

**Convegno Nazionale**  
**VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO**  
**VGR2008**  
*Pisa, 14-16 Ottobre 2008*

**IL LABORATORIO BIOLOGICO MOBILE DEL NUCLEO REGIONALE NBCR -  
PROCEDURE DI IMPIEGO PER INTERVENTI DI PRIMA EMERGENZA NEL SETTORE  
BIOLOGICO**

**Minghetti S.1, Pilo F.2, Zampieri M.3.**

**1 Vigili del Fuoco , via della Motorizzazione, 6 -Venezia Mestre, 30170, Italia**  
**2 Vigili del Fuoco , via della Motorizzazione, 6 -Venezia Mestre, 30170, Italia**  
**3 Vigili del Fuoco , via della Motorizzazione, 6 -Venezia Mestre, 30170, Italia**

**SOMMARIO**

L'esigenza di ottenere una diagnosi precoce dei possibili patogeni presenti in varie matrici ambientali campionate nel corso degli interventi effettuati dai Nuclei Regionali N.B.C.R. del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco, ha condotto ad una specializzazione nell'ambito delle usuali tecniche di laboratorio biologico verso la ricerca di una maggiore velocità di esecuzione e di risposta.

La capacità di trovare metodologie efficaci per l'effettuazione di analisi biologiche rapide, che siano però in grado di garantire una buona affidabilità, fondandosi su solide basi scientifiche, permetterà di assicurare idonee misure di sicurezza, di garantire la copertura sanitaria degli operatori e delle persone coinvolte e di poter comunicare tempestivamente i risultati alle autorità competenti. E' infatti necessario ricordare che l'analisi biologica rappresenta solo un tassello (valutazione del rischio), all'interno dell'intera gestione dell'emergenza.

I tempi legati alla velocità di risposta dell'analisi devono infatti, se non coincidere, essere perlomeno confrontabili con i tempi caratteristici degli interventi VF (la maggior parte degli interventi VF deve essere risolta entro poche ore) .

La specializzazione delle tecniche diagnostiche con lo scopo di ottenere una maggiore velocità di esecuzione, non deve però andare a scapito della validità dei dati ottenuti e ciò ha comportato e comporta, oltre all'acquisizione di particolari strumentazioni, lo sviluppo e la sperimentazione di strumenti e metodologie innovative soprattutto in ambito biomolecolare nonché l'adattamento delle stesse alle situazioni di emergenza.

Il settore Biologico, all'interno del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco è attualmente presente presso i nuclei di Venezia, Roma, Milano e Torino.

La nascita del settore Biologico del Comando di Venezia risale al 2001, a seguito della "emergenza antrace", nell'ambito della quale ha avuto il compito precipuo di effettuare le operazioni di campionamento delle polveri sospette, segnalate da vari enti sul territorio regionale; i campioni venivano successivamente inviati all' IZS di Foggia per le analisi volte alla ricerca di un solo target (*Bacillus anthracis* spp). In tale occasione è stato constatata sia l'estrema lentezza che la scarsa efficienza di un sistema in tal modo congegnato, ravvisando dunque la necessità di disporre di una struttura opportunamente dedicata con propri mezzi e personale, capace di fornire, in casi analoghi, una prima risposta rapida. Tale esigenza, ha condotto successivamente all'acquisizione, di strumentazione scientifica, anche campale, per l'analisi mediante tecniche biomolecolari ed immunologiche ed alla considerazione che sarebbe stato necessario ampliare la diagnosi alla ricerca di altri target di interesse per la sicurezza sanitaria. Oltre alle capacità di analisi, il laboratorio biologico no del nucleo NBCR di Venezia, è stato pensato anche come struttura in grado di raccordare l'area dell'intervento con altri istituti pubblici o privati che possano fornire preziose informazioni nel campo della biologia in situazioni di emergenza.

## **1.0 L'ATTIVITA' DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI: LE MOTIVAZIONI DEL LABORATORIO BIOLOGICO**

La validità del sistema strutturato di campionamento ed analisi biologica rapida e la capacità degli operatori appartenenti ai quattro nuclei nazionali si è potuta testare già in occasione delle Olimpiadi Invernali di Torino del febbraio 2006 e delle Paralimpiadi Invernali dello stesso anno. Nell'ambito dei due eventi è infatti stata effettuata una importante operazione di campionamento ed analisi preventiva delle polveri (sui filtri delle unità di trattamento aria) dei siti olimpici indoor, in collaborazione con l'IZS (Istituto Zooprofilattico Sperimentale) per il Piemonte Liguria e Valle d'Aosta. Tale verifica è stata potuta effettuare anche in eventi successivi, come ad esempio a Roma, in occasione delle elezioni politiche del giugno 2006, con una serie di campionamenti ed analisi preventive in siti potenzialmente a rischio della capitale ed infine in sede locale, nell'ambito di vari interventi effettuati nella regione Veneto. Gli interventi sul territorio regionale hanno messo in evidenza sia le carenze che le principali esigenze del sistema, tra queste ultime è emersa l'assoluta necessità di dotarsi di laboratori mobili biologici dedicati esclusivamente al trattamento post raccolta ed all'analisi del campione, per potersi velocemente recare sul sito dell'evento, per garantire agli operatori di lavorare in completa sicurezza ed infine per fornire l'opportunità di conservare aliquote del campione "in vivo" per le opportune successive e definitive analisi con tecniche di microbiologia da parte dei laboratori preposti.

L'attività di analisi sviluppata dal laboratorio biologico si basa principalmente su tecniche di biologia molecolare ed in particolare sulla RT-PCR (real time-p.c.r.), soluzione apparsa ottimale nell'ambito dell'emergenza rispetto alle tecniche di microbiologia classica che comportano tempi, costi e spazi eccessivi rispetto alle esigenze della risposta rapida richieste ai Vigili del Fuoco. Per motivi analoghi all'interno delle tecniche di biologia molecolare si è preferito la RT-PCR rispetto alla PCR Classica che comporta la corsa successiva degli amplificati su gel mediante elettroforesi generando tempi e attrezzature aggiuntive non facilmente gestibili.

## **2.0 SVILUPPO DI MEZZI, LABORATORI E ATTREZZATURE**

### **2.1 Il laboratorio biologico mobile**

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

Il laboratorio è stato realizzato all'interno di un container standard 20 ft, trasportabile su ruota, su rotaia e nave.

L'idea fondamentale e, se vogliamo innovativa di questo progetto è stata quella di abbandonare la vecchia concezione di laboratorio biologico concepito nel suo complesso per la gestione dei patogeni infettivi più pericolosi per l'uomo, quelli appartenenti alle classi 3 e 4 ex Dlgs 626/94. Fino ad oggi si è infatti concepita tale tipologia di laboratori come strutture costituite da ambienti perfettamente isolati, in pressione negativa ed atmosfera controllata, con accesso di personale munito di pesanti dispositivi di protezione individuale e sistemi per la respirazione, tali strutture, oltre ad avere costi di costruzione e gestione molto elevati, non risultano essere pratiche dal punto di vista della difficoltà di manipolazione dei campioni, dell'effettuazione delle analisi, della decontaminazione del personale; presentano inoltre notevoli inconvenienti aggiuntivi come ad esempio la necessità di verificarne la

tenuta e la pressione ed occupano spazi che, comprendendo precamere di ingresso, vestizione/vestizione ed ambienti per la decontaminazione, risultano essere eccessivamente estesi.

L' esigenza di dotarsi di un laboratorio mobile in tal modo concepito non sussiste per i Vigili del Fuoco, mentre infatti altri enti, come l'esercito ad esempio, hanno necessità di avere un laboratorio che possa essere posizionato anche in zona "rossa", tale necessità per i nostri nuclei non sussiste.

Partendo dal concetto che l'unico strumento all'interno del quale sia possibile la manipolazione degli agenti patogeni più pericolosi è la camera a guanti (glove box) che è la sola considerata come cappa di sicurezza biologica di classe III, l'idea è stata quella di concepire il cuore del laboratorio, anzi, il laboratorio biologico stesso, come un insieme interconnesso di scatole a guanti, relegando il settore di massima sicurezza dell'intero laboratorio a quest'unica struttura, allo scopo precipuo di risparmiare spazio prezioso, abbattere i costi di costruzione e gestione, manipolare più agevolmente i campioni. Il resto dell'ambiente interno al container risulta essere in tale maniera non potenzialmente contaminabile e quindi non soggetto alle normative che sanciscono le caratteristiche relative ad un laboratorio Biologico di tipo BL III( all'interno del quale possono essere manipolati agenti patogeni inseriti in classe A), all'interno di questo spazio possono essere effettuate dagli operatori le più disparate operazioni ed analisi.

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

Il sistema integrato di camere a guanti consiste in tre isolatori (tipo glove box) indipendenti, intercomunicanti, consecutive, a tenuta stagna, con l'interno in pressione negativa, dotate di ultrafiltri in entrata ed uscita e filtri a carboni attivi in uscita, di sistemi interni di decontaminazione e smaltimento in sicurezza, unite tra loro a formare un'unica apparecchiatura, progettate e realizzate secondo i dettami in materia presenti nel Dlgs 626 /94.

I filtri assoluti montati su ogni settore sono filtri assoluti LUWA mod. JK e JW (per lo scarico in uscita dei vapori dell'autoclave), si tratta di filtri cilindrici HEPA (classe EU13/S) incombustibili, in grado di trattenere efficacemente tutti gli agenti infettivi conosciuti e sono fondamentali soprattutto per garantire che dal sistema esca solamente aria libera dalla presenza di tali organismi, tali filtri trattengono il 99,97 % delle particelle del diametro di 0,3 µm; i filtri assoluti sono chiusi all'interno di contenitori di protezione in pvc . In uscita, su tutti e tre gli isolatori e sul sistema di filtrazione dei vapori dell'autoclave, oltre ai due filtri assoluti HEPA, sono stati aggiunti dei filtri a carboni attivi in modo da scongiurare la possibilità di emissione in ambiente di eventuali sostanze chimiche volatili tossiche sia prodotte dal metabolismo dei microrganismi sia da reazioni coinvolgenti sostanze chimiche utilizzate all'interno dell'isolatore, i filtri a carbone attivo sono inseriti all'interno di contenitori in acciaio inox AISI 316 lucidato.

Tutte e tre le parti dell'isolatore, costruite interamente in monolitiche in acciaio inox AISI 316, saldate di testa con procedimento TIG presentano superfici interne lucidate e superfici esterne satinata, con saldature interne ed esterne pulite e satinata, prive di sporgenze ed incavi per garantire le operazioni di decontaminazione ed angoli arrotondati.

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

Le pareti superiori di ogni unità sono equipaggiate con : un gruppo filtrante in ingresso aria, chiuso in un contenitore di protezione in pvc con valvola a sfera da 2" di intercettazione e regolazione del flusso di ingresso, un gruppo filtrante in uscita con elettroaspiratore centrifugo in acciaio inox AISI 304 , filtro assoluto HEPA incombustibile, chiuso in un contenitore di protezione in acciaio AISI 304 con valvola a sfera da 2 "di intercettazione flusso, collocato all'esterno ed un filtro assoluto HEPA collocato all'interno della camera, protetto da un contenitore in acciaio inox AISI 304 sostituibile dall'esterno; un manometro differenziale per il controllo diretto della pressione di esercizio, manometro differenziale per il controllo dell'efficienza del filtro assoluto in uscita con presa di pressione a monte ed a valle del filtro e tubazioni; una valvola di sovrappressione a sicurezza intrinseca che interviene in caso di anomala pressione positiva interna con filtrazione assoluta; un pannello controllo un presso stato con allarme per il controllo della pressione minima di sicurezza .

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

Le pareti frontali sono tutte e tre apribili.

Sulla parte frontale di vetro della struttura sono presenti 11 flange in anticorrosodal anodizzato per guanti, i guanti sono ambidestri in neoprene. Sempre sulle pareti frontali, esternamente in alto, sono presenti n. 4 gruppi illuminanti con plafoniera chiusa e tubo neon a luce fredda, protetta da copertura esterna in acciaio inox AISI 304.

All'interno dei tre settori, sono disposte lampade UV a tenuta stagna per la decontaminazione mediante degradazione del DNA. Per quanto riguarda la decontaminazione vera e propria degli ambienti interni sono presenti, a fianco della struttura portante due serbatoi in acciaio AISI 304 per liquidi di decontaminazione che vengono spruzzati all'interno mediante tre pistole brandeggiabili a spruzzo posizionate sulle pareti, tutti i liquidi di decontaminazione, quelli presenti nel campione od utilizzati nelle operazioni all'interno sono drenati attraverso scarichi convogliati all'interno di un serbatoio in acciaio inox AISI 304, con innesti rapidi della capacità di 18 lt.

Il campione, raccolto dalla squadra di campionamento viene inserito all'interno del sistema attraverso una apertura comunicante con l'esterno, previa comunicazione mediante citofono ed autorizzazione da parte del personale analista, l'apertura comunica con l'interno del sistema mediante una precamera cilindrica con slitta per il passaggio dei campioni e due portelli con comandi pneumatici e muniti di sensore per l'interblocco; il campione viene quindi processato, aliquotato, pesato e testato all'interno dei tre ambienti. Gli schemi di procedura possono essere molteplici, si può infatti immaginare di voler confinare tutte le operazioni possibili alla prima camera, la quale è fornita anche di un portello scorrevole pneumatico con interblocco comunicante con l'interno del container, laddove la particolare natura e/o pericolosità del campione ci indirizzasse verso tale soluzione, evitando di contaminare le altre sezioni oppure si può procedere cominciando a liberare il campione dalla serie di tre involucri di trasporto ed inserendolo, attraverso il portello scorrevole pneumatico comunicante munito di interblocco, nella sezione centrale, che è quella di maggiori dimensioni ed è specificatamente dedicata alla manipolazione del campione, alle operazioni di pesatura (è presente un piano stabilizzatore di pesata in acciaio) e di aliquota dello stesso. Bisogna qui specificare che tutte e tre le sezioni, al fine dell'utilizzo di strumentazioni al loro interno, sono munite di prese di corrente IP65, sono presenti inoltre ingressi per fluidi da ¼ “.

Nella sezione centrale, al fine di poter disporre di maggiore spazio per il posizionamento di consumabili ed attrezzatura da laboratorio, si sono fatte costruire due piccole mensole sulla parete di fondo, tre vaschette in acciaio portaoggetti inseribili di misure tali da poter essere inserite una nell'altra e, sempre per ragioni di ottimizzazione degli spazi ma anche di decontaminazione è stato realizzato sul piano di lavoro, un pozzetto di decontaminazione, drenato sul fondo con griglia di chiusura superiore.

La sezione centrale è munita di impianto per la misurazione di temperatura ed umidità relativa, di sensori dello strumento di rilevazione L.E.L. (esposimetro) che ha una centralina di visualizzazione esterna posizionata sulla parete del container e che serve ad avvisare qualora all'interno si verificasse la presenza di sostanze o si verificassero reazioni chimiche esplosive.

Sul piano della sezione centrale è inoltre presente uno scarico in sicurezza per i rifiuti solidi all'interno di sacchetti di materiale plastico chiusi mediante una termosaldatrice posizionata a valle dello scarico, all'esterno della glove box.

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

La procedura standard adottata negli interventi ci ha suggerito di effettuare tre aliquote di ogni campione, una per le analisi biologiche, una per quelle chimiche ed una terza da lasciare all'interno dell'isolatore per l'effettuazione di analisi successive. Le due quote destinate all'analisi da parte dei nostri laboratori biologico e chimico, vengono quindi trasferite attraverso un portello scorrevole pneumatico con interblocco, all'interno della sezione autoclave, all'interno di quest'ultima sezione avviene la sterilizzazione dei due campioni, mediante ciclo di 45 min. a 120°C ed 1 atm di pressione in autoclave a recupero dei vapori. Una volta sterilizzati i campioni vengono portati all'esterno del sistema per le analisi che vengono attualmente svolte mediante tecniche biomolecolari (RT-p.c.r.), di microscopia ed immunologiche.

Per le analisi che richiedono particolare attenzione a causa della pericolosità degli agenti potenzialmente coinvolti e per le analisi su virus a RNA, laddove risulta impossibile effettuare una operazione di preventiva inattivazione in autoclave, i procedimenti di estrazione e preparazione dei campioni per l'analisi mediante pcr ed addirittura l'analisi diagnostica stessa, possono essere effettuati all'interno del sistema chiuso di camere a guanti, a tale proposito è stata posizionata una mensola ribaltabile sulla parete di fondo del vano autoclave .

Le analisi del campione sterilizzato mediante rt-pcr e tecniche immunologiche vengono quindi effettuate su un bancone di acciaio posizionato di fronte al sistema di glove boxes.

All'interno del laboratorio sono presenti due armadi, in ingresso, per lo stoccaggio dei consumabili e dei reagenti, un frigorifero ed un congelatore (con data-logger per la registrazione delle temperature) per reagenti e campioni, un ripiano estraibile per l'alloggiamento di un p.c., una doccia (in ingresso), un lavandino con attiguo lavaocchi, un gruppo di continuità UPG, un gruppo di condizionamento aria, una apertura verso l'esterno per l'espulsione dei rifiuti non a rischio, una radio. Il settore laboratorio è separato dall'esterno mediante una precamera che funge anche da spogliatoio.

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

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



Figura 1 vista esterna del laboratorio biologico mobile



Figura 2 vista interna del laboratorio con il sistema integrato di glove boxes

Il laboratorio biologico mobile è una unità indipendente, sul retro del container è presente infatti un vano tecnico, all'interno del quale sono alloggiati il gruppo elettrogeno, il sistema di distribuzione delle alimentazioni elettriche, i serbatoi e la pompa per l'acqua, il compressore, tale vano è stato opportunamente insonorizzato.

Trattandosi del primo mezzo di questo tipo, pur essendo al momento attuale, a tutti gli effetti operativo, è attualmente oggetto di una campagna di studi, verifiche e prove effettuate dallo scrivente nucleo in collaborazione con l'IZS delle Venezie di Legnaro (PD), L'Università di Padova (C.R.I.B.I. e Dipartimento di Biologia Molecolare) ed i laboratori biologici dell'ARPA di Venezia.

## **2.2 Il laboratorio biologico fisso**

Il Laboratorio biologico fisso, tuttora in fase di allestimento presso la sede di Mestre, si compone di due ambienti più servizio ricavati all'interno di un container.

Uno degli ambienti interni sarà adibito a laboratorio vero e proprio, l'altro, per il momento è utilizzato come ufficio ma si sta valutando la possibilità di trasformarlo in una stanza DNA/RNA free per le operazioni di estrazione anche mediante l'acquisto ed installazione di una cappa biologica a flusso laminare verticale BLII, spostando l'ufficio logistico in altro locale.

## **2.3 La strumentazione scientifica**

Tutti i campioni sono analizzati con tecnica RT-pcr., ovvero mediante tests immunologici (Bio-strips) soprattutto per quanto riguarda le tossine biologiche come botulino e ricina. Lo strumento utilizzato per l'analisi è una RT-pcr. campale, spallabile, già in uso presso i reparti dell'esercito italiano. I laboratori biologici del Comando sono muniti della normale strumentazione da banco comprendente una cappa biologica statica per estrazione, centrifughe, vortex, termomixer, micropipettatrici, frigoriferi e congelatori per la conservazione di reagenti e campioni, contenitori ed attrezzature per il campionamento e trasporto dei campioni, decontaminanti e dispositivi di protezione individuale, campionatore d'aria a concentrazione su matrice liquida per ambienti chiusi.



Figura 7 RT-PCR campale e campionatore d'aria portatile

## **3.0 METODOLOGIE DI ANALISI**

Il laboratorio biologico del Comando di Venezia effettua prove mediante tecniche immunologiche (Bio-strips), microscopiche (microscopia in contrasto di fase) e biochimiche (rt-p.c.r.)

Le attuali possibilità, limitate principalmente dai reagenti in possesso, ci permettono allo stato attuale di identificare i principali agenti batterici di interesse per la sicurezza pubblica compresi in

classe A (Ministero della Salute - Osservatorio Epidemiologico Nazionale), delle più importanti biotossine, e, presto dei più importanti virus inclusi nella classe A (classi 3 e 4 ex Dlgs 626/94).

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

Il laboratorio biologico dei Vigili del Fuoco di Venezia in collaborazione con il laboratorio chimico e con il settore radiometrico ha sviluppato una attività sinergica allo scopo di riuscire ad individuare, con buona approssimazione, la tipologia di sostanza incognita presente nei campioni ambientali prelevati. Tale metodologia permette di ottenere risultati qualitativi accettabili e di fatto è l'unica che riesca a coniugarsi discretamente con le tempistiche e le esigenze del soccorso.

Al fine di chiarire l'attività di analisi che il laboratorio biologico è in grado di sviluppare si riporta di seguito uno schema di lavoro che attualmente è inserito all'interno delle procedure del nostro nucleo ed un esempio di report di analisi eseguita su campioni solidi durante un intervento effettuato nel corso del 2008.

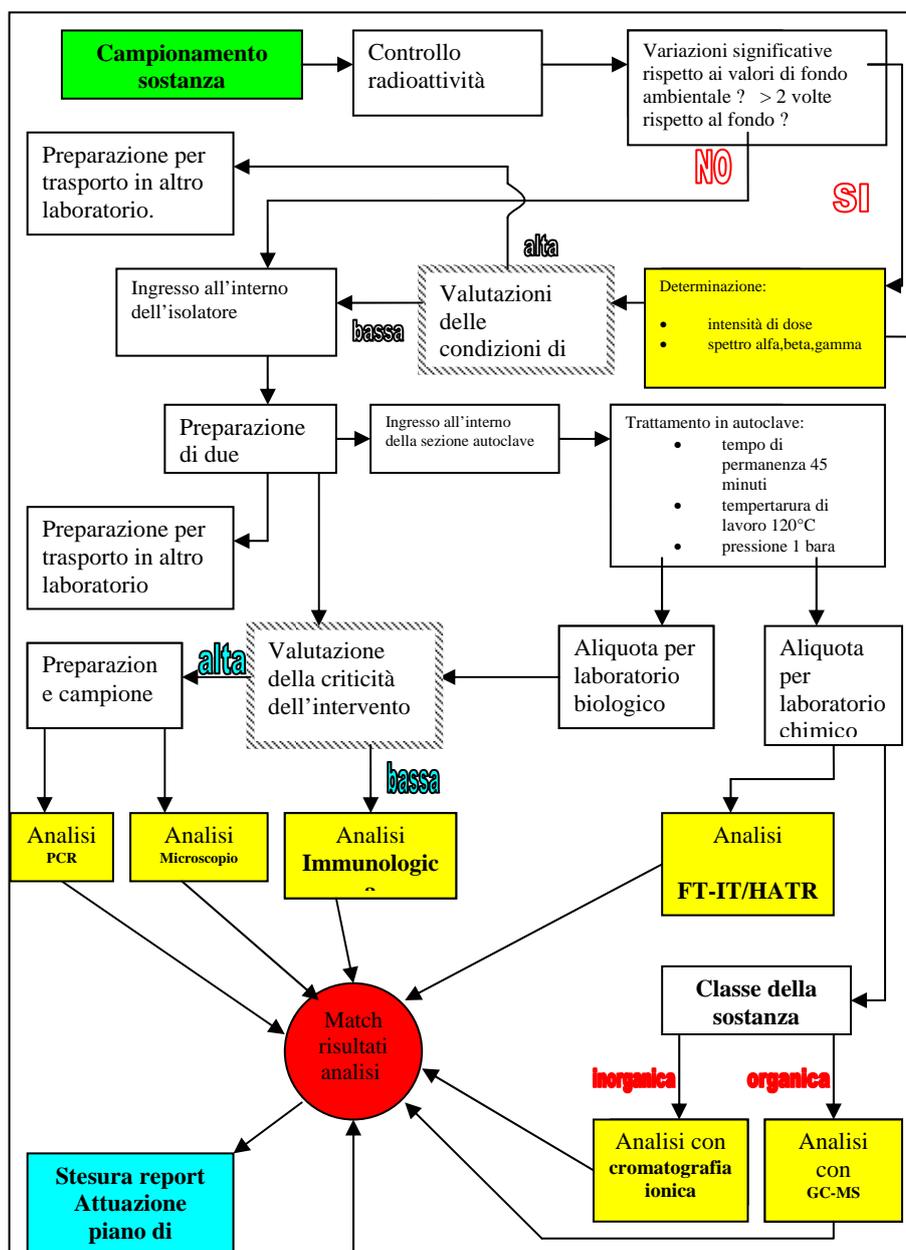


Figura 3. Schema delle procedure

## Analisi

### Fase1 Campionamento

- Stato del campione: solido (polvere);
- Prelievo: prelevato con swab inumidito in acqua distillata dnase-free, all'interno di una busta di carta (da lettere);
- Consegna: il campione è stato consegnato all'interno di una provetta con tappo a vite (tipo falcon) con all'interno 4 ml di acqua distillata dnase-free;
- La consegna è avvenuta alle ore 11.40

### Fase 2 Trattamento del Campione all'interno del sistema di camere a guanti (Lab. BL3):

- Il campione è stato introdotto all'interno del sistema di glove boxes attraverso il portello esterno e processato all'interno della prima e della seconda camera;
- Il campione, di circa 4 ml è stato sterilizzato mediante ciclo in autoclave ( 45 minuti a 120° C ed 1 atm di pressione);
- Un'aliquota (1,5ml) del campione è stata consegnata, dopo la sterilizzazione al laboratorio chimico del Comando per le analisi di competenza;

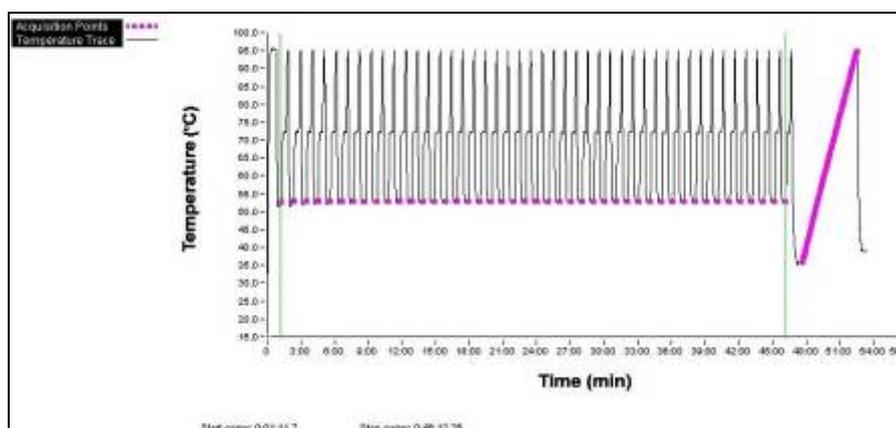


Figura.8 RT-PCR Grafico dei cicli

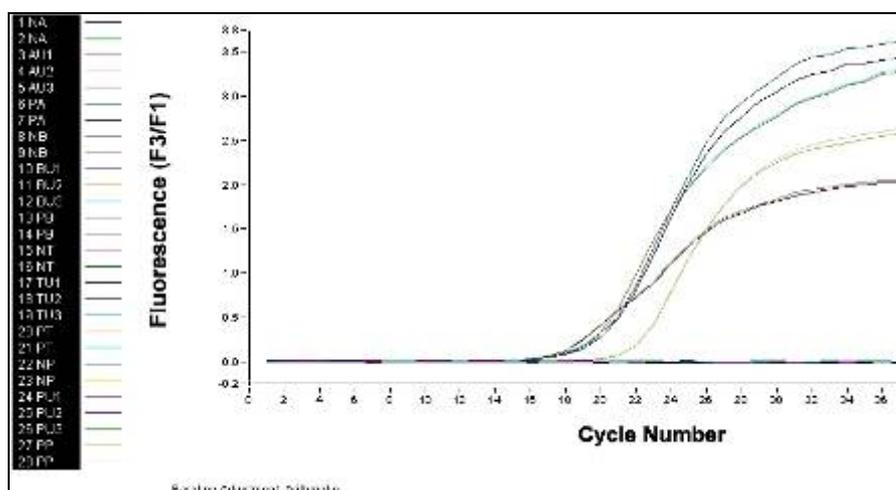


Figura 9 RT-PCR Grafico degli amplificati

### Fase 3. Analisi Biologica:

Il Campione è stato analizzato per la verifica della presenza dei seguenti patogeni:

Bacillus anthracis (plasmidico) – Yersinia pestis (genomico) – Francisella Tularensis (genomico) – Brucella spp(dna generico)

Il campione è stato analizzato con tecnica RT (real time)-pcr, con lo strumento “Rapid” della Idaho Technologies (nr. ser. AFO463).

L’analisi è stata effettuata mediante l’utilizzo di preparati liofilizzati della Biochem –Idaho Technology e più precisamente con il kit “Bio Trehat Screening Test”, per l’estrazione del DNA batterico è stato utilizzato il kit: IT 1-2-3 Rapid DNA Purification kit della Biochem – Idaho Technology.

L’analisi è stata ripetuta per due volte

#### **Risultati analisi n. 1:**

Campione 1): **negativo** per la presenza dei target ricercati;

#### **Risultati analisi n. 2:**

Campione 1): **negativo** per la presenza dei target ricercati;

#### **Risultati analisi n.3:**

Campione 1): **negativo** per la presenza dei target ricercati;

### Fase 4. Analisi Chimica:

Il laboratorio chimico del Comando, ha eseguito una analisi della soluzione mediante cromatografia ionica per la ricerca di fluoruri, cloruri, bromuri, nitrati, fosfati e solfati. Tale analisi ha dato esito positivo per la presenza di: bromuri e solfati, nelle rispettive proporzioni di ½.

Il dato quantitativo è relativo in quanto non si conosce la diluizione iniziale.

E’ stata anche effettuata una analisi mediante strumentazione FTIR, che conferma parzialmente i risultati ottenuti per i solfati anche se tale metodologia di analisi non è risultata adatta a causa dello stato liquido del campione.

## 4.0 Conclusioni

Il delicato e complesso campo di ricerca riguardante le tecniche di diagnostica rapida di agenti patogeni di interesse per la sicurezza pubblica, a tutt’oggi poco studiato, se non da alcune branche della ricerca sanitaria e militare, potrà e deve fornire, nel corso dei prossimi anni, spunti di lavoro e ricerca per tutti gli enti e gli organismi interessati, non prescindendo mai da una fattiva collaborazione tra gli operatori, collaborazione che oltre a permettere un maggiormente veloce raggiungimento degli obiettivi prefissati, amplierà a dismisura la possibilità di intervento in condizioni di emergenza, a favore di una sempre più efficace e capillare tutela delle persone e delle cose, tutela che è uno dei compiti precipui del Corpo Nazionale Vigili del Fuoco, il quale, anche in questo ambito sta sforzandosi di crescere, al passo con lo sviluppo scientifico e tecnologico, nell’adeguamento del proprio intervento ad un più ampio spettro di casistica immaginabile.

Tra gli obiettivi futuri del nostro nucleo, che dovranno essere sviluppati anche in collaborazione con istituti esterni, si elencano i seguenti progetti:

- Attività di incremento delle possibilità di analisi durante le emergenze biologiche. Tale attività verrà sviluppata mediante operazioni di campionamento di sostanze incognite su varia matrice, successiva amplificazione mediante RT-PCR dei campioni trattati, analisi su tali campioni, da parte di istituti esterni mediante tecniche di sequenziamento del DNA, allo scopo finale del riconoscimento di un ampio spettro di specie batteriche. Verrà anche valutata, in un secondo, la possibilità di dotarsi di un sequenziatore di DNA;
- Ricerca sulle tipologie di organismi e/o sostanze di interesse per un primo screening di sicurezza in ambiente civile (patogeni classe A-B) e su quali di queste possano essere individuate con successo con la strumentazione a disposizione del nostro laboratorio biologico, attribuendo in tal modo, un valore scientifico alla ricerca;
- Confronto tra dati derivanti da analisi di laboratorio classiche, coinvolgendo quindi laboratori di enti esterni, con quelli ottenuti con la strumentazione del laboratorio biologico VVF;

- Ricerca tossicologica sulle principali biotossine di interesse per la sicurezza civile;
- Ricerca sulle potenzialità e sulla affidabilità dei dati forniti dalle analisi mediante tecniche immunologiche per l' identificazione di microrganismi e tossine;
- Ricerca per la caratterizzazione genotipica dei ceppi batterici e/o virali di interesse sanitario-sicurezza civile, costruzione dei primers e reperimento dei controlli positivi per la diagnosi di presenza di tali organismi;
- Ricerca di protocolli ottimali per le analisi RT-pcr, anche mediante strumentazione campale;
- Ricerca e ottimizzazione di metodologie di decontaminazione (in ambiente e su persone);
- Studio di metodologie e strumentazioni per il campionamento.

A queste attività di laboratorio, si cercherà di affiancare attività di tipo gestionale definendo i binari preferenziali che permettano di effettuare:

- Ricerca e studio sulla gestione di macroemergenze nel settore biologico;
- Attivazione di un dottorato in 'Emergenze biologiche' in collaborazione con la Facoltà di Scienze Biologiche dell'Università di Padova;
- Realizzazione e perfezionamento di protocolli di campionamento ed analisi.