campioni ed analisi degli stessi

1.0 INTRODUZIONE

1.1 Attività svolte durante le Olimpiadi Invernali Torino 2006

Attraverso uno studio preliminare, condotto nel periodo che va dal settembre 2005 fino all’inizio dello svolgimento dei Giochi olimpici invernali Torino 2006 (07-28 febbraio), si è arrivati a definire e mettere in atto un dispositivo di campionamento ed analisi biologica allo scopo di monitorare l’eventuale presenza di agenti biologici altamente patogeni per l’uomo, all’interno dei siti indoor delle competizioni olimpiche.

Tale attività è stato il frutto di una stretta collaborazione tra il Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco e l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino ed ha avuto un carattere sperimentale sia in considerazione dei luoghi nei quali è stata applicata sia per il fatto che costituisce un primo esempio di approccio per problematiche di rilevazione biologica in ambito civile.

Tutta l’attività descritta di seguito descritta è stata sviluppata e attuata nell’ambito dell’eventualità di episodi di emergenza;

I risultati dell’attività di studio sono stati sanciti attraverso un protocollo di intesa firmato a Torino il 2 febbraio 2006 tra il Comando Provinciale dei Vigili del Fuoco di Torino e l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino che è inserito nel piano di difesa in caso attacco NBCR per le olimpiadi, approvato dal gruppo di lavoro interforze nominato dalla Prefettura e in accordo con l’Assessorato Tutela della Salute e Sanità della Direzione Sanità Pubblica Regione Piemonte.

1.2 Obiettivi dell'attività

Gli obiettivi dell'attività svolta sono stati i seguenti:

- Sorveglianza dei siti olimpici al coperto finalizzata al monitoraggio delle condizioni ambientali relativamente alla presenza di organismi patogeni potenzialmente utilizzabili in episodi di bioterrorismo;
- Addestramento degli operatori del Nucleo NBCR all'esecuzione dei prelievi e analisi rapide per l'identificazione di microrganismi patogeni, finalizzata sia al monitoraggio di alcuni siti olimpici al coperto sia all'eventualità di episodi di emergenza;
- Predisposizione di un sistema operativo integrato per la gestione degli interventi da effettuarsi da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino in fase di monitoraggio e di emergenza per rischio biologico;
- elaborazione di uno studio mirato alla valutazione della significatività dei campioni nel contesto delle finalità legate alla sorveglianza dei siti olimpici.

1.3 Agenti biologici

Sulla base di una ricerca bibliografica e di notizie reperibili dagli organi di informazione, sono state fatte delle valutazioni per selezionare una serie di microrganismi che per loro caratteristiche (patogenicità, maneggevolezza, precedenti di impiego) possono essere considerati a maggiore probabilità di impiego in eventi di terrorismo non convenzionali e controllati in tempi compatibili con le manifestazioni sintomatologiche.

Agenti biologici oggetto di controllo:

- *Bacillus anthracis*;
- *Francisella tularensis*;
- *Yersinia pestis*;
- *Brucella spp.*

Inoltre, in caso di necessità, attraverso un supporto analitico tradizionale fornito dal laboratorio di Patologia Animale dell'IZS di Torino, sarebbe stato possibile effettuare le determinazioni dei seguenti agenti zoonosici:

- *Clostridium botulinum* (tossina)
- *Coli O157:H7*
- *Mycobacterium spp.*
- *Enterobacteriaceae*
- *Campylobacter spp.*
- *Listeria monocytogenes*
- *Burkholderia mallei* (morva)
- *Chlamydia pittaci*
- *Vibrio cholerae*

2.0 CAMPIONAMENTO

2.1 Modalità di campionamento

Le modalità di campionamento sono state sviluppate in gran parte dall'IZS, in collaborazione con i VVF per quanto riguarda la possibilità di gestione del campionamento da parte delle squadre. Sulla base di valutazioni probabilistiche sui possibili eventi di rischio biologico non convenzionale è stato ritenuto sufficiente a garantire una buona copertura di controllo il solo campionamento degli aeriformi. A tal fine, è stato all'uopo studiato un sistema di captazione all'interno degli impianti di filtrazione dell'aria dei siti olimpici indoor.

2.2 Impianti di trattamento aria (UTA)

Per lo studio della movimentazione di inquinanti biologici negli aeriformi all'interno dei siti sono state fatte le seguenti considerazioni:

- All'interno dei siti olimpici indoor l'immissione, la filtrazione, il ricircolo e l'emissione dell'aria avviene per mezzo di unità trattamento aria (UTA)
- Le UTA regolano temperatura, umidità relativa e tutti i parametri necessari al comfort relativi all'aria presente nei vari ambienti e nelle aree comuni .
- Sulla base delle caratteristiche progettuali di ciascun impianto filtrazione dell'aria, gli ambienti e le aree comuni possono essere suddivisi in macrozone, relativamente indipendenti le une dalle altre, per quanto riguarda la composizione e qualità dell'aria, ciascuna servita da una o più UTA diverse.

Su questa base, ad esempio, all'interno dello spazio comune del sito olimpico indoor "Torino Esposizioni" è stato possibile identificare almeno 3 differenti macrozone.

In appendice si riportano alcuni esempi di macrozone studiate per il sito "Palavela" e per il sito "Torino Esposizioni".

2.3 Sistema di captazione del contaminante biologico

Per il trattenimento dell'eventuale contaminazione biologica si è utilizzato il metodo di applicazione sui filtri delle UTA (aria di ricircolo in aspirazione dai siti) di dispositivi di campionamento costituiti da filtri di dimensioni 20x20 cm realizzati con lo stesso materiale dei filtri di cui sono dotate le UTA e in maniera tale che fossero facilmente rimovibili. Tale metodo è stato scelto in base alle seguenti considerazioni:

- Utilizzare filtri dello stesso materiale di quelli presenti sulle UTA non crea cadute di pressione significativamente diverse da quelle dei soli filtri presenti sulle UTA. In tal modo si riduce la possibilità di creare circolazioni d'aria preferenziali che impedirebbero il transito dell'aria attraverso il dispositivo di campionamento e quindi la cattura della eventuale carica batterica sui dispositivi stessi.
- La dimensione dei filtri è tale da permettere il deposito dei batteri in quantità sufficienti per l'analisi.
- Il materiale dei filtri rende agevole le operazioni di campionamento e il loro successivo trattamento prima dell'analisi.

Tali caratteristiche sono state preliminarmente valutate mediante prove sperimentali effettuate presso l'IZS.



Figura 1. I dispositivi di campionamento posizionati all'interna di un UTA (a sin) e Operazioni di campionamento sulle UTA (a dx)

2.4 Procedura di campionamento

Sono state, inoltre sviluppate procedure di campionamento (per il prelievo dei campioni / filtri dalle varie UTA, per la loro conservazione e per il loro trasporto ai laboratori dell' IZS) con particolare attenzione all'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale da parte del personale addetto al campionamento.

Di seguito è riportata una tabella con indicazione dei giorni del mese di febbraio 2006 durante i quali sono stati eseguiti i campionamenti

La scelta delle modalità (a sito chiuso al pubblico), dei tempi (nelle primissime ore del mattino) e delle frequenze di campionamento e di analisi (ogni 48 ore) è stata fatta in base alle seguenti considerazioni:

- Potenzialità diagnostiche dei laboratori (VVF e IZS)
- Numero complessivo di macrozone da monitorare (31)
- Durata dei Giochi Olimpici (16 giorni)
- Tempi di incubazione delle patologie generate dai quattro microrganismi considerati per il controllo (2 o più giorni), in modo da consentire l'eventuale tempestivo trattamento degli esposti.

Nella tabella seguente è riportato il numero dei campionamenti effettuati per ciascun sito:

Tabella 1. Numero di campioni effettuati per ciascun sito.

Sito olimpico	Numero di campioni
Stadio olimpico	2x1
Palasport Olimpico	5x2
Torino Esposizioni	5x2
Oval Lingotto	4x2
Palavela	11x2
Pinerolo Palaghiaccio	5x2

In ogni fase di campionamento sono stati utilizzati due dispositivi filtranti, uno per l'analisi con tecnica PCR, l'altro come scorta per eventuali approfondimenti analitici con tecniche di microbiologia classica.

3.0 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

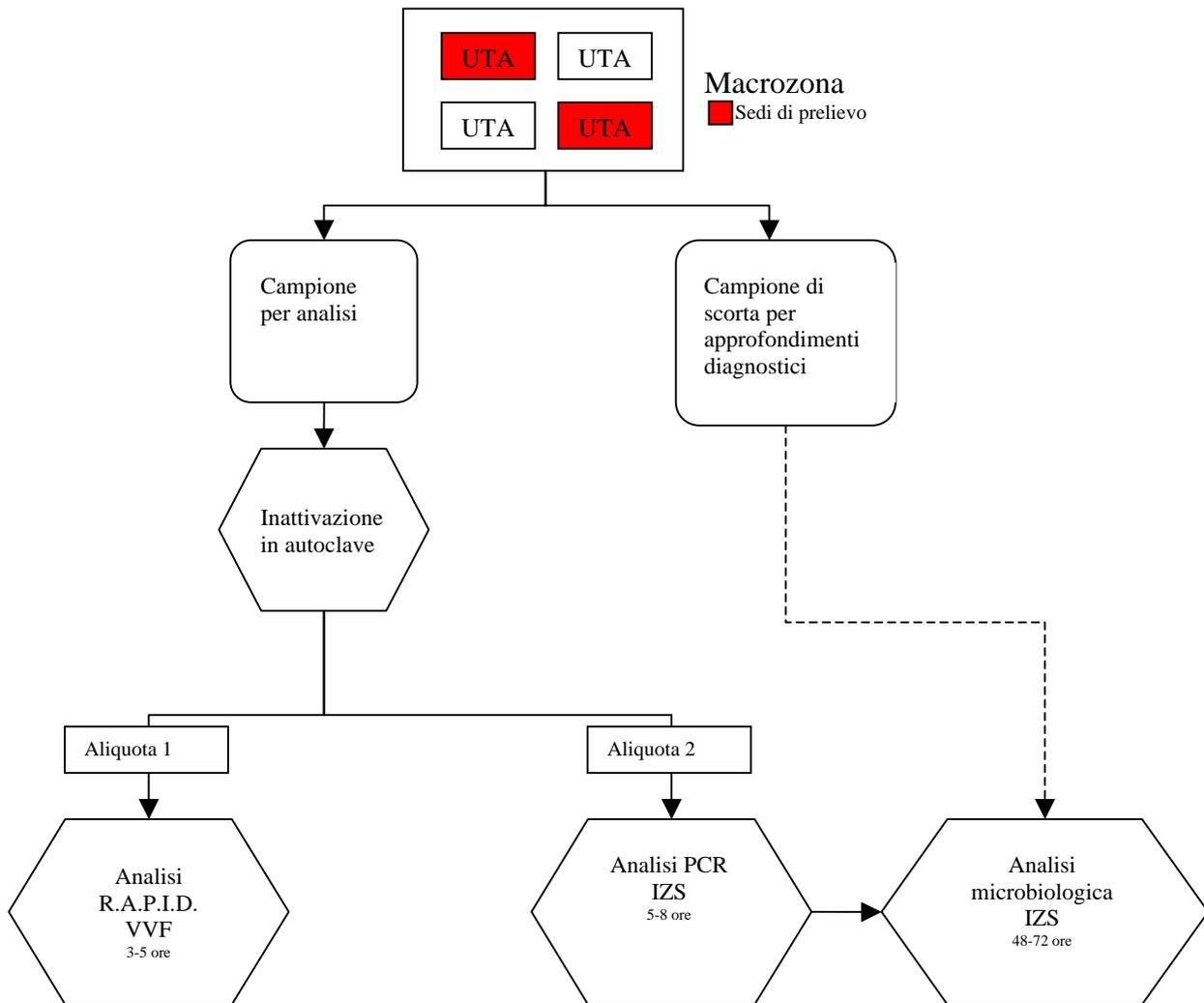
La procedura di trattamento dei campioni è stata sviluppata dall'istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino.

I due campioni, in particolare, sono stati tenuti separati e distinti, in modo da evidenziare quelli destinati all'analisi con tecnica PCR e quelli di scorta da tenere a disposizione in caso di necessità per gli approfondimenti con tecniche microbiologiche tradizionale.

I campioni destinati all'analisi con tecnica PCR erano sterilizzati in autoclave, e poi sottoposti a sminuzzamento e risospensione in acqua, quindi centrifugati per recuperare e concentrare la carica batterica presente nel campione.

In caso di positività all'esame rapido in PCR era previsto confermare il riscontro tramite analisi secondo le metodologie previste dalla microbiologia classica (coltura batterica).

SCHEMA DEL FLUSSO OPERATIVO



4.0 ANALISI

4.1 Scopo dell'analisi

Il lavoro svolto nei laboratori biologici VVF e IZS è stato orientato al monitoraggio per la durata dell'intero evento dei siti olimpici indoor per verificare l'eventuale presenza di agenti patogeni coinvolti in episodi di bioterrorismo.

4.2 Metodologia di analisi

Per quanto riguarda i laboratori VVF la metodologia impiegata è PCR real-time a sonde tipo fret (rilevazione mediante fluorescenza) acquisite dall'E.I. Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria.

Per quanto riguarda i laboratori IZS la metodologia impiegata è quella della PCR end point con rivelazione in agar gel.

4.3 Apparecchiature utilizzate

Di seguito si riporta una lista delle apparecchiature che sono state utilizzate per l'effettuazione delle analisi all'interno dei laboratori VVF.

- R.A.P.I.D. (PCR-real time)
- Thermomix
- Amplificatore GENE-AMP 9700 - ABI
- Microcentrifughe (20.000 g)
- Vortex
- Micropipette (vari volumi- vol. variabile)
- Pipette
- Adattatori per microcentrifughe
- Rack (vario tipo)
- Provette (vario tipo)
- Acqua ultrapura Dnasi-Rnasi free
- Kit di estrazione Nucleospin Tissue
- Capillari
- Contenitori termici (-20 e +4°C)
- Frigo/congelatori portatili e fissi
- Contenitori per trasporti di campioni biologici
- Contenitori per trasporto campionamento
- Varie buste rischio biologico
- Decontaminanti specifici
- Lampade UV
- Penne per chiusura capillari
- Reagenti preparati (E.I.)
- Attrezzature da laboratorio microbiologico



Figura 1. Termociclistori per PCR, utilizzati presso il laboratorio di Biotecnologie dell' IZS di Torino



Figura 2. RAPID

4.4 Procedura di analisi

I campioni venivano prelevati dalle squadre di campionamento durante la notte e consegnati all'IZS di Torino che provvedeva ad inattivarne, una serie, mediante sterilizzazione in autoclave e a preparare successivamente i campioni per l'analisi rapida in PCR, mentre, la serie di campioni scorta veniva opportunamente conservata e tenuta a disposizione per eventuale necessità .

Ogni laboratorio creava un pool di più campioni (generalmente 5) in funzione delle proprie esigenze ed eseguiva l'estrazione del DNA.

Ad estrazione ultimata si procedeva ad una serie di controlli per garantire l'efficacia dell'estrazione ed escludere possibili falsi negativi.

A controlli confermati si procedeva alla ricerca dei target prefissati.

In caso di anomalie si procedeva a tutta una serie di verifiche incrociate con il secondo laboratorio VVF fino ad arrivare ad una risposta univoca da comunicare poi all'IZS per confronto.

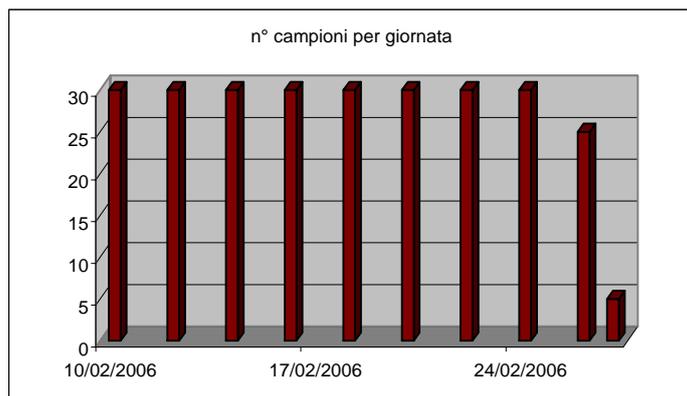
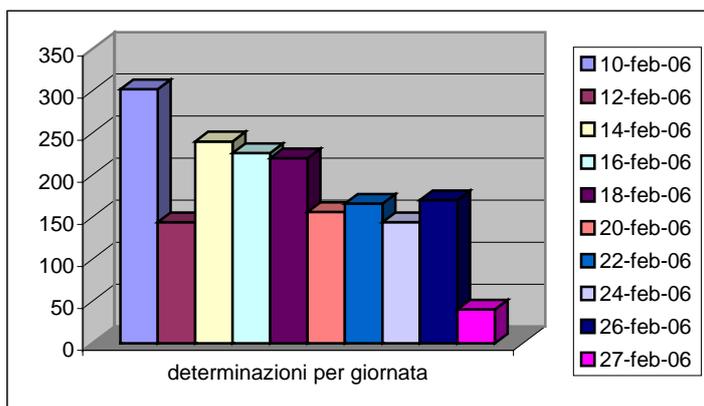


Figura 4 Laboratorio mobile VVF

Complessivamente erano previste 144 analisi per ciascuna giornata di analisi completa per un totale complessivo pari a 1296, (numero di fatto superato per la ripetizione dell'analisi di alcuni campioni).

Tabella 4

DATA	RAPID operativi	personale operativo	n° campioni per giornata	determinazioni per giornata	giri macchine per giornata
10-feb-06	3	5	30	302	13
12-feb-06	2	5	30	144	6
14-feb-06	2	5	30	240	10
16-feb-06	2	3	30	226	9
18-feb-06	2	4	30	220	9
20-feb-06	2	4	30	156	6
22-feb-06	2	5	30	166	8
24-feb-06	2	5	30	144	6
26-feb-06	1	5	25	170	6
27-feb-06	1		5	44	2
totale	19	41	270	1812	75
medie giornaliere	1,9	4,1	27	181,2	7,5



4.6 Risultati dell'analisi

Per quanto riguarda l'attività di analisi sviluppata presso i laboratori VVF è possibile fornire i seguenti dati complessivi per la caratterizzazione dell'attività:

Durante il periodo delle manifestazioni olimpiche sono stati analizzati n° 270 campioni.

Determinazioni effettuate: n° 1812

Target ricercati: 5 (2 BA, 1yp, 1 ft, 1bm)

Personale impiegato: 5 operatori

Apparecchiature: n° 3 RAPID

Laboratori mobili utilizzati: n°2

La presenza di un operatore in più, ha permesso di garantire la massima efficienza di entrambi i laboratori durante tutto il periodo, fronteggiando anche una breve assenza di un operatore per malattia.

Durante le analisi in ogni laboratorio ogni operatore era affiancato da un collega con compito di controllo e supporto. Le fasi di estrazione ed analisi erano alternate tra gli operatori.

4.7 Nuove metodologie di estrazione prove effettuate e risultati ottenuti

Durante il periodo olimpico, è stata tenuta anche qualche giornata di formazione (compatibilmente con l'andamento delle analisi effettuate il giorno precedente).

Data l'esiguità del tempo a disposizione, durante l'evento olimpico, non è stato possibile dedicare risorse per testare altre metodiche.

A tal proposito si è evidenziata la necessità di adottare altri sistemi di estrazione del DNA e ampliare le procedure attualmente in essere.

Si è pertanto ravvisata l'opportunità di organizzare incontri formativi con personale competente in modo da avere una maggiore flessibilità in funzione delle diverse problematiche riscontrabili in eventi di rischio biologico.

NB: Durante le giornate di analisi, data la delicatezza delle operazioni, si è ritenuto opportuno isolare il più possibile il laboratorio per evitare qualsiasi interferenza.

Data la particolarità degli orari (imprevedibili in quanto determinati essenzialmente dall'esito delle analisi) e le difficoltà logistiche riscontrate, è opportuno che il personale dedicato a questo settore, abbia modalità e tempistiche proprie in modo da ottimizzare il lavoro.

5.0 CONCLUSIONI

La procedura prevista è stata rispettata a pieno durante lo svolgersi dei giochi ed ha permesso di conseguire l'obiettivo prefissato, a conclusione di quanto detto, si può quindi definire un successo il monitoraggio biologico messo in piedi per le Olimpiadi di Torino. Parlare di monitoraggio può sembrare strano a chi è abituato a vedere i Vigili del Fuoco impegnati sul fronte dell'emergenza ma, anche alla luce del lavoro fatto a Torino, risulta indispensabile per le peculiarità del rischio biologico non convenzionale, che non produce evidenti effetti immediati sulle persone e che non è rilevabile da semplici apparecchiature elettroniche, prevedere un lungo periodo di tempo da dedicare, intervento per intervento, alla pianificazione, rivolta soprattutto all'impostazione del campionamento mettendo in campo professionalità sempre maggiori e sinergie con altri enti come l'IZS.

Gli autori desiderano ringraziare tutti coloro che hanno operato e collaborato al sistema di monitoraggio messo in atto il quale ha ricevuto il plauso anche da esperti e osservatori stranieri recatisi in visita sia durante che dopo le olimpiadi.

In particolare si vuole ringraziare gli operatori che hanno effettuato il campionamento per la discrezione con la quale hanno attuato le operazioni di campionamento e monitoraggio, evitando in tal modo di suscitare reazioni di ingiustificato allarmismo negli spettatori e negli addetti dei vari enti operanti, trasmettendo un senso di professionalità e sicurezza nelle operazioni delicate messe in atto.

