

# **Notiziario** del'Istituto Superiore di Sanità

**SPECIALE**



## **Bioterrorismo: come prepararsi e quali contromisure intraprendere**

**Inserto BEN:**

**Nuovi antinfiammatori  
in medicina generale**

**Prevalenza di cesarei  
e tipo di struttura  
di parto in Campania**

Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale articolo 2 comma 20/c legge 662/96 - Roma

ISSN 0394-9303

**Volume 15 - Numero 6**



**Enrico Garaci**

Quanto era già a conoscenza degli esperti del settore e, soprattutto, gli eventi seguiti al tragico attentato alle Twin Towers dell'11 settembre scorso hanno dimostrato che attacchi bioterroristici possono, non solo causare morte e diffondere malattie altamente contagiose, ma mettere in crisi l'apparato dei servizi sanitari e della sicurezza sociale, gettando nel panico intere nazioni. L'impatto degli attacchi bioterroristici, con o senza tecnologia avanzata, è tale da obbligare i governi e le autorità sanitarie a fornirsi dei migliori e più adeguati strumenti preventivi e di controllo e a preparare piani dettagliati di risposta.

Tali piani includono una trasparente e adeguata informazione sugli agenti, le malattie, i rischi e le risposte, un corretto training degli operatori sanitari coinvolti e, in particolare, la formazione di specialisti della risposta, persone preparate, anche a livello psicologico ed emotivo, a eventi che possono minare anche i comportamenti più corretti e mettere in crisi sicurezze, conoscenze, stili di vita.

In quest'ottica è precipuo compito della nostra Istituzione mettere al servizio del Paese le migliori conoscenze scientifiche e le più adeguate tecnologie per identificare le minacce biologiche, controbatterle limitandone l'impatto sanitario, ricercare gli strumenti di diagnosi, terapia e prevenzione capaci di migliorare sempre più la capacità di una risposta efficace a un eventuale attacco bioterroristico. Questo numero del *Notiziario* rappresenta la sintesi di un Corso di formazione specificamente diretto ai microbiologi laboratoristi e agli operatori di sanità pubblica, che si terrà in Istituto il 24 giugno 2002. Le lezioni e le dimostrazioni sono state tenute non da esperti "generici", ma direttamente da chi è stato chiamato dal nostro Ministro a prendere decisioni e approntare un piano che comprendesse tutti i parametri critici della preparazione e della risposta, con prospettive d'intervento immediato (vedi la minaccia di attacco con *Bacillus anthracis*), ma anche con un serio sforzo di preparazione a ogni possibile futuro scenario. Il mio ringraziamento agli organizzatori del Corso e a tutti i docenti che hanno voluto impegnarsi così proficuamente nella realizzazione di questo scientificamente valido e utile fascicolo del nostro *Notiziario*.



## S o m m a r i o

**Il laboratorio microbiologico per la lotta al terrorismo. Quali aspettative? . . . . . 3**

**Applicazioni di biologia molecolare nella diagnostica di *Bacillus anthracis* e altri batteri . . . . . 4**

***Yersinia pestis* . . . . . 8**

***Francisella tularensis* . . . . . 10**

**Diagnosi di infezioni sostenute da agenti virali di classe A: vaiolo e virus delle febbri emorragiche . . . 12**

**Febbri emorragiche causate da *Arenavirus* . . . . . 15**

**Uso bellico e terroristico della tossina botulinica . . . . 17**

**Antrace: esperienza del Centro di Riferimento Nazionale . . . 19**

**Il rischio del bioterrorismo nelle produzioni animali . . . 21**

**Emergenza antrace e sicurezza in laboratorio . . . 23**

**Il ruolo della Sanità Militare e degli organismi internazionali nella lotta al bioterrorismo . . . . . 26**

### BEN

**Nuovi antinfiammatori in medicina generale . . . . . i**

**Prevalenza di cesarei e tipo di struttura di parto in Campania . . . . . iii**

**Corso "Editoria scientifica: produzione e organizzazione di contenuti informativi su supporti tradizionali e in Internet" . . . . . 28**

## Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità

*Direttore responsabile e responsabile scientifico:* Enrico Garaci  
*Vice Direttore:* Franco Piccinno  
*Redattore capo:* Paola De Castro  
*Redazione:* Carla Faralli, Lorenza Scotti, Alessandro Spurio  
*Progetto grafico:* Eugenio Morassi  
*Grafica:* Massimo Delle Femmine  
*Fotografia:* Luigi Nicoletti, Antonio Sesta  
*Composizione e distribuzione:* Giovanna Morini, Patrizia Mochi  
*Versione online (www.iss.it/notiziario):* Simona Deodati, Marco Ferrari

**Istituto Superiore di Sanità**  
*Presidente:* Enrico Garaci - *Direttore generale:* Romano R. Di Giacomo  
Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma  
Tel. 0649901 - Fax 0649387118

e-Mail: [notiziario@iss.it](mailto:notiziario@iss.it) - Sito Web: [www.iss.it](http://www.iss.it)  
Telex 610071 ISTSAN I - Telegr. ISTISAN - 00161 Roma  
Iscritto al n. 475/88 del 16 settembre 1988. Registro Stampa Tribunale di Roma  
© Istituto Superiore di Sanità 2002  
Numero chiuso in redazione il 24 maggio 2002  
Stampa: Chicca - Tivoli

# Il laboratorio microbiologico per la lotta al terrorismo. Quali aspettative?



**Antonio Cassone**

**G**li attacchi bioterroristici sono un particolare banco di prova per il laboratorio microbiologico (1). Contrariamente a quanto si possa pensare, le maggiori difficoltà e gli specifici scogli da superare non sono costituiti né dalla necessità di eseguire una rapida diagnosi di un agente potenzialmente nuovo e sconosciuto (in quanto questo è o dovrebbe essere “il mestiere routinario” del microbiologo di sanità pubblica), né dalle difficoltà, pur esistenti, nel *sampling* dei materiali sospetti e nel loro trattamento. Per di più, gli avanzamenti tecnologici nella tipizzazione molecolare e nella diagnostica per sonde e per sequenze rendono possibile anche una rapida identificazione della sorgente dell’attacco. La vera difficoltà, specialmente per il nostro Paese, è nella preparazione di un’efficiente e flessibile rete infrastrutturale che colleghi le competenze microbiologiche locali a quelle regionali e centrali, i laboratori di 1° livello a quelli di riferimento, il clinico al microbiologo clinico e al microbiologo “arbitro” dei centri di riferimento e standardizzazione diagnostica, tipizzazione microbiologica e sorveglianza delle resistenze farmacologiche. I Centers for Disease Control and Prevention (CDC) degli Stati Uniti chiamano questa rete a *multilevel laboratory response*, un network che collega laboratori, centri clinici, ospedali fra di loro e con le strutture di ricerca pubbliche e

private, in un’interconnessione reale e funzionale (2). È chiaro che l’evento nuovo e insolito che deve essere velocemente individuato per una rapida e, si spera, efficace reazione non avverrà nei corridoi dei laboratori di riferimento dove i *referee* microbiologi passeggiano parlando di sequenze, real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) e *microarray* diagnostici; tale evento potrebbe avvenire in uno sperduto paese di provincia, dove un medico di famiglia avveduto chiederà aiuto al laboratorista del piccolo ospedale per fare una diagnosi di un’improvvisa febbre associata o meno a una rapida insorgenza di una grave sepsi, non spiegabile o non attribuibile alle patologie più comunemente osservate (antrace? tularemia?) o di un *rash*, o di una papula cutanea “strana” per la normale routine clinica (vaiolo?), o di una paralisi flaccida ambolaterale discendente (botulismo?). C’è una piccola *window of opportunity* da quando ci si accorge di qualcosa di nuovo a quando il fenomeno acquisterà proporzioni evidentemente epidemiche. Solo sfruttando al meglio questa piccola finestra si potranno limitare, non annullare, i danni. Per questo, è assolutamente necessario che il medico sia accorto e preparato e il microbiologo rapido nell’agire e nell’utilizzare il network microbiologico che potrà garan-

tire l’efficienza nell’identificazione del patogeno, della sua sorgente, delle sue caratteristiche genetiche, con particolare riguardo ai fattori di resistenza farmacologica. È specifico compito dei microbiologi di sanità pubblica, a livello italiano, europeo e mondiale, costituire, implementare, valutare e controllare la qualità e l’efficienza nel tempo della *multilevel laboratory response*, la migliore risposta possibile all’attacco bioterroristico, provvedendo a quella che di fatto è la base per ogni tipo di preparazione e risposta, cioè l’identificazione della natura (patogeno), della qualità (ceppo e sorgente) e della specificità (resistotipo) della minaccia bioterroristica.

## Ringraziamenti

Gli autori e, in particolare, il Responsabile scientifico del Corso cui questo numero del *Notiziario* si ispira, Antonio Cassone, sono grati a tutti i componenti e collaboratori della Segreteria del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica per il lavoro svolto. Un ringraziamento particolare ad Anna Maria Marella e Giuseppina Mandarino per l’eccellente attività segretariale.

## Riferimenti bibliografici

1. Cassone A, Luzzi I, Pantosti A, et al. *Not Ist Super Sanità* 2001; 14(11): 11-5.
2. *MMWR* 2001; 50(45): 1008-10.

**Antonio Cassone**

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ISS

## Applicazioni di biologia molecolare nella diagnostica di *Bacillus anthracis* e altri batteri

**N**ella diagnostica microbiologica l'identificazione definitiva di isolati batterici avviene generalmente tramite l'esecuzione di test di caratterizzazione biochimica o antigenica che richiedono la crescita e la manipolazione di sospensioni batteriche. Come è intuibile, nel caso di agenti altamente patogeni, quest'approccio diagnostico può creare problemi di sicurezza per gli operatori e per l'ambiente nel quale essi operano. Un approccio basato su tecniche di biologia molecolare costituisce in questo caso una validissima alternativa, sia perché le analisi possono essere effettuate su campioni inattivati o direttamente su DNA estratto, sia perché i risultati portano all'identificazione certa del microrganismo responsabile. Sono di seguito riportate alcune metodiche molecolari messe a punto per l'identificazione di *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis*, utili per la conferma definitiva di stipiti batterici eventualmente isolati dai laboratori di microbiologia di 1° livello.

### PROCEDURE DI IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

#### Estrazione e purificazione del DNA da colonia batterica

Per motivi di sicurezza degli operatori, tutte le procedure tecniche di estrazione e purificazione del DNA

batterico devono essere eseguite in un laboratorio di biosicurezza P3, sotto una cappa biologica Biohazard. Il DNA viene estratto direttamente da patina batterica cresciuta su una piastra di agar sangue a 37 °C, mediante l'impiego di kit commerciali. Sono stati sviluppati protocolli di estrazione diversi per *F. tularensis*, *Y. pestis* e *B. anthracis*. Infatti, le cellule di *B. anthracis* necessitano di un pretrattamento con lisostafina, per la digestione della spessa parete batterica.

**Sono state messe a punto metodiche molecolari per l'identificazione di batteri altamente patogeni**

#### PCR identificativa per *B. anthracis*

La ricerca di metodi molecolari rapidi atti all'individuazione della presenza di tracce di *B. anthracis* si è concentrata principalmente su due tipi di bersaglio molecolare: il gene della subunità b dell'RNA polimerasi, localizzato sul cromosoma del batterio, e i geni di virulenza localizzati sui due

**Le metodiche molecolari per l'individuazione di *Bacillus anthracis* prevedono rapidità nell'esecuzione del test**

plasmidi pXO1 e pXO2 presenti nei ceppi virulenti del batterio. Per il riconoscimento del plasmide pXO1 sono stati descritti oligonucleotidi specifici per uno dei componenti della tossina (gene pag), del fattore edematoso (gene cya) o del fattore letale (gene lef), mentre la presenza del plasmide pXO2 viene ricercata mediante una coppia di oligonucleotidi disegnati su uno dei geni che codificano per le proteine della capsula del batterio (geni cap B, C, A) (1).

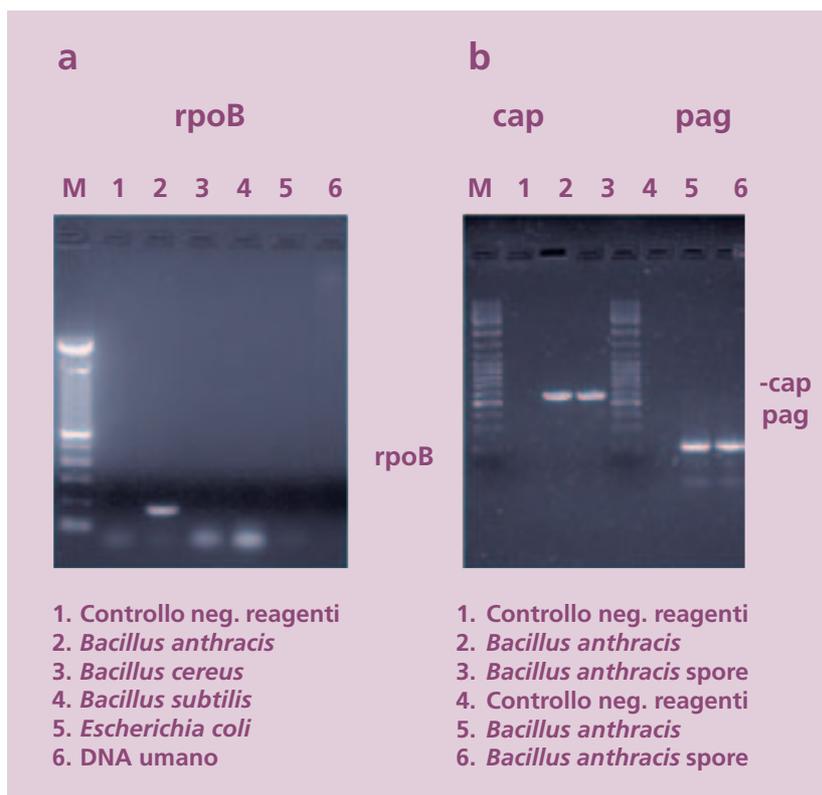
Le tecniche di rilevazione di *B. anthracis*, basate sull'amplificazione per PCR dei geni rpoB, cap e pag (2, 3), sono state riprodotte dal gruppo di studio per il bioterrorismo del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

La Figura 1a mostra il risultato delle PCR sul gene rpoB condotte sui DNA di *B. anthracis* (corsia 2), *Bacillus cereus* (corsia 3), *Bacillus subtilis* (corsia 4), *Escherichia coli* (corsia 5) e su DNA estratto da cellule umane (corsia 6). Sebbene il gene della subunità b dell'RNA polimerasi mostri un livello di omologia superiore al 98%

**Alessandra Carattoli<sup>1</sup>, Alessandra Ciervo<sup>1</sup>, Gianni Pozzi<sup>2</sup> e Marco Oggioni<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ISS

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Molecolare, Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Università degli Studi di Siena, Siena



**Figura 1** - Identificazione di *Bacillus anthracis* mediante amplificazione di geni specifici

per i ceppi di specie diverse appartenenti al genere *Bacillus*, questa coppia di *primer*, in determinate condizioni, riesce a riconoscere specificatamente solo il gene di *B. anthracis* e non amplifica quello degli altri bacilli, né quello di altri batteri o dell'uomo. Questa tecnica si è dimostrata alquanto difficile da applicare in quanto necessita di condizioni di PCR particolari, quali l'aggiunta della Taq polimerasi dopo un lungo ciclo di riscaldamento (*hot start*). In altre condizioni sono state osservate reazioni di positività con il *B. cereus* e per questo motivo la metodologia può essere considerata poco affidabile e deve essere affiancata da ulteriori prove molecolari di conferma come le PCR condotte per i geni *cap* e *pag* mostrate in Figura 1b. Questa Figura mostra il risultato delle PCR sul DNA estratto di *B. anthracis* (corsie 2 e 5, rispettivamente) e su spore non trattate di *B. anthracis* CarboSap (corsie 3 e 6, rispettivamente). Il ceppo *B. anthracis* CarboSap è un vaccino vivo atte-

nuato prodotto per uso veterinario, che possiede entrambi i plasmidi di virulenza del ceppo patogeno (4).

I prodotti di PCR osservati sono del peso molecolare di 572-bp per il gene *cap* e di 210-bp per il gene *pag* e risultano essere specifici per l'individuazione dei due plasmidi pXO1 e pXO2 di *B. anthracis*.

#### Identificazione di *B. anthracis* mediante un saggio di real-time PCR

La necessità di individuare metodi identificativi di altissima specificità e sensibilità è di primaria importanza nel caso di uso deliberato a scopo bioterroristico di spore di *B. anthracis*. Tra le tecniche disponibili la più innovativa è senz'altro quella basata sulla tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy

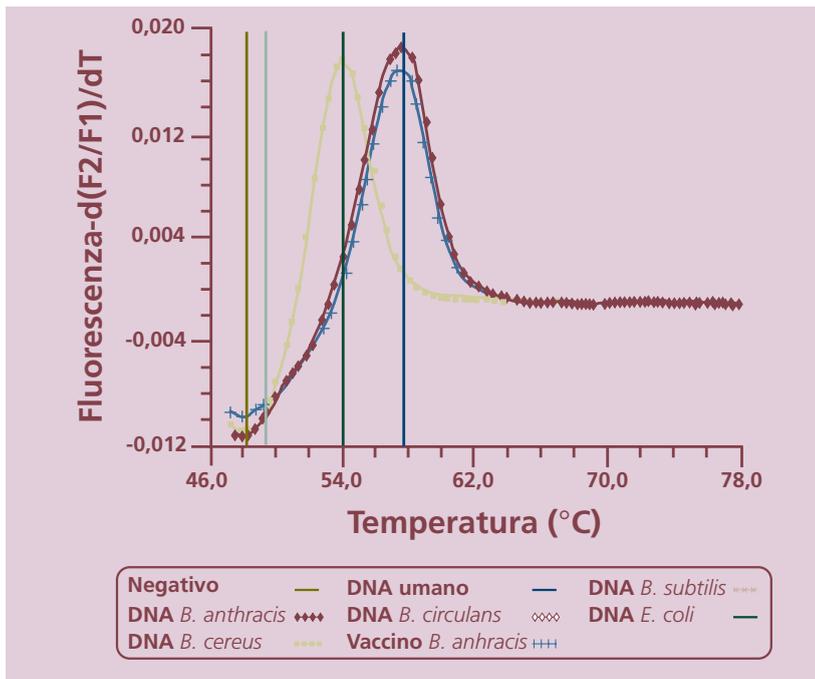
Transfer) applicata alla PCR in tempo reale (real-time PCR). Questa tecnica permette di amplificare un frammento di DNA e contemporaneamente di ibridarlo con sonde specifiche, analizzando la cinetica di dissociazione dell'ibrido in funzione della temperatura. La procedura consiste nell'utilizzazione di due sonde oligonucleotidiche che mappano sullo stesso frammento di PCR a distanza di pochi nucleotidi l'una dall'altra: una sonda viene marcata con una fluoresceina al 3' che emette a lunghezza d'onda di 520 nm, mentre l'altra è marcata al 5' con un fluorocromo che emette nel rosso a 640 nm (LC Red 640). Il tracciante LC Red 640 emette la fluorescenza solo se eccitato dall'emissione della fluoresceina. La specificità dell'ibridazione è garantita dal fatto che l'emissione di fluorescenza rossa avviene solo quando entrambe le sonde ibridano sullo stesso frammento di DNA amplificato. Se il frammento amplificato ha una sequenza nucleotidica con una o più mutazioni puntiformi rispetto a quella della sonda, la temperatura di dissociazione ( $T_m$ ) dell'ibrido sarà più bassa che nel caso di sequenze perfettamente identiche. Si possono ottenere delle curve di dissociazione dell'ibrido monitorando la fluorescenza in funzione della temperatura.

Questa tecnica è stata applicata al riconoscimento di *B. anthracis* utilizzando due sonde

in grado di riconoscere il gene *rpoB* di *B. anthracis* da quello di qualunque altro batterio, anche da quello di *B. cereus*, con altissima specificità e ridotti tempi di lavoro. Come si può vedere dalla

Figura 2, con la tecnica descritta si ottengono due curve di dissociazione delle sonde assolute-

Una tecnica innovativa per l'identificazione di *Bacillus anthracis* è basata sulla tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)



**Figura 2** - Rilevazione di *Bacillus anthracis* mediante real-time PCR

mente diverse per il *B. cereus* ( $T^m$  54 °C) e per il *B. anthracis* ( $T^m$  57,6 °C). La stessa curva di dissociazione si ottiene sia per il *B. anthracis* patogeno che per il ceppo vaccinale Carbosap. Non si ottiene alcun segnale di ibridazione sul DNA di altri batteri o sul DNA umano a indicare l'altissima specificità di questa tecnica (5).

### PCR identificativa per *Y. pestis*

*Y. pestis* è l'agente infettivo che causa la peste bubbonica, una malattia fortunatamente molto rara nel mondo e per questo motivo scarsamente studiata a livello molecolare. *Y. pestis* è tuttavia considerato uno dei più probabili agenti infettivi utilizzabili come arma batteriologica a scopi bioterroristici e recentemente sono state studiate nuove procedure di identificazione rapida al fine di supportare in tempo reale un'eventuale conferma diagnostica.

*Y. pestis* mostra un 90% di omologia di sequenza a livello del DNA cromosomale con *Y. pseudotuberculosis*, un batterio largamente diffuso nell'ambiente. Questo significa che le metodologie molecolari applicabili all'identificazione definitiva di *Y. pestis* devono essere

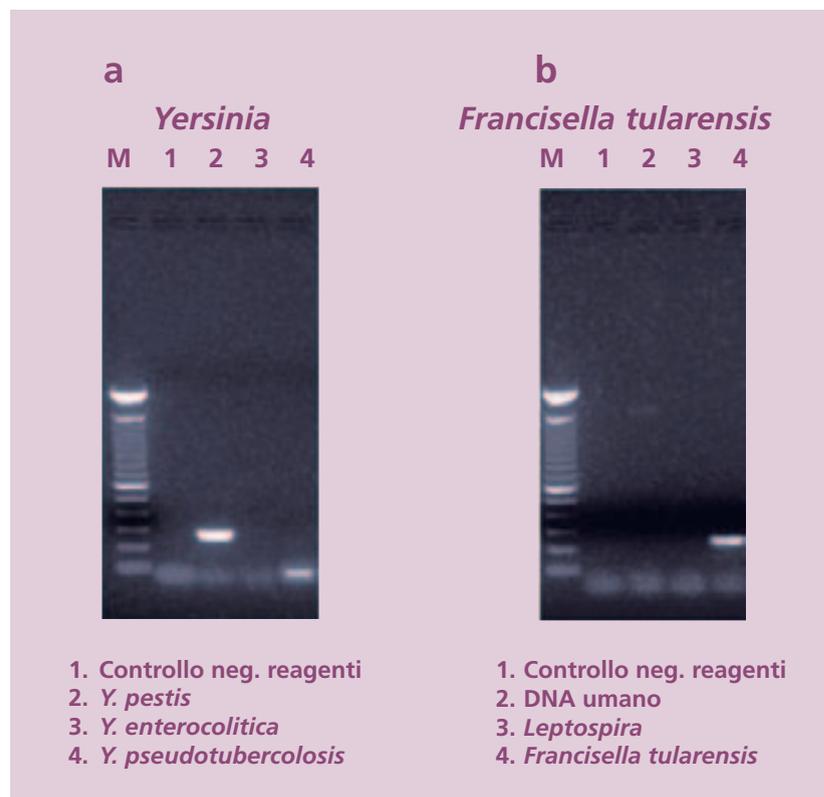
in grado di riconoscere specificamente queste due specie. Recentemente uno studio condotto negli USA (6), basato sulla tecnica dell'ibridazione sottrattiva, ha permesso di individuare delle regioni uniche nel genoma di *Y. pestis* sul-

le quali è stato possibile disegnare oligonucleotidi specifici da utilizzare per PCR tali da permettere di distinguere *Y. pestis* da *Y. pseudotuberculosis*. La Figura 3a mostra il risultato delle PCR condotte sui DNA di *Y. pestis* (corsia 2), *Y. enterocolitica* (corsia 3) e *Y. pseudotuberculosis* (corsia 4). Il prodotto di PCR presenta il peso molecolare di 276 bp ed è risultato essere specie-specifico perché permette di distinguere *Y. pestis* dalle altre yersinie. Inoltre, gli oligonucleotidi utilizzati non hanno mostrato nessuna reattività crociata con DNA estratto da altri batteri, da agenti virali o da cellule eucariotiche, comprese quelle umane.

### PCR identificativa per *F. tularensis*

*F. tularensis* è un coccobacillo estremamente virulento che causa la tularemia e di cui sono noti più biovar.

L'amplificazione genica per PCR è stata messa a punto per *F. tularensis* quale metodo molecola-



**Figura 3** - Identificazione di *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis* mediante amplificazione di geni specifici



re rapido e di supporto per la conferma diagnostica. La metodologia e gli oligonucleotidi sono stati recentemente descritti (7). Questa PCR permette l'amplificazione di una regione interna al gene codificante per una proteina di membrana di superficie specifica per questo batterio.

La Figura 3b mostra il risultato delle PCR condotte sul DNA umano (corsia 2) e sui DNA genomici di *Leptospira* (corsia 3) e *F. tularensis* (corsia 4).

Il prodotto di PCR presenta il peso molecolare di 330 bp ed è risultato essere specifico solo per *F. tularensis* poiché non presenta alcuna reattività crociata o produzione di ampliconi con gli altri DNA esaminati. Questo tipo di metodologia è stata usata con successo anche direttamente su campioni biotici di origine umana per la rilevazione del batterio nel sangue in un paziente con sospetta tularemia negli USA (4), nelle secrezioni purulen-

te di un bambino affetto da tularemia ulceroglandulare in Svezia (8) e in aspirati linfonodali di pazienti coinvolti in una recente epidemia avvenuta in Spagna (9). In quest'ultimo caso, l'analisi per PCR è stata eseguita anche su campioni ambientali e prodotti ittici individuati come sorgenti dell'infezione.

Tuttavia, questa metodologia non consente l'individuazione del biovar. A

questo scopo un'altra metodologia basata sull'amplificazione del rDNA 16S di questo batterio, seguita dall'analisi nucleotidica del prodotto amplificato,

consente di individuare all'interno di un frammento di 75 paia di basi del rRNA 16S una regione di "firma", in cui alcune mutazioni puntiformi permettono di differenziare *F. tularensis palaeartica* da *F. novicida* e *F. tularensis* e anche da altri membri del genere *Francisella* quali *F. phylomiragia* (9). Ovviamente questo tipo di analisi non è da ritenersi strettamente ne-

cessario per l'identificazione diagnostica ma può essere utilissimo per la tipizzazione batterica, da attuare per successive valutazioni di carattere epidemiologico e investigativo.

## CONCLUSIONI

Le applicazioni di biologia molecolare descritte in questo lavoro sono basate sull'amplificazione genica mediante PCR. Tale metodologia risulta essere un eccellente strumento di diagnostica rapida e di conferma definitiva e nel caso di agenti altamente patogeni rappresenta senza dubbio la procedura più rapida, sensibile, specifica e di elevato livello di sicurezza per l'operatore. È opportuno sottolineare che tali metodiche devono essere eseguite solo in laboratori specializzati e con precedente esperienza specifica, al fine di evitare risultati confondenti o addirittura falsi positivi. Sebbene questa precauzione sia sempre necessaria nella diagnostica, in caso di uso deliberato di agenti infettivi a scopo bioterroristico, tale attenzione diventa assolutamente indispensabile.

## Riferimenti bibliografici

1. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, et al. FEMS Microbiol Lett 1996; 145: 9-16.
2. Makino SI, Cheun HI, Watarai M, et al. Lett Appl Microbiol 2001; 33: 237-40.
3. Qi Y, Patra G, Liang X, et al. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 3720-7.
4. Fasanella A, Rosito S, Trotta T, et al. Vaccines 2001; 19: 4214-8.
5. Oggioni M, Meacci F, Carattoli A, et al. Real-time PCR for identification of anthrax spores in nasal swabs. (materiale non pubblicato).
6. Radnedge L, Gamez-Chin SG, McCready PM, et al. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 3759-62.
7. Long G, Oprandy J, Narayanan R, et al. J Clin Microbiol 1993; 31: 152-3.
8. Karhukorpi EK, Karhukorpi J, Sand J Infect Dis 2001; 33: 383-5.
9. Anda P, del Pozzo JS, Garcia JMD, et al. Emerg Infect Dis 2001; 7: 575-82.

**La metodica relativa all'amplificazione genetica mediante PCR deve essere utilizzata in laboratori specializzati**

## Yersinia pestis

La peste è una malattia zoonotica dei roditori e di altri animali, il cui agente etiologico è rappresentato da *Yersinia pestis*. L'uomo può contrarre la malattia attraverso il morso di pulci infette, sviluppando la peste bubbonica. Solo in una piccola percentuale dei casi, i soggetti infettati attraverso questa via di trasmissione sviluppano sepsi senza bubboni. Né la peste bubbonica, né quella setticemica si diffondono direttamente da persona a persona.

Una bassa percentuale di casi di peste bubbonica o setticemica sviluppa peste polmonare e in quest'ultimo caso è possibile il contagio da persona a persona attraverso l'aerosol. I soggetti che contraggono la malattia tramite questa via sviluppano peste polmonare primaria.

La dose infettante, attraverso l'aerosol, è di 100-500 microrganismi. Il periodo di incubazione per l'infezione polmonare primaria è solo di 1-3 giorni ed è per questo che *Y. pestis* viene considerato un potenziale agente di bioterrorismo.

Il periodo di incubazione per la forma bubbonica o setticemica è più lungo, in genere di 2-8 giorni. La peste polmonare è trasmissibile fino a quando il microrganismo è presente nella saliva (fino a 72 ore dopo l'inizio del trattamento antibiotico).

### EPIDEMIOLOGIA

Nel mondo, negli ultimi 50 anni, sono stati riportati circa 1 700 casi di peste l'anno. Casi isolati e

episodi epidemici di peste vengono ancora riportati regolarmente in vari Paesi dell'Africa, dell'Asia e del Sud America. Negli USA, dal 1947 al 1996, sono stati notificati 390 casi di peste, di cui l'84% bubbonica, il 13% setticemica e il 2% polmonare. La maggior parte dei casi

si è verificata in Colorado, Nuovo Messico, Arizona e California. Recentemente, nel 1997, un piccolo episodio epidemico di peste polmonare si è verificato in Madagascar.

### MANIFESTAZIONI CLINICHE

La peste bubbonica è la forma di infezione più comune dovuta all'inglobamento dei batteri da parte dei macrofagi dell'ospite nei linfonodi più vicini al morso della pulce. I linfonodi interessati si infiammano, aumentano di volume e provocano dolore a causa della replicazione del batterio. Dai linfonodi infettati i batteri possono provocare una setticemia o batteriemia, raggiungendo occasionalmente i polmoni (forma polmonare).

La progressione della peste polmonare è rapida e se non trattata può condurre alla morte in pochi giorni. Comunque, la forma polmonare è rara e richiede uno stret-

to contatto affinché sia possibile la trasmissione. Una diagnosi precoce con trattamento antibiotico immediato è efficace contro tutte le forme di peste.

### TRATTAMENTO E PREVENZIONE

*Y. pestis* è generalmente suscettibile a un gran numero di antimicrobici, inclusi aminoglicosidi,  $\beta$ -lattamici, trimethoprim, fluorochinoloni, cefalosporine, tetracicline, cloramfenicolo e sulfonamidi. Alcuni ceppi isolati nel corso dell'epidemia in Madagascar sono risultati resistenti alle tetracicline, due ceppi alla streptomina e uno solo è risultato resistente ad ampicillina, tetraciclina, cloramfenicolo, e sulfonamidi, ma sensibile a trimethoprim, fluorochinoloni e cefalosporine.

I fluorochinoloni offrono il vantaggio di essere i farmaci d'elezione anche per altri potenziali agenti utilizzati nel bioterrorismo, come l'antrace e la tularemia.

Il vaccino inattivato composto da batteri uccisi in formalina non è più disponibile.

### DIAGNOSI DI LABORATORIO

Nel caso di campioni potenzialmente infetti è necessario adottare in laboratorio pratiche di biosicurezza con contenimento di livello 2. È raccomandato l'utilizzo di una cappa a flusso con filtri

La peste è una malattia zoonotica trasmissibile all'uomo

La progressione della peste polmonare è rapida e se non trattata può condurre alla morte

Ida Luzzi e Annalisa Pantosti

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ISS

HEPA. Gli operatori devono indossare indumenti di protezioni personale (camici monouso, guanti di lattice, mascherine). Sono raccomandati anche occhiali o schermi di protezione. Le procedure devono essere eseguite da microbiologi o tecnici di microbiologia esperti.

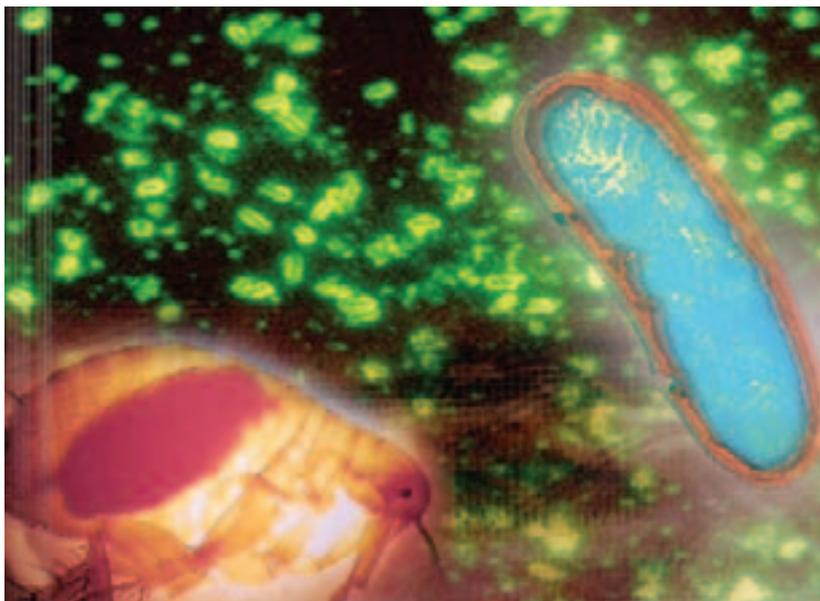
Non esistono test diagnostici rapidi per la peste e i test di conferma sono disponibili solo presso laboratori di riferimento.

### ESAME BATTERIOSCOPICO DIRETTO

Nel caso di infezione acuta, per una diagnosi presuntiva rapida, è possibile mettere in evidenza la presenza del batterio direttamente nel campione clinico (sangue, escreato, linfonodo aspirato), allestendo due vetrini con uno striscio del materiale in esame, fissandoli per 1 min con etanolo assoluto oppure per 10 min con metanolo e colorandoli uno con il Gram e l'altro con il Giemsa per l'osservazione al microscopio.

La presenza di coccobacilli Gram negativi con colorazione bipolare è fortemente indicativa della presenza di *Y. pestis*.

Nel caso si giunga a un sospetto (identificazione presuntiva) del-



la presenza di *Y. pestis*, è necessario procedere alla conferma attraverso la coltura.

### ESAME CULTURALE

I campioni clinici in esame devono essere seminati su agar sangue e agar McConkey e incubati aerobicamente sia a 28 che a 37 °C per 24-48 ore. L'aggiunta del terreno selettivo *Yersinia* CIN agar può risultare utile per i campioni "contaminati", come la saliva.

Su agar sangue *Y. pestis* forma colonie grigio-bianche traslucide, di solito troppo piccole per essere individuate dopo 24 ore di incuba-

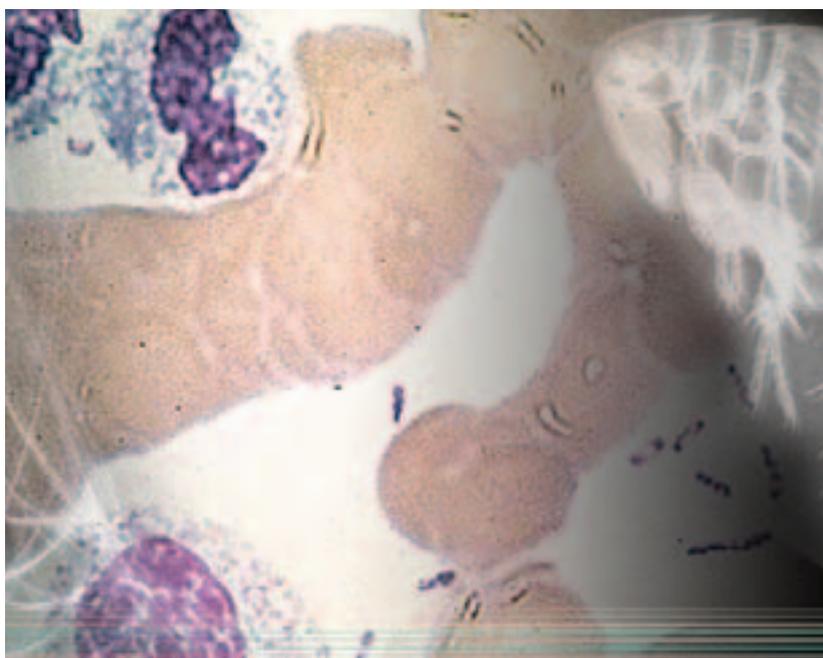
zione. Dopo 48 ore esse raggiungono il diametro di 1-2 mm, risultano grigio-bianche, tendenti leggermente al giallo e opache. Inoltre, non è presente emolisi. Ceppi di laboratorio subcoltivati crescono più velocemente e formano colonie più grandi. Con un ingrandimento 4x, dopo 48-72 ore di incubazione, le colonie presentano una morfologia convessa e irregolare, tipo "uovo fritto" che si accentua con il tempo. Le colonie possono avere una superficie lucente come il "rame martellato". Su McConkey le colonie appaiono puntiformi e non fermentanti il lattosio, le colonie possono sparire dopo 2-3 giorni per probabile autolisi.

Al Gram i batteri si presentano pleomorfi e possono avere la tipica colorazione bipolare.

Se il tipo di crescita e la colorazione al Gram confermano il sospetto di *Y. pestis* è consigliabile inviare il campione o la coltura a un laboratorio di riferimento per la conferma diagnostica.

*Y. pestis* è catalasi positiva e ossidasi negativa.

L'identificazione biochimica può essere effettuata utilizzando il sistema API20E o altri prodotti commerciali simili che, tuttavia, hanno un basso grado di attendibilità. Una identificazione definitiva può essere ottenuta attraverso metodi molecolari



## Francisella tularensis

**N**el 1911 McCoy descrisse una malattia simile alla peste che colpiva gli scoiattoli della California e l'agente responsabile fu chiamato *Bacterium tularensis*, dal nome della contea di Tulare. La malattia umana fu descritta da Francis nel 1921 come tularemia e, in suo onore, il batterio fu ribattezzato *Francisella tularensis*. Sono noti due biotipi di *F. tularensis*, il tipo A (*F. tularensis* sottospecie *tularensis/nearctica*) e il tipo B (*F. tularensis* sottospecie *holarctica/palearctica*).

*F. tularensis* è uno dei batteri con più alta infettività e può causare patologie gravi e mortali nell'uomo. Per alcuni ceppi di tipo A è sufficiente l'inoculazione o l'inalazione di dieci batteri per indurre la malattia. Per questo motivo *F. tularensis* è considerata un potenziale agente di bioterrorismo. L'impatto maggiore sulla popolazione, in termini di morbilità e mortalità, sarebbe ottenuto dall'aerosolizzazione di un ceppo altamente virulento, con conseguente inalazione di particelle infettive e sviluppo di un quadro broncopneumonico o settico.

### EPIDEMIOLOGIA

La tularemia è principalmente una malattia degli animali selvatici, soprattutto piccoli mammiferi, che fungono da serbatoio naturale. La malattia è acquisita tramite puntura di zecche, zanzare o mosche oppure direttamente dalla contaminazione ambientale (carcasse infette, acqua, fieno contaminato).

La malattia è endemica in varie parti del mondo: in Europa (soprattutto Nord Europa, Russia, ma anche Spagna, Kosovo, ecc.) e Asia del Nord (soprattutto Giappone) sono state segnalate numerose epidemie dovute al tipo B. Le infezioni da tipo A, più virulente, sono generalmente più gravi, sporadiche e più frequenti in Nord America.

### INFEZIONE E MALATTIA

Nell'uomo la tularemia può essere acquisita attraverso la puntura di artropodi infetti, soprattutto nei mesi estivi, oppure attraverso la manipolazione di tessuti animali infetti, l'ingestione di acqua o cibo contaminato, l'inalazione di particelle infettive aerosolizzate, manipolando, ad esempio, fieno infetto.

Il periodo d'incubazione è di 2-10 giorni. I batteri si replicano sulla cute nel sito d'inoculazione dove in genere si forma un'ulcera. Dal sito di inoculazione i batteri sono trasportati dal sistema linfatico ai linfonodi periferici e quindi possono dare luogo a un'infezione generalizzata. Nelle prime fasi della malattia i sintomi sono aspecifici: senso di malessere, brividi, cefalea e febbre.

Nella maggior parte dei casi (45-80%), la tularemia si presenta come una malattia ulceroghiandolare, solo ghiandolare nel 10-25% dei casi e, più raramente (< 5% dei

casi), oculoghiandolare, setticemica, orofaringea o polmonare. L'attacco è improvviso: generalmente il paziente accusa febbre elevata (38-40 °C), accompagnata da brividi, cefalea, dolori generalizzati soprattutto agli arti inferiori, corizza, faringite, tosse e dolore o senso di costrizione toracico.

In assenza di trattamento i sintomi persistono per numerose settimane. Alcune forme di tularemia possono essere complicate da una diffusione sistemica con quadri di polmonite (comune), sepsi (non comune) o meningite (rara). La vasta epidemia che ha colpito il Kosovo dal 1999, e che è tutt'ora in corso, si è manifestata prevalentemente con una forma orofaringea (da ingestione) caratterizzata da febbre, faringite e linfadenite suppurativa del collo.

### TRATTAMENTO E PREVENZIONE

Gli aminoglicosidi (streptomina o gentamicina) sono i farmaci di scelta per le infezioni da *F. tularensis*. Doxiciclina e cloramfenicolo sono alternative accettabili, ma occasionalmente possono dare fallimenti terapeutici o ricadute. Recentemente è stata utilizzata con successo la ciprofloxacina (di scelta per la profilassi). Le penicilline e le cefalosporine non sono efficaci.

Un vaccino vivo attenuato è stato utilizzato dal 1959 per immunizzare il personale di laboratorio a rischio d'infezione e il personale militare, ma questo non è registrato in nessun Paese. Il vaccino è somministrato in unica dose mediante scari-

La tularemia può essere acquisita dall'uomo tramite la puntura di artropodi, l'ingestione di acqua o di cibo contaminati

Ida Luzzi e Annalisa Pantosti

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ISS

ficazione. Studi su volontari hanno dimostrato una parziale protezione contro batteri aerosolizzati.

## PRECAUZIONI OSPEDALIERE E DECONTAMINAZIONE

Per la prevenzione della trasmissione di tularemia in ambito ospedaliero sono necessarie solo precauzioni standard, dal momento che la trasmissione uomo-uomo non è stata dimostrata. In corso di autopsia devono essere evitate le procedure che possano causare aerosol.

La decontaminazione delle superfici può essere eseguita con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, da rimuovere con etanolo al 70%.

Nell'ambiente esterno *F. tularensis* sopravvive per lunghi periodi in acqua, in terra, nelle carcasse di animali e la sopravvivenza aumenta se la temperatura è bassa. Per quanto riguarda le particelle infettanti disperse artificialmente (per rilascio intenzionale), non è noto per quanto tempo possano sopravvivere all'interno degli edifici o in un centro urbano. I livelli standard di clorazione dell'acqua potabile sono sufficienti a prevenire la contaminazione da *F. tularensis*.

## DIAGNOSI DI LABORATORIO

### Sierologia

Per la diagnosi di tularemia si utilizza in genere un test sierologico (ELISA). Un aumento di 2-4 volte del titolo anticorpale tra la fase acuta e la fase di convalescenza (2-4 settimane) permette una diagnosi di certezza di tularemia. Un singolo titolo alto può essere suggestivo di malattia. Il test sierologico è però di scarsa utilità per riconoscere rapidamente e contenere un rilascio deliberato di *F. tularensis*. Recentemente un test ELISA di "cattura", che utilizza anticorpi monoclonali diretti verso *F. tularensis*, è stato utilizzato per mettere in evidenza il microrganismo.

### Sicurezza in laboratorio

La coltivazione di *F. tularensis* può presentare rischi per l'operatore. *F. tularensis* ha una lunga e conosciuta storia di infezioni tra il personale di laboratorio, almeno prima dell'impiego di cappe di biosicurezza. Il batterio deve essere manipolato solo da personale esperto. Gli operatori di laboratorio debbono evitare ogni manipolazione che possa creare aerosol o dispersione di gocce e seguire tutte le procedure per la protezione personale e dell'ambiente. I campioni clinici devono essere manipolati in condizioni di contenimento almeno del 2° livello e trasferiti appena possibile in un 3° livello di contenimento se si sospetta *F. tularensis*.

### Esame batterioscopico diretto

Un esame batterioscopico diretto di campioni e colture mediante colorazione di Gram può suggerire una diagnosi presuntiva. *F. tularensis* si presenta come un piccolo coccobacillo debolmente Gram negativo di 0,2-0,5 µm x 0,7-1,0 µm, pleomorfo, capsulato, disposto singolarmente. Questo aspetto microscopico, che include l'assenza della colorazione bipolare caratteristica di *Yersinia pestis*, unitamente a sintomi clinici compatibili con la tularemia, è fortemente suggestivo per la presenza di *F. tularensis* nel campione.

### Coltivazione

*F. tularensis* cresce molto difficilmente in coltura. Soprattutto per il tipo B, la procedura più efficiente per l'isolamento è l'inoculazione dei topi. Da una revisione della letteratura il microrganismo è stato isolato solo dal 10% dei casi umani di tularemia.

*F. tularensis* richiede un supplemento di cisteina per una crescita appropriata. Benché in primo isolamento il microrganismo possa crescere anche su agar cioccolato e Thayer-Martin, il terreno migliore per la subcoltura è il CHAB (agar cioccolato cuore-cisteina contenente il 9% di sangue di montone) oppure l'agar glucosio-cisteina. Questi terreni permettono lo sviluppo di colonie dalla morfologia caratteristica, utilizzabile per la diagnosi differenziale di *F. tularensis*. La *Francisella* può crescere anche sul

**Il batterio *Francisella tularensis* è altamente virulento e deve essere manipolato solo da personale esperto**

terreno per la *Legionella* BCYE, contenente cisteina. *F. tularensis* cresce lentamente a 35-37 °C: colonie tipiche appaiono in genere dopo 48 ore di incubazione in CO<sub>2</sub>, ma è buona norma prolungare l'incubazione per 10 giorni. Il microrganismo cresce molto poco a 28 °C, criterio differenziale per distinguerlo da *Y. pestis*. *F. tularensis* non cresce bene in terreno liquido, pertanto il brodo deve essere usato solo in casi particolari. Il terreno consigliato è il brodo tioglicollato contenente cisteina, che deve essere incubato per almeno 10 giorni. La crescita si evidenzia come una banda torbida in prossimità della superficie.

La crescita su CHAB è caratteristica: le colonie misurano 2-4 mm, sono grigio-bianche, dense con consistenza burrosa e hanno una opalescenza caratteristica sulla loro superficie, se esaminate con luce indiretta. Se il tipo di crescita e la colorazione di Gram confermano il sospetto di *F. tularensis* è consigliabile non perseguire l'identificazione del batterio, ma inviare immediatamente il campione o la coltura a un laboratorio di riferimento per la conferma diagnostica.

## Diagnosi di infezioni sostenute da agenti virali di classe A: vaiolo e virus delle febbri emorragiche

Le infezioni virali “emergenti” rappresentano una nuova sfida per la medicina moderna, nella quale si compenetrano vari aspetti, da quelli di salute pubblica legati all’elevata pericolosità e diffusività di alcuni degli agenti virali coinvolti, a quelli relativi a prevenzione, diagnosi e terapia delle malattie da essi causate.

Da un punto di vista operativo, le infezioni emergenti possono essere descritte come un fenomeno a due fasi (1):

- introduzione di un agente infettante in una popolazione in cui non è presente e per il quale non vi è protezione immunitaria;
- diffusione all’interno della popolazione ospite.

Numerosi sono i fattori che possono essere responsabili dell’introduzione e/o della diffusione di nuovi patogeni nelle popolazioni (2). Essi possono essere essenzialmente divisi in due categorie:

- fattori ecologici: cambiamenti climatici, variazioni nell’ecosistema delle acque, squilibri del territorio (deforestazione, riforestazione, agricoltura), creazione di nuovi ecosistemi;
- fattori demografici: crescita della popolazione mondiale, colonizzazione di nuovi ambienti, aumento dei flussi migratori e possibilità di per-

correre lunghe distanze in breve tempo generano la possibilità di trasportare vettori o possibili serbatoi in aree non endemiche.

Inoltre, l’attuale situazione a livello internazionale vede una notevole espansione del turismo, nonché l’uso di forze militari per missioni umanitarie in aree endemiche per le cosiddette malattie tropicali, con il conseguente rischio di

infezioni che possono essere veicolate al rientro in patria. Inoltre, data la scarsa conoscenza della sintomatologia di tali malattie da parte dei clinici e la scarsità dei centri in grado di eseguire i necessari test di laboratorio, es-

se possono essere diagnosticate tardivamente, favorendo così la diffusione dell’infezione, specie se sono presenti nell’ecosistema interessato gli insetti vettori o gli animali portatori dell’infezione.

Infine, i recenti fatti di cronaca internazionale hanno rammentato al mondo la pericolosità di atten-

tati terroristici organizzati e la possibilità che alcuni agenti virali possano essere utilizzati come armi biologiche.

I principali patogeni utilizzabili a questi fini sono i virus delle febbri emorragiche, gli *Orthopoxvirus* (vaiolo, Monkeypox) e il virus dell’encefalite equina venezuelana (3).

Verranno di seguito descritte le principali caratteristiche di questi virus e le tecniche diagnostiche disponibili per l’identificazione del vaiolo e di altri Poxvirus patogeni per l’uomo, e dei principali agenti delle febbri emorragiche.

### VAIOLO

Il vaiolo è stato dichiarato eradicato nel 1980 (4), e pertanto non esiste una circolazione naturale del virus. Alcuni ceppi virali sono conservati in laboratorio negli Stati Uniti e in alcuni Paesi dell’ex Unione Sovietica, e non è noto se esistano altri depositi di virus del vaiolo, in violazione a quanto prescritto dall’Organizzazione Mondia-

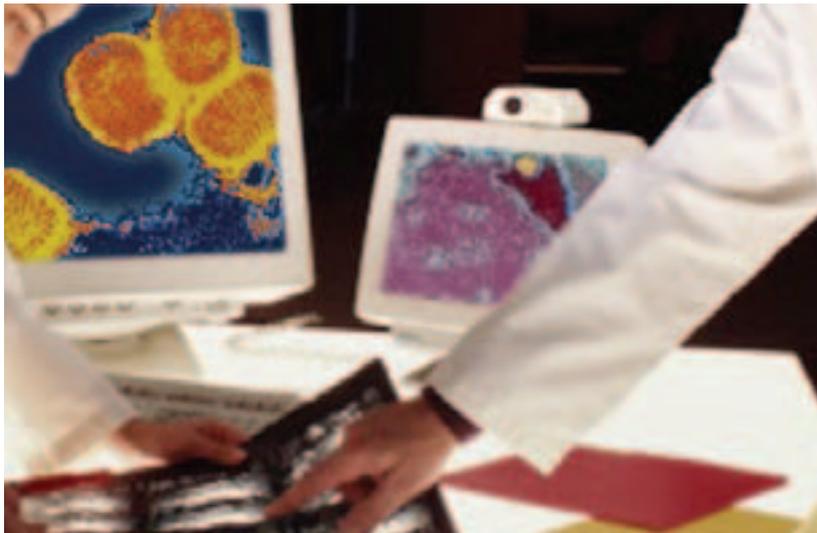
le della Sanità. Il vaiolo è causato da un virus appartenente alla famiglia Orthopoxviridae, e si può presentare in due forme: una forma relativa-

Le cosiddette infezioni virali emergenti rappresentano una sfida per la medicina odierna

Il vaiolo è una malattia eradicata da oltre vent’anni

Antonino Di Caro, Fabrizio Carletti e Maria R. Capobianchi

Laboratorio di Virologia,  
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”, Roma



mente lieve, nota come *Variola minor* e la forma più letale, *Variola major*. Altri *Orthopoxvirus* sono in grado di infettare l'uomo: il virus del vaiolo bovino (Cowpox virus), il virus del vaiolo della scimmia (Monkeypox virus) e il virus vaccinico (Vaccinia Virus).

Il virus del vaiolo è relativamente stabile a temperatura ambiente e le sue dimensioni relativamente contenute (i Poxvirus sono i virus animali di maggiore dimensione) lo rendono agilmente diffusibile tramite aerosol e quindi può considerarsi un candidato ideale per possibili scopi bioterroristici. Durante i fenomeni epidemici è possibile il contagio interumano per via respiratoria, in particolare durante la prima settimana della malattia, quando è presente una elevata carica virale nelle secrezioni nasofaringee.

Il periodo di incubazione è di circa 12 giorni e i sintomi includono febbre, affaticamento e dolori, seguiti dalla comparsa di un esantema e di lesioni cutanee. La morte, che può verificarsi anche nel 30% dei casi, può avvenire entro due settimane dal manifestarsi della malattia.

## VIRUS DELLE FEBBRI EMORRAGICHE

Per quanto riguarda le sindromi da febbre emorragica, i diversi agenti virali responsabili sono descritti nella Tabella 1.

Tutti questi virus hanno come caratteristiche comuni il genoma a RNA monocatenario e la presenza di un rivestimento di natura lipidica.

Il serbatoio naturale è costituito da piccoli animali (solitamente roditori) o artropodi.

L'uomo non è l'ospite naturale: la trasmissione all'uomo è veicolata da artropodi vettori o da contatto con escrementi dell'animale infetto.

La trasmissione interumana può verificarsi occasionalmente e in genere non ha un ruolo determinante nell'ecologia del virus.

La diffusione del virus è limitata ad aree geografiche dove è diffuso il serbatoio naturale e in queste zone i fenomeni epidemici si possono verificare sporadicamente e senza regolarità e pertanto non possono essere previsti.

Fatta eccezione per rari casi, non esiste alcun trattamento specifico.

Le infezioni sono caratterizzate da un danno vascolare e da un'alterata permeabilità vasale, mentre i sintomi più comuni comprendono febbre, mialgia, prostrazione, emorragie delle mucose e shock. La terapia è principalmente di supporto e la morbilità e la mortalità sono molto elevate.

## LA DIAGNOSI VIROLOGICA

La diagnosi di laboratorio degli agenti sopra descritti è fortemente condizionata dalla pressoché totale indisponibilità di kit diagnostici commerciali, i quali comunque consentono solamente determinazioni sierologiche e sono spesso inficiati dalla presenza di false positività e da reazioni crociate per la presenza di antigeni comuni a più virus della stessa famiglia.

Una progressa vaccinazione per la febbre gialla, ad esempio, ostacola il riconoscimento di anticorpi verso gli altri *Flavivirus*. Bisogna pertanto ricorrere ai test di sieroneutralizzazione che necessitano di

centri specializzati. La sieroneutralizzazione è inoltre l'unico metodo al momento disponibile per la valutazione della protezione immunitaria per il vaiolo della popolazione.

Bisogna comunque tener conto del fatto che la comparsa di anticorpi è comunque un fenomeno tardivo nell'evoluzione della malattia, e

Le febbri emorragiche virali vengono trasmesse all'uomo da piccoli roditori o da artropodi

Tabella 1 - Virus responsabili di febbri emorragiche

Famiglia e/o genere	Virus
Filoviridae	Ebola, Marburg
Arenaviridae	Lassa, Machupo, Junin, Guanarito, ecc.
Bunyaviridae	Hantavirus, Rift Valley, Febbre emorragica Crimea-Congo, ecc.
Flaviviridae	Febbre gialla, Dengue, <i>Flavivirus</i> trasmessi dalle zecche

**Tabella 2** - PCR e RT-PCR qualitative per la diagnosi di infezione da Poxvirus patogeni per l'uomo e per i virus delle febbri emorragiche

Virus	Metodo	Sequenze target	Dimensione amplicone	Riferimento bibliografico
Vaiolo e altri Poxvirus patogeni per l'uomo	PCR + identificazione di specie con RFLP	Gene crmB	1200-1300 bp	5
Varicella (diagnosi differenziale vaiolo)	PCR	Gene 29	272 bp	6
Vaiolo e altri Poxvirus patogeni per l'uomo	PCR + identificazione di specie con RFLP	Gene HA (emoagglutinina)	846-960 bp	7
Ebola e Marburg	RT-PCR (evidenziazione di Filovirus senza identificazione di specie)	Gene L (RNA polimerasi)	419 bp	8
Lassa	RT-PCR	Segmento S	340 bp	9
Febbre emorragica Crimea-Congo	Nested RT-PCR	Segmento S	535 bp	10

una diagnosi basata esclusivamente su questi metodi non consentirebbe di riconoscere le fasi precoci dell'infezione, che peraltro sono le più pericolose per la diffusione nella popolazione.

Non esistono kit commerciali neanche per la rilevazione degli antigeni virali, e comunque tali metodi, eseguibili solamente in laboratori altamente specializzati e spesso con un elevato livello di biocontenimento, si sono dimostrati nel passato utili nel seguire l'evoluzione della malattia, ma sono caratterizzati da livelli di sensibilità e specificità minori rispetto alle tecniche di biologia molecolare.

Va citata, inoltre, la possibilità di evidenziare i Poxvirus in microscopia elettronica direttamente da un tampone delle lesioni cutanee e di porre con tale tecnica diagnosi differenziale rispetto alla varicella.

Tale metodo, utilizzato anche dall'Istituto Spallanzani durante una simulazione con virus Vaccino, può risultare utile come test complementare, ma non è sicuramente diffusibile su scala nazionale, per la necessità di attrezzature molto complesse.

Va, inoltre, citata la possibilità di isolamento virale a fini diagnostici, ma questo approccio necessita comunque di laboratori dotati del massimo livello di biocontenimento (BSL-4) e pertanto è utilizzabile soltanto in contesti di elevatissima qualificazione specifica.

Le tecniche di biologia molecolare, al contrario, consentono di coniugare rapidità, sensibilità e specificità nella diagnosi, con la quasi totale assenza di rischio biologico per gli operatori, rendendo così i metodi eseguibili in contesti diagnostici meno sofisticati.

Sono stati pubblicati in letteratura diversi metodi e in Tabella 2 sono elencati alcuni di quelli che sono stati standardizzati mediante l'uso di acidi nucleici di controllo ottenuti da gruppi collaborativi del network internazionale BSL-4.

Mediante una modifica delle condizioni riportate in letteratura, nel Laboratorio di Virologia dello Spallanzani è stato allestito un protocollo operativo che utilizza identiche condizioni di amplificazione per il virus della varicella e gli *Orthopoxvirus* e consente di eseguire in contemporanea la ricerca dei diversi virus, per ottenere rapidamente la diagnosi differenziale. Si stanno inoltre mettendo a punto sistemi per la rilevazione quantitativa mediante tecniche di real-time PCR, e l'identificazione di specie virali tramite sequenziamento diretto del genoma virale.

*thopoxvirus* e consente di eseguire in contemporanea la ricerca dei diversi virus, per ottenere rapidamente la diagnosi differenziale. Si stanno inoltre mettendo a punto sistemi per la rilevazione quantitativa mediante tecniche di real-time PCR, e l'identificazione di specie virali tramite sequenziamento diretto del menoma virale.

#### Riferimenti bibliografici

1. Morse SS. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 7-16.
2. Kortepeter MG, Parker GW. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 523-7.
3. Kortepeter M, Cristhopher G, Cieslak T, et al. editors. *Medical management of biological casualties handbook*. 4th ed. Fort Detrick (MD): Army Medical Research Institute of Infectious Diseases; 2001.
4. Breman JG, Arita I. *N Engl J Med* 1980; 303: 1263-73.
5. Loparev VL, Massung RF, Esposito JJ, et al. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 94-100.
6. Mitchell SM, Fox JD, Tedler RS, et al. *J Med Virol* 1994; 43: 336-40.
7. Ropp SL, Jin Q, Knight JC, et al. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2069-76.
8. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. *J Infect Dis* 1999; 179(Suppl 1): s164-s9.
9. Demby AH, Chamberlain G, Brown DWG, et al. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2898-903.
10. Schawarz TF, Nsanze H, Longson M, et al. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 190-6.

**I Poxvirus possono essere evidenziati attraverso l'esame al microscopio elettronico del materiale patologico**



## Studi dal territorio

NUOVI ANTINFIAMMATORI  
IN MEDICINA GENERALE

Giuseppe Traversa<sup>1</sup>, Clara Bianchi<sup>1</sup>,  
Francesca Pisetzky<sup>1</sup>  
e Mariangela Rossi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Epidemiologia  
e Biostatistica, ISS

<sup>2</sup>Assessorato alla Sanità,  
Regione Umbria

Nell'estate del 2000 sono stati introdotti in commercio in Italia i nuovi farmaci antinfiammatori, celecoxib e rofecoxib (di seguito COXIB), che agiscono tramite un'inibizione selettiva della ciclo-ossigenasi-2. Come gli altri farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), i COXIB sono prescrivibili dal Servizio Sanitario Nazionale (SSN), ma il costo medio per giornata di terapia a essi associato è quasi doppio rispetto a quello dei vecchi antinfiammatori (1,4 vs 0,8 Euro).

Nelle sperimentazioni cliniche questi farmaci hanno mostrato una minore gastrolesività rispetto ai FANS tradizionali (1, 2). In particolare, i vantaggi attesi dall'uso dei COXIB riguardano i pazienti che necessitano di una terapia a dosaggi elevati, e per periodi prolungati, di FANS tradizionali (la durata mediana di terapia nei due studi citati è stata di 6-9 mesi). È stata inoltre prefigurata, come conseguenza della minore gastrolesività, una diminuzione del livello di co-prescrizione di farmaci gastroprotettivi, in particolare tra gli utilizzatori cronici.

L'obiettivo del presente studio è la descrizione delle caratteristiche d'uso dei COXIB in Umbria nei primi 12 mesi di commercializzazione. Nello specifico, l'analisi è focalizzata sugli utilizzatori incidenti di COXIB e di FANS tradizionali, con l'obiettivo di confrontare, tra i due

gruppi, l'uso concomitante di gastroprotettivi, la durata d'uso e l'eventuale spostamento da una categoria di FANS all'altra per i soggetti in terapia continuativa.

Dal sistema di monitoraggio regionale dell'Umbria (circa 835 000 assistibili) sono state selezionate le prescrizioni di FANS e di gastroprotettivi erogate tra gennaio 2000 e giugno 2001, e sono stati caratterizzati gli utilizzatori. Gli "utilizzatori incidenti" sono i soggetti con prima prescrizione di FANS (tradizionali o COXIB) successiva a luglio 2000 (e quindi con almeno 6 mesi senza prescrizione di antinfiammatori). Ogni individuo è entrato nello studio come utilizzatore di FANS tradizionale o COXIB in base alla prima prescrizione ricevuta nei 12 mesi.

La prescrizione di gastroprotettivi è stata definita "concomitante" quando FANS e gastroprotettivo sono stati ritirati nella stessa giornata.

Per l'analisi delle prescrizioni successive a quella incidente è stato utilizzato come riferimento un "periodo d'uso corrente", stimato come somma delle DDD (dose definita *die*, cioè la dose necessaria a coprire una giornata di terapia nell'adulto per ciascuna sostanza) associata a ciascuna confezione, al quale si somma un periodo standard di 14 giorni. Affinché fosse

disponibile per tutti gli utilizzatori incidenti un periodo di osservazione di almeno 1 mese di follow up, in questa fase dell'analisi sono stati inclusi solo gli utilizzatori con prescrizione incidente nel periodo luglio 2000-maggio 2001.

Età, sesso e storia prescrittiva precedente di gastroprotettivi (usata come tracciante di un profilo di maggiore rischio di lesioni gastro-duodenali) sono stati considerati come potenziali confondenti.

In Italia, sul complesso degli antinfiammatori, i COXIB rappresentano il 26% delle dosi e poco meno del 40% della spesa (Tabella 1). Una stima della prevalenza può essere fornita identificando gli utilizzatori in una popolazione generale di una regione. In Umbria, su 835 000 abitanti, oltre 200 000 hanno ricevuto una o più prescrizioni di antinfiammatori in un anno (41 833 di COXIB e 187 377 di FANS tradizionali). Gli utilizzatori incidenti (127 217) rappresentano il 15,3% della popolazione (2,7% per COXIB e 12,6% per gli altri FANS). Gli utilizzatori incidenti di COXIB risultano più anziani rispetto a quelli di FANS; tra di essi, inoltre, si nota una maggior prevalenza di donne e di soggetti con uso pregresso di gastroprotettivi (nei 6 mesi precedenti) (Tabella 2).

Tabella 1 - Caratteristiche degli utilizzatori di FANS tradizionali e COXIB

	COXIB	FANS tradizionali
Prescrizioni in Italia tra luglio 2000 e giugno 2001 (SSN)		
DDD <sup>a</sup> /1 000 abitanti <i>die</i>	8,6 (26,1) <sup>b</sup>	24,5 (73,9) <sup>b</sup>
Spesa (milioni di Euro)	3,8 (39,4) <sup>c</sup>	5,9 (60,6) <sup>c</sup>
Prescrizioni in Umbria tra luglio 2000 e giugno 2001 (SSN)		
DDD <sup>a</sup> /1 000 abitanti <i>die</i>	6,7	19,1
Utilizzatori	41 833	187 377

(a) DDD: dose definita *die*

(b) Percentuale sul totale delle prescrizioni

(c) Percentuale sul totale della spesa

**Tabella 2** - Caratteristiche degli utilizzatori incidenti per tipo di FANS prescritto (Servizio Sanitario Nazionale, Umbria)

	COXIB	FANS tradizionali
Utilizzatori incidenti	22 348	104 869
Utilizzatori incidenti/100 abitanti	2,7	12,6
Età mediana	68	64
Rapporto uomini/donne	0,5	0,7
Utilizzatori incidenti con prescrizioni di GP <sup>a</sup> nei 6 mesi precedenti (%)	19,8	15,3
Utilizzatori incidenti con prescrizioni concomitanti di GP <sup>a</sup> (%)	5,0	5,8
Odds Ratio <sup>b</sup> (IC 95%) di prescrizione concomitante di GP <sup>a</sup>	0,75 (0,7-0,8)	1
Nuova prescrizione di FANS nel periodo corrente (%)	9,2	10,9
Conferma della stessa categoria di FANS (%)	50,2	90,2

(a) Farmaci gastroprotettivi

(b) Aggiustato per età, sesso e uso precedente di gastroprotettivi

La quota di prescrizioni concomitanti di gastroprotettivi è pari al 5,0% per i COXIB e al 5,8% per i FANS tradizionali. Dopo aggiustamento per i fattori confondenti, gli utilizzatori incidenti di COXIB mostrano una probabilità di ricevere una prescrizione concomitante di gastroprotettivi inferiore, del 25% rispetto a quella associata all'uso di altri FANS (OR 0,75; IC95% 0,7-0,8). Tuttavia, limitandosi a considerare solo i gastroprotettivi con dimostrata efficacia contro il danno da FANS (inibitori della pompa acida, prostaglandine e anti-H<sub>2</sub>), la differenza nella probabilità di coprescrizione con COXIB e con FANS tradizionali (2,9% vs 2,5%) si annulla (sempre tenendo conto dei fattori di confondimento).

Solo il 10% circa degli utilizzatori incidenti riceve una nuova prescrizione di FANS durante il periodo corrente (10,9% per FANS tradizionali e 9,2% per COXIB). Tra gli utilizzatori di FANS tradizionali che continuano la terapia, il 90,2% conferma lo stesso tipo di farmaco, mentre la scelta viene confermata solo nel 50% degli utilizzatori di COXIB.

L'introduzione dei COXIB ha comportato un notevole aumento della spesa per il SSN, e nel primo anno di prescrivibilità i COXIB hanno rappresentato il 39% della spesa totale per FANS. In Umbria, dove il livello d'uso di antinfiammatori non si discosta molto da quello medio nazionale, si osserva che il profilo d'uso non risulta sostanzialmente diverso per FANS tradizionali e COXIB. In entrambi i casi l'uso è prevalentemente acuto e si nota solo una lieve

differenza nella quota d'uso concomitante del complesso dei gastroprotettivi. L'evidenza di una scarsa propensione alla conferma del farmaco per gli utilizzatori di COXIB con terapia continuativa (50% vs 90% per i FANS tradizionali) può rappresentare un indizio, da approfondire in indagini *ad hoc*, di una minore efficacia di queste sostanze quando utilizzate nella pratica corrente di medicina generale.

Se il maggiore costo per giornata di terapia dei COXIB è stato giustificato da una maggiore sicurezza fra gli utilizzatori cronici e da un potenziale risparmio nell'uso concomitante di gastroprotettivi, le modalità di utilizzo osservate in Italia non giustificano una differenza di prezzo fra COXIB e FANS tradizionali.

#### **Il commento Nicola Magrini**

*CeVEAS, Centro per la Valutazione della Efficacia della Assistenza Sanitaria, Modena*

*Il lavoro di Traversa rappresenta un raffinato esempio di studio che valuta le modalità e l'appropriatezza d'uso dei nuovi antinfiammatori non steroidei inibitori selettivi delle cicloossigenasi-2 (COXIB) e sviluppa una interessante ipotesi di ricerca sulla loro reale efficacia clinica.*

*I risultati dello studio sono molto interessanti e in qualche modo inattesi, anche se sono stati confermati utilizzando il database delle prescrizioni della provincia di Modena. La prescrizione di gastroprotettori è risultata analoga tra FANS tradizionali e COXIB, nonostante tale utilizzo non rientri tra le indi-*

*cazioni approvate dei COXIB e sia in contraddizione con l'ipotesi fatta per la definizione del prezzo di questi farmaci, calcolata sulla base del potenziale risparmio derivante dal minore utilizzo di farmaci gastroprotettori rispetto ai FANS tradizionali. Un aspetto che richiederebbe ulteriori analisi è se i pazienti trattati con COXIB siano individui a maggior rischio di patologia gastrica e pertanto non candidabili alla terapia con FANS tradizionale, gastroprotetti in via prudenziale. Questa ulteriore analisi dovrebbe valutare se i pazienti cui è stato prescritto un COXIB hanno una maggiore prevalenza di patologia gastrica o di prescrizione di farmaci antiulcera negli anni precedenti (dato che lo studio controlla solo per gli ultimi 6 mesi per l'uso di farmaci gastroprotettori) rispetto agli utilizzatori di FANS.*

*Un dato ulteriore che emerge dallo studio è l'uso prevalentemente in acuto dei FANS e dei COXIB in Italia rispetto agli Stati Uniti (dove l'uso è prevalentemente cronico). Lo studio di Traversa mostra come il 90% dei soggetti che ha ricevuto un FANS conferma in una seconda prescrizione il FANS, mentre solo nel 50% dei casi di prescrizione di COXIB se ne ha una conferma. Questa maggiore tendenza a cambiare analgesico (il dolore rappresenta la principale indicazione d'uso) potrebbe essere una non ottimale risposta dei COXIB rispetto ai FANS tradizionali: questa ipotesi potrebbe essere verificata in un formale studio randomizzato effettuato nel setting della medicina generale.*

Si consiglia infine la lettura dell'analisi completa (come da protocollo) degli studi VIGOR (3) e CLASS (4) recentemente effettuata dalla Food and Drug Administration (FDA) che ha evidenziato una minore differenza tra FANS e COXIB come gastrolesività nello studio CLASS (dopo 13 mesi di trattamento rispetto ai 6 dello studio pubblicato) e una maggiore incidenza di infarti nello studio VIGOR nei pazienti trattati con rofecoxib. Può infine essere interessante la lettura dei "warning" molto severi sull'informazione o pubblicità fuorviante delle ditte produttrici su questi farmaci (5, 6), anche come stimolo per le autorità sanitarie del nostro Paese.

#### Riferimenti bibliografici

1. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520-8.
2. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al. *JAMA* 2000; 284:1247-55.
3. FDA. Vioxx (rofecoxib): [www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b2\\_03\\_med.doc](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b2_03_med.doc)
4. FDA. Celebrex (celecoxib): [www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b1.htm](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b1.htm)
5. Warning Rofecoxib: [www.fda.gov/foi/warning\\_letters/g1751d.pdf](http://www.fda.gov/foi/warning_letters/g1751d.pdf)
6. Warning Celecoxib: [www.fda.gov/foi/warning\\_letters/m5097n.pdf](http://www.fda.gov/foi/warning_letters/m5097n.pdf)

### PREVALENZA DI CESAREI E TIPO DI STRUTTURA DI PARTO IN CAMPANIA

**Roberta Arsieri<sup>1</sup>,  
Vincenzo Formisano<sup>1</sup>,  
Aniello Pugliese<sup>2</sup>,  
Maurizio Saporito<sup>2</sup> e Maria Triassi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Preventive, Sezione di Igiene e Medicina Preventiva,

Università degli Studi Federico II, Napoli  
<sup>2</sup>Azienda Ospedaliera "A. Cardarelli",  
Napoli

Negli ultimi dieci anni la frequenza del parto cesareo (TC) è cresciuta costantemente in Italia. L'incremento è stato particolarmente rilevante nella Campania, che dal 1996 è al primo posto tra le regioni italiane per frequenza del TC, ed è passata da una percentuale del 36,3% nel 1996 al 51,4% del 2000

(1). Nel periodo 1996-99 l'incremento è stato costante sia nelle strutture pubbliche che in quelle private convenzionate, con una frequenza di cesarei 1,3 volte maggiore nelle seconde (2). Nello stesso periodo le caratteristiche della popolazione neonatale e materna e gli esiti perinatali non mostrano variazioni altrettanto ampie.

Il presente contributo si propone di valutare se ci sono differenze nella frequenza del TC tra strutture perinatali di livello diverso e se l'eventuale variabilità è riferibile a differenti caratteristiche della popolazione assistita.

Questo studio è stato effettuato nell'ambito dell'attività di sorveglianza sulla natalità nella Campania, mediante i Certificati di Assistenza al Parto (CedAP). Sono stati elaborati i dati relativi ai 27 punti nascita che hanno trasmesso almeno il 65% delle schede dei nati nel 2000. Queste strutture hanno trasmesso i dati relativi a 17 799 nati, mentre non sono pervenuti i CedAP di 7 236 nati, pari al 29% del totale dei nati nel 2000. Il confronto dei dati del campione considerato con gli ultimi dati ISTAT (3) disponibili per la Campania (1997) non ha mostrato significative differenze relativamente al rapporto maschi/femmine, alla vitalità, al peso, all'età gestazionale e alla parità, per cui la distribuzione delle schede mancanti può essere ritenuta casuale.

Le strutture sono state suddivise in due gruppi in base alla disponibilità o meno di posti letto per le cure intensive neonatali. Questo dato, in assenza di criteri di accreditamento stabiliti dall'Assessorato Regionale alla Sanità, ha permesso di distinguere le strutture di 3° livello da quelle di 1° e 2° livello.

Nei due gruppi di strutture sono state calcolate le variazioni della frequenza del TC in relazione ad alcune caratteristiche neonatali e materne con i relativi intervalli di confidenza (IC) al 95%.

Nella Tabella sono elencati i dati relativi a 4 punti nascita di 3° livello e 23 punti nascita di 1° e 2° livello, che includono 15 ospedali (6 con oltre 1 000 nati/anno, 6 con un numero di nati tra 500 e 999, 3 con meno di 500 nati/anno) e 12

case di cura convenzionate (2 con oltre 1 000 nati per anno, 8 con un numero di nati tra 500 e 999, 2 con meno di 500 nati). Le strutture di 3° livello comprendono 1 casa di cura convenzionata e 3 ospedali e ciascuna struttura assiste oltre 1 000 nati/anno.

Il TC è utilizzato per il 50% dei nati, con prevalenza maggiore tra le strutture di 1° e 2° livello (52,3%) rispetto a quelle di 3° livello (41,3%). I nati pretermine, di basso peso e i gemelli si concentrano, come d'altronde è atteso, nelle strutture di 3° livello e solo i nati con presentazione anomala sono assistiti in percentuale maggiore dalle strutture di 1° e 2° livello. La frequenza del TC per ciascuna di queste categorie di neonati è maggiore nelle strutture di 1° e 2° livello, salvo che per i pretermine, ma la differenza è significativa per i soli nati con presentazione anomala.

Nelle strutture di 3° livello si rileva anche una percentuale maggiore di madri di età superiore a 34 anni, mentre le nullipare si distribuiscono in eguale misura nei due tipi di struttura. In queste categorie di pazienti la scelta del cesareo è più frequente nelle strutture di 1° e 2° livello rispetto a quelle di 3° livello e la differenza è significativa.

In conclusione, la frequenza del TC tra strutture di livello diverso evidenzia una variabilità contraria a quella attesa, in base alla distribuzione delle caratteristiche neonatali e materne prese in esame. Poiché i primogeniti sono ugualmente distribuiti tra strutture di livello diverso, le differenze nella frequenza del TC non possono essere riferite a una maggiore incidenza di cesarei iterattivi. Inoltre, la maggiore concentrazione di nati con presentazione anomala nei centri di 1° e 2° livello spiega solo in minima parte l'eccesso di cesarei, per la ridotta frequenza di questa condizione fetale. Il TC è utilizzato meno frequentemente nelle strutture di 1° e 2° livello che nelle strutture di 3° livello per i neonati pretermine, per i quali sarebbe logico attendersi un uso più ampio del cesareo per la frequenza di patologie legate alla prematurità. La frequenza del TC è, invece, maggiore per le madri di età

**Tabella** - Tassi di parti cesarei per caratteristiche neonatali e materne e per livello della struttura di nascita (Campania 2000)

	Strutture di 3° livello				Strutture di 1°- 2° livello			
	Nati		Cesarei		Nati		Cesarei	
	n.	(%)	(%)	IC 95%	n.	(%)	(%)	IC 95%
Totale nati	3 742	(100)	41,3	39,6-42,8	14 057	(100)	52,3	51,5-53,2
Caratteristiche neonatali								
Età gestazionale < 37	434	(11,6)	65,7	(61,3-70,3)	673	(4,8)	61,7	(58,1-65,4)
Peso < 2500 g	449	(12)	69,0	(64,9-73,4)	709	(5)	70,2	(66,9-73,7)
Gemelli	96	(2,6)	80,2	(70,2-88,2)	229	(1,6)	81,2	(76,4-86,5)
Presentazione diversa dal vertice	123	(3,3)	79,7	(70,7-86,7)	659	(4,7)	92,6	(90,6-94,6)
Caratteristiche materne								
Età > 34 anni	722	(19,3)	49,7	(46,1-53,4)	2 262	(16,1)	60,4	(58,4-62,4)
Primogenito	1 504	(40,2)	40,2	(37,8-42,7)	5 666	(40,3)	53,5	(52,2-54,8)

superiore a 34 anni e per le primipare e la differenza ha in questo caso significatività statistica. La scelta del cesareo, tranne le emergenze, è stata attribuita anche ad altri fattori, quali la scelta della madre o le preferenze e le opinioni dei medici. Tra queste ultime la possibilità di programmare il TC rappresenta un indiscutibile vantaggio per il medico; ciò è confermato dalla distribuzione temporale dei cesarei, che si concentrano nelle mattine dei giorni feriali (1).

Al di fuori delle indicazioni di emergenza è dimostrato che il cesareo comporta un maggior rischio di morbilità e mortalità materna rispetto al parto vaginale (4). Lo studio evidenzia la necessità di indagare ulteriormente sui motivi non medici che contribuiscono a elevare la frequenza di cesarei nelle strutture che assistono una popolazione di gravide a minor rischio ostetrico e neonatale.

#### **Il commento** **Gianfranco Gori**

Unità Operativa Ostetricia Ginecologia, Azienda USL, Forlì

Fino alla fine degli anni '60 il tasso di cesarei in Italia era attestato intorno al 5%; dal 1970 è rapidamente aumentato, triplicandosi alla fine degli anni '70 e quintuplicandosi alla fine degli anni '80, con un costo umano ed economico non trascurabile. Il rischio di morte materna è infatti di 4-8 volte superiore rispetto al parto vaginale e la morbilità puerperale è 10-15 volte superiore. I maggiori rischi materni non sono però bilanciati da un miglioramento degli esiti perinatali.

I dati presentati da Arsieri ag-

giungono un elemento importante nell'analisi di questa preoccupante tendenza: un'inversione dei tassi rispetto all'atteso. Infatti, le strutture che dovrebbero prestare assistenza a gravidanze a basso rischio hanno tassi di cesarizzazione superiori a quelle che dovrebbero accogliere i casi più complessi. Pur con le cautele dovute alla scarsa completezza dei dati ricavati dai Certificati di Assistenza al Parto (CedAP), i risultati pongono importanti interrogativi sull'analisi di tale fenomeno.

Rispetto ai fattori "clinico/organizzativi" è possibile che il fenomeno derivi da una progressiva perdita di competenza clinica per i deficit nella preparazione degli specialisti, da una scarsa conoscenza dei processi fisiologici della gravidanza e del parto, dalla parcellizzazione dell'assistenza alla nascita in punti nascita che erogano poche centinaia di prestazioni/anno. Il basso numero di parti crea le condizioni per cesarei "preventivi" per non doversi trovare in condizioni di "vera emergenza ostetrica" a cui non sarebbe possibile rispondere o per mancanza di personale o di competenza clinica.

Una soluzione che potrebbe risolvere alcuni di questi problemi clinico/organizzativi potrebbe essere l'implementazione/creazione di network in cui i punti nascita lavorino in rete secondo un modello hub and spoke (centro e periferia), in cui esistano criteri espliciti di selezione delle pazienti per indirizzarle verso il punto nascita più appropriato per complessità di cure erogate e in cui esista un vincolo, per il centro, di diffusione delle competenze cliniche

verso i centri più periferici.

Un fattore "non clinico/organizzativo" che contribuisce al tasso elevato è che il cesareo viene considerato sempre più dalle partorienti e dai medici solo una modalità di nascita come un'altra e che quindi le pazienti e i medici sono inevitabilmente condizionati nella richiesta e nel suo ricorso dai giudizi, pregiudizi e valori connessi con il tema della riproduzione (5). Per contrastare questa situazione, le esperienze riportate in letteratura (6, 7) suggeriscono che tassi superiori di parti fisiologici sono associati a processi di implementazione di procedure fondate su prove di efficacia e al lavoro di gruppo, oltre che alle convinzioni intorno alla nascita (7).

#### **Riferimenti bibliografici**

1. Arsieri R, Pugliese A, Saporito M, et al. Rapporto sulla natalità in Campania - 2000. Napoli. 2001.
2. Pizzuti R, de Campora E, Lodato S. Not Ist Super Sanità 2001; 14(5) - Insetto BEN: i-iii.
3. ISTAT. Sistema sanitario e salute della popolazione indicatori regionali (Informazioni n. 16). 2000.
4. Hall MH, Bewley S. Lancet 1999; 354: 776.
5. [www.saperidoc.it/ques\\_240.html](http://www.saperidoc.it/ques_240.html)
6. Basevi V, Cerrone L, Gori G. Epid Prev 1994; 18: 194-9.
7. Johanson R, Newburn M. BMJ 2002; 324: 892-5.

**Donato Greco,**  
**Nancy Binkin, Paolo D'Argenio,**  
**Paola De Castro, Carla Faralli**

Comitato editoriale BEN

Full English version is available at:  
[www.ben.iss.it](http://www.ben.iss.it)  
e-Mail: [ben@iss.it](mailto:ben@iss.it)

## Febbri emorragiche causate da *Arenavirus*

**G**li *Arenavirus* causano infezioni croniche di roditori indigeni dell'Europa, dell'Africa e dell'America e sono forse presenti anche negli altri continenti. Ogni *Arenavirus* è associato con un ospite roditore specifico nel quale il virus causa un'infezione cronica asintomatica che assicura la persistenza del virus in natura. L'uomo è un ospite accidentale e si infetta solo quando viene in contatto con i secreti o le deiezioni dei roditori infetti. La via di trasmissione di questi virus è l'aerosol. La diffusione del virus e le circostanze dell'esposizione umana sono determinate dall'ospite serbatoio. Le infezioni umane da *Arenavirus* sono frequenti e in alcuni casi molto gravi.

Gli *Arenavirus* sono virus a RNA a singolo filamento, costituito da due segmenti, L e S, ambedue con polarità ambisenso. Le proteine strutturali sono due glicoproteine, GP1 e GP2, derivanti dal clivaggio di un'unica macromolecola, GPC, e la nucleoproteina N.

Alla famiglia *Arenavirus* appartengono almeno sei diversi virus patogeni per l'uomo (Tabella). Gli *Arenavirus* sono separati in due gruppi, gli *Arenavirus* del Vecchio Mondo (Lassa, linfocorionemeningite - LCM) e virus del Nuovo Mondo (Junin, Machupo, Guanarito, Sabià). Il virus della LCM è stato il primo virus di questa famiglia a essere isolato, nel 1933. Nell'uomo causa una meningite associata con pleiocitosi linfocitaria del liquor ed è causa di infezioni persistenti in colonie di roditori; la sua diffusione è a livello mondiale.

### FEBBRE DI LASSA

Nel 1969 un *Arenavirus* patogeno per l'uomo, il Lassa, fu isolato in Africa. Il virus Lassa, che provoca una malattia letale, altamente trasmissibile da uomo a uomo, è molto diffuso in Africa orientale ed è associato a roditori del genere *Mastomys* che vivono in stretta associazione con le residenze umane. La diffusione da uomo a uomo ha provocato alcuni episodi di infezione nosocomiale. Le manifestazioni cliniche precoci sono aspecifiche e includono febbre, malessere, mal di gola, mal di testa, e dolori alla schiena e all'addome. Le manifestazioni più tardive includono arrossamento congiuntivale, edema della faccia e del collo, esantema maculopapulare (evidente in particolare nei pazienti di razza bianca), sintomi respiratori e gastrointestinali, manifestazioni neurologiche, effusione pleurica e pericardica, sanguinamento delle mucose e shock. La sordità è una complicazione importante.

Il tasso di mortalità dei pazienti ospedalizzati e non trattati è di circa il 15%. Il trattamento per via endovenosa con la ribavirina è efficace, ma deve essere iniziato precocemente.

### FEBBRI EMORRAGICHE SUDAMERICANE

Nel 1950 in Argentina, nella ricca zona agricola delle pampas umide, comparve una malattia ap-

parentemente nuova, la febbre emorragica argentina, il cui agente eziologico è il virus Junin, un virus fino ad allora sconosciuto e che mostrava correlazioni solo con un virus assolutamente innocuo per l'uomo, il virus Tacaribe, isolato da pipistrelli a Trinidad. La malattia fu rapidamente associata a un roditore con funzione di ospite serbatoio. La sua diffusione è andata rapidamente crescendo e costituisce un problema sanitario emergente delle principali aree agricole dell'Argentina. È stato allestito un vaccino sperimentale, ma non è ancora utilizzato su larga scala.

Alcuni anni dopo l'isolamento del virus Junin, un'altra malattia divenne epidemica in alcune remote aree della Bolivia, dove era chiamata "tifo ne-

ro". La descrizione clinica di questa malattia mostra notevoli somiglianze con la febbre emorragica argentina. Il virus Machupo, correlato al virus Junin, fu isolato e associato a un roditore. La diffusione della febbre emorragica boliviana è decisamente inferiore a quella della febbre emorragica argentina; infatti ne sono segnalati solo casi sporadici.

Numerosi altri *Arenavirus* sono stati isolati nel Nuovo Mondo a seguito delle indagini eseguite per lo studio dei virus Junin e Machupo, ma per la maggior parte non sono patogeni per l'uomo. Solo recentemente due virus, Guanarito (isola-

Le infezioni umane da *Arenavirus* sono frequenti e talvolta molto gravi

Loredana Nicoletti, Maria Grazia Ciufolini e Paola Verani

Laboratorio di Virologia, ISS

Tabella - *Arenavirus* associati a malattia nell'uomo

Malattia	Virus	Origine	Anno del 1° isolamento	Distribuzione
Coriomeningite linfocitaria	LCM		1933	Mondiale
Febbre di Lassa	Lassa	Nigeria	1969	Africa Ovest
Febbre emorragica argentina	Junin	Argentina	1957	Sud America
Febbre emorragica boliviana	Machupo	Bolivia	1962	Sud America
Febbre emorragica venezuelana	Guanarito	Venezuela	1989	Sud America
Non ancora nominata	Sabià	Brasile	1990	Sud America

to durante un'epidemia in Venezuela) e Sabià (isolato da un caso singolo in Brasile), sono stati associati a una malattia che, clinicamente, assomiglia alla febbre emorragica argentina e boliviana.

Il quadro clinico meglio descritto è quello della febbre emorragica argentina che include un periodo di incubazione di 1-2 settimane, seguito da febbre, malessere, mialgia, vertigini, mal di testa, manifestazioni gastrointestinali, sudorazione del volto e del tronco, ed effusione congiuntivale. Sono comuni sintomi neurologici che includono tremori, disorientamento, atassia e iporeflessia. Trombocitopenia, leucopenia e proteinuria sono presenti nella malattia conclamata. Le manifestazioni emorragiche includono petecchie, sanguinamento delle gengive ed emorragia mucosale. Ipotensione e shock sono presenti nei casi più gravi. Sono stati utilizzati con successo trattamenti con plasma immune e con ribavirina per via endovenosa.

### SAGGI DIAGNOSTICI

Al momento del ricovero in ospedale i pazienti contagiati dal virus Lassa sono normalmente viremici, ma possono non avere ancora

livelli rilevabili di anticorpi anti Lassa. La diagnosi precoce deve quindi essere effettuata o con il rilevamento del virus mediante coltura o con l'identificazione dell'antigene o con RT-PCR. Il virus può essere facilmente isolato dal sangue o dal siero

in colture cellulari, ma il saggio richiede alcuni giorni e deve essere effettuato in livelli di contenimento di tipo BSL-4. Buoni risultati in tempi rapidi sono ottenuti mediante RT-PCR sul sangue, siero o plasma. Virtualmente tutti i pazienti hanno RNA rilevabile nel sangue al terzo giorno dal ricovero. L'esame colturale dovrebbe essere sempre eseguito, quando possibile, soprattutto per quei casi che occorrono al di fuori delle aree endemiche. I saggi per il rilevamento dell'antigene sono meno sensibili di quelli di RT-PCR.

La determinazione degli anticorpi anti Lassa è importante ma non può essere eseguita nei primi giorni di malattia. Sono stati utilizzati saggi di immunofluorescenza e saggi enzimatici per IgG e IgM. Anticorpi di classe IgM specifici sono rilevabili nella seconda settimana di malattia.

I principi di diagnosi delle febbri emorragiche sudamericane sono in massima parte simili a quelli del Las-

sa, anche se la viremia è di grado meno elevato. La coltivazione dei leucociti può aumentare la sensibilità rispetto alla coltura del sangue intero.

### CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE RT-PCR/RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

I saggi diagnostici che comportano l'isolamento virale o la manipolazione di virus vivo (ad esempio, la neutralizzazione) devono essere effettuati in laboratori con un livello di sicurezza BSL-4. È tuttavia possibile effettuare una diagnosi anche in assenza di tali strutture, utilizzando dei saggi di RT-PCR, con i quali è possibile individuare l'acido nucleico virale. Infatti, tutti i membri del genere *Arenavirus* hanno una sequenza conservata all'estremità 3' del segmento S e altre sequenze conservate distribuite lungo il segmento S. È possibile quindi costruire dei *primer* generici che siano in grado di amplificare l'RNA di tutti gli *Arenavirus* finora noti; in alcuni casi, utilizzando questi *primer* è stato anche possibile identificare degli *Arenavirus* che sono risultati essere completamente nuovi. La caratterizzazione dell'RNA amplificato avviene mediante l'uso di enzimi di restrizione che generano pattern specifici per ogni virus. È così possibile limitare la manipolazione del materiale potenzialmente infetto alla sola estrazione dell'RNA ed effettuare il saggio utilizzando come controllo l'RNA di virus meno pericolosi per l'uomo (Tacaribe, LCM).

Il Laboratorio di Virologia dell'Istituto Superiore di Sanità ha messo a punto un protocollo diagnostico sulla base di un lavoro del 1997 (1), attraverso il quale è possibile diagnosticare la presenza di *Arenavirus* mediante una reazione di RT-PCR sull'RNA totale di cellule infette con i virus Tacaribe e LCM (ceppo Armstrong).

### Riferimenti bibliografici

- 1 Lozano ME, Posik DM, Abbarino CG. *Virus Res* 1997; 49(1): 79-89.

**Il primo *Arenavirus* patogeno per l'uomo è stato isolato nel 1933**

## Uso bellico e terroristico della tossina botulinica

In questi ultimi anni i media hanno riportato con allarmata preoccupazione il fatto che i contendenti di avvenimenti bellici in corso o gruppi terroristici operativi in alcuni Paesi potessero disporre e utilizzare armi biologiche. Lo sviluppo e l'uso di armi biologiche non è cosa degli ultimi decenni; la ricerca di mezzi per danneggiare e/o terrorizzare gli avversari è stata oggetto di interesse anche nei secoli passati.

Vari agenti sono stati presi in esame per un possibile uso come armi biologiche man mano che le conoscenze scientifiche lo lasciavano intravedere; tra questi grande interesse ha suscitato la tossina botulinica per vari motivi:

- è facile da produrre;
- è di elevata letalità (1 g di tossina cristallizzata è in grado di uccidere 1 milione di persone) o, comunque, è capace di provocare una malattia tanto grave da richiedere cure prolungate.

La produzione e l'uso della tossina botulinica come mezzo bellico risalgono a circa 60 anni fa, quando il Giappone prima e gli USA e la Germania poi svilupparono specifici programmi *ad hoc*. In tempi più recenti, anche l'Iraq e l'ex Unione Sovietica hanno avviato analoghi programmi.

A tutt'oggi però non si ha notizia di casi di intossicazioni conseguenti a un rilascio deliberato della tossina botulinica. Tuttavia, a cavallo tra il 1990 e il 1995, terroristi giapponesi legati al culto di Aum Shinrikj hanno tentato di disperdere la tossina botulinica sotto forma di aerosol in alcune zone di Tokyo e in alcune installazioni militari americane presenti in Giappone.

Nello stesso periodo, l'Iraq ha ammesso, con gli ispettori delle Nazioni Unite recatisi nel Paese dopo la guerra del Golfo, di aver prodotto tossina botulinica concentrata e di averne utilizzata 10 000 l per la produzione di armi.

La tossina botulinica è prodotta da un microorganismo sporigeno anaerobio, il *Clostridium botulinum*; si tratta di una proteina tossica in grado di causare dopo 2 ore-8 giorni dall'ingestione una grave paralisi flaccida simmetrica discendente afebrile (il botulismo) nell'uomo e negli animali. La malattia si presenta sotto varie forme a seconda delle modalità con cui la tossina viene assunta (ingestione di tossina preformata con gli alimenti - alimentare - o inalazione della tossina mediante aerosol - inalazione; assorbimento intestinale o a livello di un tessuto traumatizzato infetto a seguito della germinazione di spore e produzione *in vivo* della tossina: botulismo infantile, botulismo tipo infantile dell'adulto o botulismo da ferita).

È noto che diversi ceppi di *C. botulinum* producono tossine botuliniche, che pur agendo in maniera simile, non sono affatto identiche fra loro. Attualmente, sono state identificate 7 diverse varianti antigeniche delle neurotossine botuliniche, denominate con lettere maiuscole dalla A alla G. Le tossine

A, B, E e più raramente F provocano il botulismo nell'uomo.

La denominazione di *C. botulinum* viene utilizzata per indicare non un unico organismo capace di produrre tossine diverse ma specie con differenti caratteristiche meta-

boliche e fisiologiche. Di recente sono stati trovati clostridi capaci di elaborare neuro-

tossine botuliniche (*C. butyricum* tipo E e *C. barati* tipo F), i quali, tuttavia, in base alle caratteristiche biochimiche e genetiche, non posso-

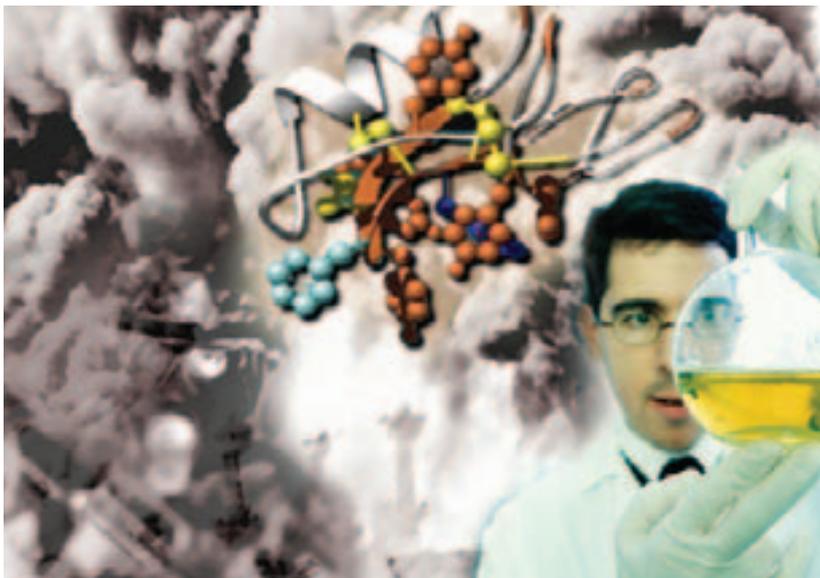
no essere classificati come *C. botulinum*.

La neurotossina botulinica viene sintetizzata all'interno della cellula batterica durante la crescita anaerobica, dopo la germinazione delle spore. Tutte le neurotossine botuliniche vengono rilasciate all'esterno, associate ad altri componenti proteici non tossici, alla fine della fase di crescita a seguito della lisi cellulare. I composti proteici non tossici proteggono la tossina da fenomeni di denaturazione (ad esempio, resistenza all'acidità gastrica per cui passa inalterata nell'intestino). Quando il pH gastrointestinale diventa leggermente alcalino, le neurotossine si staccano dai componenti non tossici e assumono la forma di catene polipeptidiche singole, biologicamente inattive. L'attivazione, provocata dalla scissione di un ponte disolfuro operata da pro-



Paolo Aureli

Laboratorio di Alimenti, ISS



teasi di origine batterica o tissutale, porta alla formazione di una molecola costituita da 2 catene, una leggera (L, 50 kDa) e una pesante (H, 100 kDa), legate fra loro da un altro ponte disolfuro e da legami non covalenti.

Le tossine attraversano l'epitelio intestinale mediante meccanismi di transitosi e, diffondendosi nell'organismo attraverso i liquidi corporei, raggiungono le terminazioni nervose periferiche.

Una volta raggiunto l'organo bersaglio le neurotossine agiscono come zinco-endopeptidasi su diverse proteine sinaptiche coinvolte nei processi di neurotesocitosi del neuromediatore acetilcolina: il taglio operato dalle tossine botuliniche blocca il rilascio del neuromediatore e provoca la paralisi flaccida del botulismo.

La dose letale di tossina per l'uomo non è nota; questa può essere estrapolata dagli studi sugli animali: la dose letale di tossina cristallina tipo A in un soggetto di 70 kg è di circa 0,09-0,15 µg per via endovenosa o intramuscolare, di 0,70-0,90 µg per inalazione e di 70 µg per via orale. Alla luce di tali valori appare poco probabile che si possa utilizzare come arma biologica il prodotto terapeutico presente in commercio contenente la tossina tipo A, perché contiene solo lo 0,3% della dose stimata letale se inalata e lo 0,005% di quella stimata letale se ingerita.

È da sottolineare il fatto che la tossina svolge la propria azione solo quando viene a contatto con le mucose, mentre la pelle intatta è impermeabile alla tossina.

La tossina botulinica viene facilmente inattivata con il calore ( $T > 85^\circ\text{C}$  per 5 min); per tale ragione il botulismo alimentare deriva esclusivamente dall'ingestione di alimenti contenenti tossina preformata che non sono stati sottoposti a riscaldamento prima del consumo o sono stati riscaldati a temperatura inadeguata. La tossina è anche inattivata dai correnti trattamenti utilizzati per la potabilizzazione dell'acqua. Tuttavia, esiste una possibilità teorica di contaminazione dell'acqua al terminale di distribuzione.

In caso di botulismo la terapia più appropriata si basa sulla somministrazione dell'antitossina (disponibile presso il Ministero della Salute, Dipartimento di Prevenzione, Ufficio III) associata ove necessario a terapia di supporto. Per essere veramente efficace, l'antisiero va somministrato nel più breve tempo possibile al paziente con i segni neurologici del botulismo. Per effetto degli attuali protocolli terapeutici, la morte sopravviene raramente.

In base a quanto emerso dall'osservazione dei casi di botulismo verificatisi in Italia negli ultimi dieci anni, si può affermare che la malattia è un evento raro, imputabile pre-

valentemente al consumo di conserve alimentari contaminate. Il numero dei soggetti colpiti in ciascun episodio è assai contenuto ( $< 3$  casi). La presenza della tossina nell'alimento è provocata:

- da un trattamento di sterilizzazione non corretto ( $< 121^\circ\text{C}$  per 3 min), per cui le spore sopravvissute possono germinare quando il prodotto viene conservato a temperatura favorevole ( $>$  di  $3-10^\circ\text{C}$ ) per tempi lunghi che porta alla produzione della tossina;
- da un'acidificazione insufficiente ( $\text{pH} > 4,5$ ) delle conserve pastorizzate confezionate sott'olio.

La possibilità di provocare botulismo contaminando volontariamente alimenti e acqua con la tossina esiste seppure con elevata difficoltà pratica. Ciò, tuttavia, avrebbe un impatto relativo sulla popolazione sia perché limitato solo ai soggetti che dovessero consumare la porzione di prodotto contaminato sia perché limitato solo ai prodotti pronti, da consumare senza essere riscaldati. Nel caso in cui si volessero provocare casi di botulismo mediante diffusione della tossina sotto forma di aerosol, tale evento potrebbe essere influenzato dalle condizioni atmosferiche e da fattori di degradazione (in condizioni di elevata umidità e a temperatura ambiente si stima che la sua attività si riduca dell'1-4% al min). Una soluzione concentrata può sparire dall'ambiente in circa 2 giorni.

In ogni caso, gli effetti conseguenti all'uso terroristico o bellico della tossina botulinica dovrebbero poter essere rapidamente circoscritti. Per questo, è necessario disporre di un efficiente sistema di sorveglianza che si allerti in presenza di un abnorme numero di casi per individuare nel più breve tempo possibile la sorgente e le cause della contaminazione. Tuttavia, perché la sorveglianza sia tempestiva è necessario avanzare il sospetto diagnostico nel più breve tempo e confermarlo con analisi microbiologiche rapide.

## Antrace: esperienza del Centro di Riferimento Nazionale

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Puglia e della Basilicata, con sede a Foggia, è stato individuato dal Ministero della Salute come referente nazionale per il test sul rilevamento delle spore di antrace in campioni sospetti (con eccezione dei sospetti clinici umani) nell'ambito dell'emergenza bioterrorismo.

Il test PCR (Polymerase Chain Reaction) sviluppato presso l'IZS di Foggia fin dal 1999, è un test rapido che in breve tempo (meno di 4 ore) è in grado di svelare, oltre che la specie, anche la patogenicità del ceppo. Un vantaggio di grande importanza nell'approccio tecnico sviluppato dall'IZS di Foggia è che il test è eseguito in condizioni di massima sicurezza, trattandosi di materiale previamente sterilizzato. L'analisi si basa sull'amplificazione di frammenti specifici del DNA di *Bacillus anthracis* (sono state sviluppate 9 coppie di primer).

La procedura indicata dal Ministero della Salute prevede che il campione sospetto sia prelevato da Vigili del Fuoco, i quali, dopo averlo sigillato, lo portano al più vicino presidio ospedaliero o comunque alla più vicina struttura che possiede un'autoclave. In questa struttura il prodotto viene sottoposto a un processo di sterilizzazione a 121 °C per 45 min.

Presso l'IZS della Puglia e della Basilicata il campione viene identificato con un numero di accettazione e una scheda di registrazione che diventa anche foglio di lavoro. Dal momento di accettazione il campione viene inviato al laboratorio dove il materiale sospetto viene diviso in due aliquote di cui la prima viene lavorata tal quale, mentre alla seconda viene

aggiunta una quantità nota di DNA di *B. anthracis*. La PCR di routine prevede l'uso di tre coppie di primer:

- ba 813 R1/ R2 specifico per il cromosoma;
- pag 23/24 specifico per l'antigene protettivo (è uno dei fattori di tossicità presente sul plasmide pXO1 di *B. anthracis*);
- cap (C) 57/58 specifico per la capsula (codificato sul plasmide il pXO2).

mentre il suo corrispettivo addizionato con DNA di *B. anthracis* risulta positivo. È da considerare positivo il campione di cui le due aliquote risultino entrambe positive in PCR.

Vengono altresì eseguiti tutti gli opportuni controlli per stabilire l'idoneità del campione.

Le prove in doppio servono a verificare la presenza nelle polveri di sostanze che interferiscono con i processi di amplificazione del DNA. Questa procedura permette di evitare il pericolo dei falsi negativi. In caso di presenza di sostanze interferenti il campione viene sottoposto a diversi processi di purificazione (fenolo-cloroformio) fino a quando la prova non è ritenuta sufficientemente soddisfacente.

Il test PCR non viene effettuato solo sulle polveri ma anche su buste e lettere sospette ove non viene rilevata presenza di polvere. Nel corso dell'emergenza (oltre 20 000 test) sono stati riscontrati solo pochissimi casi in cui il campione ha continuato a interferire con i processi di amplificazione del DNA.

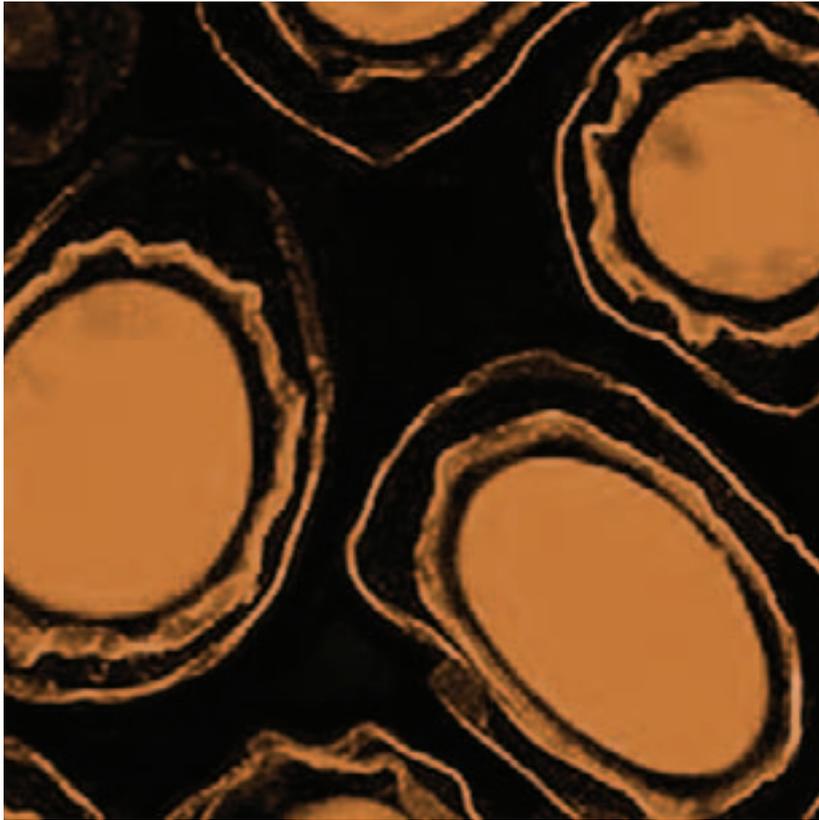
In tali casi è necessario ricorrere ai metodi diagnostici descritti nel protocollo dell'ISS ([www.iss.it](http://www.iss.it)) con riferimento ai campioni biologici non inattivati.

**Il Ministero della Salute ha individuato un Centro Nazionale di Riferimento per il test di rilevamento dell'antrace**

**Il test PCR (Polimerase Chain Reaction) è il test rapido che in poche ore identifica l'antrace**

**Antonio Fasanella**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia



La tecnica PCR sopra descritta è indirizzata verso un target ben preciso rappresentato dalle polveri rinvenute in buste e plichi sospetti, mentre non è ritenuta valida per campioni biologici o per tamponi ambientali dove, peraltro, gli stessi CDC di Atlanta, nonché i protocolli diagnostici dell'ISS prevedono l'esame colturale.

La sensibilità del test, utilizzato nel corso di questa emergenza, è stata valutata su spore di *B. anthracis* autoclavate a 121 °C per un'ora.

Essa è risultata variabile in rapporto al tipo di *primer* e risulta più sensibile con quelli a basso numero di paia basi rispetto a quelli con alto numero di paia basi (dati in corso di pubblicazione).

Il motivo va ricercato molto probabilmente nel fatto che il lungo processo di sterilizzazione determinerebbe un'alterazione delle sequenze di DNA di una certa lunghezza, e

quindi un certo grado di *mismatch* anche per sequenze complementari.

I processi di lavorazione richiedono l'utilizzo di una grande quantità di DNA di antrace, superato grazie alle caratteristiche del controllo positivo utilizzato rappresentato da un ceppo di *B. anthracis* che, pur essendo apatogeno, possiede un corredo genetico sovrapponibile a quello dei ceppi patogeni.

Il ceppo, denominato Carbo-sap, è quello utilizzato come vaccino per uso veterinario nelle campagne di profilassi in Italia. La scoperta delle caratteristiche di questo ceppo risale al 1999, anno in cui è stata messa a punto la tecnica PCR.

Molto importante è l'aspetto relativo al processo di genotipizzazione.

Grazie al lavoro in collaborazione con ricercatori americani, si è effettuata la genotipizzazione di diversi ceppi isolati da focolai di carbonchio ematico in Italia con l'obiettivo di disegnare una mappa dei genotipi di *B. anthracis* in Italia. La genotipizzazione di *B. anthracis* si basa sull'analisi di 8 VNTR (Variable Number Tandem Repeat) individuate nel *B. anthracis* (6 a livello del cromosoma e 2 a livello dei plasmidi), il test è denominato MLVA (Multiple Locus Variable Analysis). Attraverso l'analisi di oltre 800 ceppi provenienti da diverse aree geografiche del pianeta, presso i laboratori americani, sono stati individuati 6 cluster a cui afferiscono 89 genotipi di *B. anthracis*.

Dagli studi effettuati sui ceppi italiani è emerso che nel nostro Paese circolano 5 genotipi di *B. anthracis* e tutti appartengono al cluster A1 (dati in corso di pubblicazione).

Sono genotipi molto simili fra loro, probabilmente originati da un progenitore comune, e indicano che nel nostro Paese i focolai di carbonchio ematico sono causati da ceppi di *B. anthracis* autoctoni. In Italia

non sono stati rilevati fino a oggi focolai di importazione da Paesi esteri.

L'esatta conoscenza dei genotipi di antrace circolanti in un territorio è un presupposto fondamentale per poter applicare maggiori misure di controllo sugli alimenti per il bestiame importati da Paesi a rischio, nonché per determinare sorgenti di episodi epidemici.

Recentemente, presso i laboratori dell'IZS della Puglia e della Basilicata è stata messa a punto una metodica ELISA in grado di rilevare anticorpi contro i fattori tossici di *B. anthracis* (PA, LF e EF) nelle pecore e nelle capre.

**Il test PCR viene effettuato anche su buste e lettere sospette**

**Studi specifici hanno rilevato che in Italia circolano 5 genotipi di *Bacillus anthracis***

## Il rischio del bioterrorismo nelle produzioni animali

Ogni atto terroristico, al fine di ottenere il massimo risultato, deve essere realizzato in un tempo molto breve e la sua efficacia è tanto maggiore quanto il suo effetto è protratto nel tempo. Negli obiettivi di ogni attentato si può individuare una matrice comune caratterizzata dall'intenzione di:

- generare panico;
- arrecare danno economico;
- indebolire le strutture produttive;
- colpire i gangli nevralgici della società;
- attirare l'attenzione dell'opinione pubblica;
- influenzare le politiche sociali ed economiche.

In questo contesto, nel ventaglio delle possibili strategie perseguibili, non si può dimenticare l'uso delle armi biologiche come strumenti che nelle mani dei terroristi si mostrerebbero estremamente efficaci per perseguire i loro scopi. L'effetto dei microrganismi patogeni, infatti, come mezzo di distruzione di massa rappresenta molti indubbi vantaggi dal punto di vista terroristico che possono essere distinti in relazione alla natura dell'agente utilizzato. In linea generale, però, le due caratteristiche principali che condizionano la scelta di un organismo patogeno sono la contagiosità e la persistenza. Organismi molto contagiosi consentono di infettare inizialmente solo pochi individui, dai quali successivamente l'infezione si propaga in maniera esponenziale. Organismi persistenti, invece, possono infettare individui suscettibili per un lungo periodo di tem-

po. Esempi eclatanti sono il virus del vaiolo dell'uomo (Poxvirus) per la sua alta contagiosità e il batterio responsabile del carbonchio (*Bacillus anthracis*) per la sua elevatissima persistenza, sotto forma di spore, nell'ambiente.

Ciò che ha da sempre limitato l'uso delle armi biologiche come mezzo di offesa di carattere bellico è la scarsa precisione e l'assoluta mancanza di controllo legata all'impossibilità, da parte dei microrganismi patogeni, di discriminare tra militari e civili o nemici e alleati. Ciò che contribuisce a rendere le armi biologiche poco affidabili a fini bellici, ne fa però perfetti strumenti di morte a fini terroristici. Ed è per questa ragione che è sempre più alta l'attenzione della comunità internazionale nei confronti del bioterrorismo.

In un ipotetico scenario caratterizzato dall'uso di armi biologiche per attentati terroristici non si può prescindere dall'utilizzo di agenti patogeni oltre che per l'uomo anche per gli animali da reddito (agri-bio-terrorismo), approccio che potrebbe essere particolarmente pericoloso perché:

- è relativamente sicuro per gli attentatori;
- è psicologicamente più accettabile;

- ha un effetto subdolo la cui origine è difficilmente provabile;
- è facile da organizzare;
- colpisce un comparto particolarmente vulnerabile perché il patrimonio zootecnico nell'Unione Europea e negli USA è molto suscettibile alle più pericolose malattie infettive per l'attuazione, ormai da anni, di campagne di controllo che hanno sostanzialmente eliminato le stesse malattie infettive;
- determina ingenti danni economici.

Tra questi, sicuramente, ciò che rende l'agri-bio-terrorismo uno strumento di grande efficacia è sicuramente l'estrema facilità nell'organizzare ed effettuare un attentato perché gli organismi utilizzabili sono facilmente reperibili sia in natura -

**L'utilizzo di agenti patogeni negli atti terroristici è dovuto alla loro contagiosità e persistenza**

spesso endemici in aree sottosviluppate - sia sul mercato internazionale. In aggiunta a ciò, è importante ricordare che non è possibile implementare, nelle normali attività di vigilanza aeroportuale, alcun controllo volto a identificare materiale di origine biologica clandestinamente importato. Alla facilità di esecuzione si associa la possibilità di arrecare un danno economico estremamente grave, caratterizzato da fattori diretti, legati all'effetto dell'agente patogeno sulla salute degli

**Paolo Pasquali, Maria Tollis e Agostino Macri**

Laboratorio di Medicina Veterinaria, ISS

**Tabella** - Agenti infettivi utilizzabili a fini terroristici

Agente	Malattia	Specie suscettibile*	Lista OIE**
<i>Aphovirus</i> , Picornaviridae	Afta	Bovini, ovini, caprini, suini	A
<i>Enterovirus</i> , Picornaviridae	Malattia vescicolare	Suini	A
<i>Morbillivirus</i> , Paramyxoviridae	Peste bovina	Bovini	A
<i>Morbillivirus</i> , Paramyxoviridae	Peste dei piccoli ruminanti	Ovini, caprini	A
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Pleuropolmonite contagiosa	Bovini, ovini, caprini	A
<i>Orbivirus</i> , Reoviridae	Blue Tongue	Ovini	A
Capripoxvirus, Poxviridae	Vaiolo ovino	Ovini	A
Pestivirus, Flaviviridae	Peste suina classica	Suini	A
<i>Influenzavirus</i> , Orthomyxoviridae	Influenza aviare	Polli	A
<i>Bacillus anthracis</i>	Carbonchio	Bovini, equini, uomo	B
<i>Brucella</i> spp	Brucellosi	Bovini, ovini, suini, uomo	B
<i>Lyssavirus</i> , Rhabdoviridae	Rabbia	Cane, uomo	B
<i>Pseudomonas mallei</i>	Morva	Equini, uomo	B
<i>Flavivirus</i> , Flaviviridae	Encefaliti equine	Equini, uomo	B

(\*) Per le malattie inserite nella lista B si indicano solamente le specie più sensibili

(\*\*) Office International des Epizootics

animali, ma soprattutto da fattori indiretti determinati dai vincoli sanitari che regolano il trasporto e la commercializzazione degli animali e dei prodotti alimentari di origine animale, cui sono sottoposti i vari Paesi. Per chiarire tale concetto è sufficiente ricordare che nel 1993 si

è verificata un'epidemia di afta epizootica (*Aphovirus*, Picornaviridae), una malattia virale estremamente contagiosa che colpisce ruminanti e suini e assente da diversi anni in Italia. In tale circostanza, si

sono spesi circa 11 milioni di Euro per implementare una campagna di controllo per contenere la diffusione della malattia e ristabilire lo status di indennità, ma al contempo i costi indiretti, legati alla temporanea impossibilità di esportare prodotti carni, hanno inciso per oltre 120 milioni di Euro. Più recentemente, l'epidemia di afta che si è verificata in Gran Bretagna è costata 2,7 miliardi di sterline inglesi.

Nel corso della storia recente, in più di un'occasione si sono utilizzati organismi patogeni per gli animali al fine di colpire indirettamente l'uomo. In particolare, sia nella 1<sup>a</sup> che nella 2<sup>a</sup>

Guerra Mondiale, batteri del carbonchio (*B. anthracis*) e della morva (*Pseudomonas mallei*) sono stati utilizzati in Europa per distruggere gli allevamenti di bovini ed equini e quindi ridurre le possibilità di approvvigionamento e di movimento

delle truppe nemiche. È noto inoltre, che gli Stati Uniti, l'ex Unione Sovietica, la Germania, la Gran Bretagna, il Canada, il Giappone, la Cina e l'Irak hanno avuto fino a tempi molto recenti programmi di ricerca volti a uti-

lizzare organismi patogeni a scopo bellico. In particolare, gli organismi che più facilmente si adattano a un impiego bellico o terroristico sono quelli inseriti nella lista A e quelli della lista B a carattere zoonosico elaborate dall'Office International des Epizooties (OIE) (Tabella).

In questo scenario è fin troppo facile capire, quindi, come la rete del terrorismo internazionale possa facilmente acquisire il necessario *know-how* e approvvigionarsi del materiale necessario. Il delicato equilibrio socio-politico che esiste in alcune aree del mondo rende disponibili, infatti, sia le necessarie risorse uma-

ne, sia i materiali di partenza per organizzare un efficace attentato.

Se l'uso degli agenti eziologici delle più importanti malattie degli animali da reddito costituisce di per sé un rischio enorme per la società intera, ciò assume connotati ancor più drammatici se si considera la possibilità che tali agenti possano essere manipolati geneticamente per conferire loro caratteri di resistenza nei confronti dei normali presidi terapeutici (antibioticoresistenze) o di maggior patogenicità.

Di fronte a tale inquietante scenario sarebbe pertanto necessario predisporre piani di intervento strategici la cui attuazione tempestiva possa rappresentare una valida risposta a un attentato. Tali interventi devono presupporre la disponibilità di adeguate scorte di vaccino, per quelle malattie la cui profilassi immunizzante è praticabile e devono prevedere sia la mobilitazione di un numero di professionisti adeguatamente preparati che operano sul territorio per la gestione della crisi sia la disponibilità di risorse, dislocate sul territorio, atte a fronteggiare l'emergenza. Ciò perché è praticamente impensabile poter prevenire il rischio di attentati agri-bio-terroristici, ma è possibile, e doveroso, qualora avvenissero, ridurre drasticamente gli effetti al fine di rendere vano il significato stesso dell'attentato.

**Nella 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> Guerra Mondiale sono stati utilizzati organismi patogeni per gli animali al fine di colpire l'uomo**

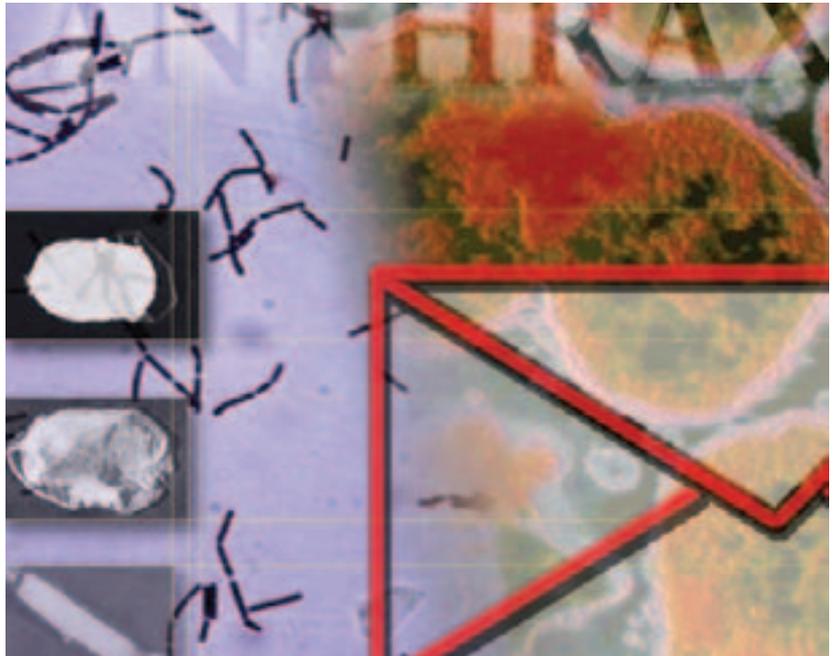
## Emergenza antrace e sicurezza in laboratorio

L'emergenza antrace in Italia è iniziata con il rilascio intenzionale di polveri sospette nel sistema postale, a ridosso degli episodi americani, sotto forma di incivili e false emulazioni: atti per lo più mirati a molestare sul piano emotivo singoli destinatari, ma che hanno scatenato effetti psicologici negativi a livello sociale, tanto che lo Stato è dovuto intervenire anche con forti provvedimenti di dissuasione.

L'emergenza ha rilanciato, con interesse e tempestività, il problema della sicurezza in laboratorio. Nei laboratori ospedalieri dove si sono esaminati campioni clinici provenienti da soggetti venuti a contatto con polveri sospette si sono rafforzati organici e sistemi di sicurezza, così negli Istituti Zooprofilattici e nelle istituzioni similari, mobilitati nella gestione di tali polveri.

L'emergenza ha mobilitato l'attenzione di ricercatori che hanno avviato progetti per migliorare sistemi di sorveglianza e controllo.

L'emergenza ha focalizzato l'attenzione sul bioterrorismo negli animali: nel mese di ottobre del 2001 la Commissione europea per la sanità pubblica ha sottolineato i "considerevoli danni" che potrebbero provocare attacchi con armi biologiche negli allevamenti o nel sistema alimentare. Gli esperti europei hanno sottolineato l'importanza di creare un'agenzia comunitaria per assicurare all'Europa "una reazione pronta e rapida".



Il rilancio del problema sicurezza nei laboratori microbiologici ha riguardato aspetti diversi: personale, prodotti, ambiente di lavoro.

Sicurezza del personale significa salvaguardare la salute dei lavoratori con misure preventive, onde evitare qualsiasi esposizione agli agenti patogeni: misure ormai codificate nella legge 626/1994 sulla salute dei lavoratori,

che resta l'obiettivo principale di ogni sistema di sicurezza.

Sicurezza dell'ambiente significa salvaguardare il microclima dell'ambiente di lavoro da contaminazioni interne e nel contempo evitare dispersione di contami-

nanti nell'ambiente esterno, all'insegna dello slogan "don't contaminate in order to not decontaminate". Questo vale soprattutto per *Bacillus anthracis* la cui eventuale dispersione nell'ambiente esterno richiederebbe processi di decontaminazione costosi e non sempre di sicuro successo. Infatti, la spora mostra una resistenza ai disinfettanti 10 000 volte superiore a quella della forma vegetativa e può conservarsi vitale per molti anni (> 80 anni). Il problematico risanamento dei cosiddetti campi maledetti ne è un esempio per il quale è stato accertato che nemmeno un lungo "vuoto biologico" può assicurare un successo certo, motivo per cui si ricorre alla vaccinazione degli animali al pascolo nelle zone dell'Italia dove il carbonchio è enzootico.

**L'emergenza ha portato i ricercatori ad avviare progetti per migliorare i sistemi di sorveglianza e controllo**

**Franco Ciuchini e Rosanna Adone**

Laboratorio di Medicina Veterinaria, ISS

I livelli di sicurezza in laboratorio sono in rapporto al gruppo di rischio di appartenenza degli agenti patogeni, alle misure di contenimento, al livello diagnostico o di studio, alle procedure microbiologiche, al livello tecnologico delle attrezzature, al grado di formazione del personale, ai carichi di lavoro, alle verifiche di sicurezza.

Gli agenti patogeni sono raggruppati in base al grado di patogenicità per l'uomo e per gli animali, ai modi di trasmissione, ai possibili ospiti intermedi e alla disponibilità di trattamenti efficaci. Il DLvo n. 626 del 19 settembre 1994 stabilisce 4 gruppi di rischio: 1°, 2°, 3° e 4°. *B. anthracis* è inserito nel 3° gruppo perché è altamente patogeno per gli animali e per l'uomo, si trasmette per via aerogena, per contatto e per via gastrointestinale o con eventuali ematofagi, ed esistono trattamenti terapeutici (antibiotici) e misure preventive (vaccini) efficaci per l'uomo e per gli animali.

La sua patogenicità, legata alla capacità di produrre quasi sempre la malattia a seguito del contagio, è dovuta all'azione combinata di una esotossina e della capsula, prodotti dalla forma vegetativa nel ciclo spora-bacillo-spora.

Il contagio negli animali avviene per lo più per via digerente, ingerendo foraggi contaminati o pascolando nei cosiddetti "campi maledetti" con alto indice di contaminazione. Nell'uomo, il contagio avviene per contatto o per inalazione di spore liberatesi nel corso della lavorazione di prodotti provenienti da animali infetti (pelli, lana, crini, sangue, carcasse), oppure rilasciate intenzionalmente nell'ambiente esterno.

Le misure di contenimento correlate ai gruppi di rischio caratterizzano i livelli di sicurezza dei laboratori.

In base alle loro caratteristiche progettuali, dotazioni infrastrutturali, attrezzature e misure di contenimento essi sono classificati in laboratori di base, di sicurezza e di massima sicurezza.

I laboratori di base hanno

i requisiti minimi richiesti per i livelli di sicurezza classe 1ª e 2ª, previsti per lavorare agenti microbici classificati nei gruppi di rischio 1° e 2°, in cui sono collocati agenti con basso o moderato rischio per i laboratoristi e scarso o basso rischio per le comunità civili e per gli animali.

**In Italia l'emergenza antrace ha avuto inizio in concomitanza con gli episodi americani**

**Il *Bacillus anthracis* può essere trattato farmacologicamente, sia negli animali che nell'uomo, con antibiotici**

I laboratori di sicurezza hanno i requisiti minimi richiesti per il livello di sicurezza di classe 3ª, previsto per lavorare microrganismi del gruppo di rischio 3° in cui sono collocati agenti, come *B. anthracis*, che presentano un serio rischio per i laboratoristi. Tali agenti possono propagarsi nelle comunità civili e negli animali, tuttavia sono disponibili efficaci mezzi profilattici e terapeutici.

I laboratori di massima sicurezza hanno i requisiti minimi richiesti per il livello di sicurezza di classe 4ª, previsto per lavorare microrganismi del gruppo di rischio 4° in cui sono collocati agenti che producono gravi rischi per i laboratoristi, che possono trasmettersi da un soggetto all'altro, sia in

comunità civili che negli animali, e per i quali non sono disponibili efficaci trattamenti terapeutici né misure preventive. In Eu-



**Tabella** - Laboratori microbiologici e livelli di sicurezza

Misure di contenimento e requisiti	Livello sicurezza 3 <sup>a</sup> classe
Ambiente di lavoro separato da altre attività nello stesso edificio	Raccomandato
Condizionamento meccanico dell'ambiente, indipendente	Raccomandato
Aria immessa o estratta in zona di lavoro, filtrata con HEPA	Sì, per l'aria estratta
Ambiente di lavoro sigillabile, per decontaminazione	Raccomandato
Specifiche procedure di disinfezione e sistemi di verifica	Sì
Controllo efficace dei vettori come roditori e insetti	Sì
Ambiente di lavoro in depressione rispetto all'ambiente esterno	Raccomandato
Vestibolo a doppia porta per entrata	Raccomandato
Accesso limitato alle persone autorizzate	Sì
Simboli di rischio biologico all'ingresso	Sì
Mezzi di protezione personali	Sì
Superfici idrorepellenti per arredi e pavimenti	Sì
Deposito sicuro per agenti biologici	Sì
Finestra di ispezione per vedere gli occupanti nell'ambiente di lavoro	Raccomandato
Attrezzature a norma di sicurezza	Sì
Cappe di sicurezza microbiologica, a flusso laminare, tipo II	Sì
Autoclave a doppia apertura	Raccomandato
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Sì
Procedure operative standard per tecniche microbiologiche	Raccomandate
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

ropa, *B. anthracis* è collocato dalle disposizioni vigenti nel gruppo di rischio 3°, associato al laboratorio di sicurezza di cui si riportano in Tabella le specifiche misure di contenimento e i requisiti.

L'impatto dell'emergenza antrace nel nostro Paese ha trovato questi laboratori impegnati in tutt'altri obiettivi, poiché il carbonchio in quest'ultimo ventennio era quasi scomparso in campo medico, se non per qualche caso cutaneo di tipo professionale. In campo veterinario sporadici focolai nel Sud Italia e nelle Isole sono stati sempre risolti con il supporto di laboratori di base. L'emergenza non ha trovato impreparati i servizi sanitari, tuttavia ha rilanciato il problema sicurezza in laboratorio tanto da determinare la revisione obbligatoria delle misure e dei requisiti raccomandati in Tabella. I responsabili delle istituzioni coin-

volte si sono attivati per il problema sicurezza sul piano normativo e scientifico, proponendo interventi specifici: modifiche di adeguamento strutturale; acquisto di laboratori mobili di sicurezza 3<sup>a</sup> classe; adeguamento dei protocolli di isolamento; messa a punto di tecniche biomolecolari per le analisi di polveri sterilizzate; progetti di ricerca sulla genotipizzazione; promozione di un centro di referenza nazionale per il carbonchio ematico in veterinaria; aumento degli organici; formazione mirata del personale; convegni. Le misure prese sono state anche condizionate da una forma di psicosi collettiva che ha coinvolto esperti della sicurezza,

responsabili di laboratorio, microbiologi. Le misure di contenimento raccomandate in Tabella sono state rese obbligatorie anche per gli aumentati carichi di lavoro, per la mancanza di sistemi medici immunizzanti nel nostro Paese, e su richiesta degli stessi laboratori. Alcuni istituti si sono organizzati con laboratori mobili di sicurezza 3<sup>a</sup> classe: unità strutturali trasportabili, complete di attrezzature a norma, autosufficienti per una diagnosi convenzionale e molecolare, in pressione negativa. L'emergenza ha prospettato un nuovo aspetto della microbiologia infettiva, il bioterrorismo, che può colpire comunità civili e allevamenti animali. E se tutt'oggi, in Europa, l'emergenza antrace è stata considerata falsa emergenza, non bisogna abbassare la guardia poiché il bioterrorismo può colpire sempre, inaspettatamente, ovunque e comunque.

**In Italia il carbonchio è quasi scomparso in campo medico**

**Anche se l'emergenza antrace in Europa è risultata una falsa emergenza non bisogna abbassare il livello di attenzione**

## Il ruolo della Sanità Militare e degli organismi internazionali nella lotta al bioterrorismo

**N**ella prima metà degli anni '90 in seguito a una serie di analisi effettuate negli Stati Uniti dall'Institute of Medicine (IOM) e dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta e, a livello internazionale, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è stato avviato un programma di strategia globale contro le malattie infettive emergenti e riemergenti. Tale programma prevedeva, fra l'altro, il rafforzamento della sorveglianza e l'organizzazione di una rete di laboratori diagnostici. Sempre nello stesso periodo, presso l'OMS fu avviata una procedura che si concretizzò nel 1995 con la creazione di un posto per ufficiale medico della Sanità Militare italiana presso la Divisione delle Malattie Trasmissibili dell'OMS, inaugurando con ciò una nuova stagione basata su un'alleanza permanente civile-militare per la lotta alle malattie infettive. Queste, infatti, non conoscono frontiere né geografiche né di settori funzionali della società, pertanto ogni risorsa deve essere messa a disposizione per collaborare al raggiungimento degli obiettivi concordati.

### SANITÀ MILITARE

Tale strategia collaborativa deve essere pianificata e realizzata anche nella lotta alle malattie infettive che possano occorrere quali conseguenze di un uso deliberato di agenti patogeni. Pertanto la Sanità Militare, che in molti Paesi del mondo collabora scarsamente con quella civile, talvolta perfino senza un regolare

scambio di informazioni sulle rispettive notifiche di malattie infettive, dovrebbe essere costantemente coinvolta in un piano strategico comune basato sull'alleanza civile-militare, soprattutto in virtù dell'esperienza che la Sanità Militare ha tradizionalmente acquisito, in tutto il mondo, nell'affrontare le malattie infettive per le quali la collettività militare è a particolare rischio. Inoltre, in molti Paesi, soprattutto in quelli in via di sviluppo, le infrastrutture militari sono migliori rispetto a quelle civili. Negli USA questo modello di proficua collaborazione si è concretizzato in numerose istituzioni, come i CDC, che sono nati in ambito militare, o il Global Emerging Infections System, recentemente organizzato in ambito militare per volontà presidenziale, con il compito di collaborare con le autorità sanitarie civili, nella lotta alle malattie infettive, sia negli USA che a livello mondiale. Inoltre, l'Esercito USA ha curato la pubblicazione, nel 1997, del *Textbook of Military Medicine*, la cui parte I è dedicata ai *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Infine, l'Istituto di Ricerca sulle Malattie Infettive dell'Esercito USA cura, tra le altre cose, la rivista *Jane*

di scienze strategiche che ha realizzato un *Jane's Chem-Bio Handbook*, a conferma dell'impegno culturale sul problema delle armi chimiche e biologiche del mondo militare in generale e della Sanità Militare in particolare.

### ORGANISMI INTERNAZIONALI

Gli strumenti giuridici internazionali nati per prevenire il possibile utilizzo di armi biologiche da parte degli Stati sono il Protocollo di Ginevra del 1925 (*Protocol for the prohibition of the use in war of asphyxiating, poisonous or other gases and of bacteriological methods of warfare*), entrato in vigore nel 1928, di cui è depositaria la Francia e a cui aderiscono 132 Stati e la Convenzione per le Armi Biologiche (*Convention on the prohibition of the development, production and stockpiling of bacteriological (biological) and toxin weapons and their destruction*), entrata in vigore nel 1975, cui aderiscono 144 Stati e di cui sono codepositari gli USA, la Russia e il Regno Unito. La Convenzione per le Armi Biologiche è uno strumento sicuramente utile per creare una diffusa coscienza etica sul problema, ma larga-

La collaborazione, a livello internazionale, tra Sanità Militare e quella civile si sta sempre più intensificando

Raffaele D'Amelio

Ministero dell'Aeronautica

mente insufficiente per la pressoché totale assenza di sistemi intrusivi di verifica, resa peraltro difficoltosa dalla possibilità del cosiddetto *dual use*, dall'assenza di sanzioni e da formulazioni giuridiche non sempre chiaramente espresse per vietare l'uso di agenti biologici. L'inefficienza della Convenzione è emersa chiaramente nella prima metà degli anni '90, relativamente all'Iraq (Stato aderente alla Convenzione, ma che aveva sviluppato un programma offensivo di guerra biologica pronto a essere utilizzato durante la guerra del Golfo) e alla Russia (Stato codepositario della Convenzione fin dalla sua nascita, ma che aveva sviluppato e mantenuto fino al 1992 un programma offensivo di guerra biologica). La Convenzione viene sottoposta a revisione ogni 4-5 anni, ma nel novembre 2001, dopo i disastrosi attentati dell'11 settembre, non è stato possibile raggiungere una posizione unitaria proprio a causa degli USA, che malgrado così duramente colpiti dal bioterrorismo, si sono opposti a un regime di verifiche più intrusivo. La relativa inefficacia della Convenzione nel prevenire episodi di guerra biologica è ancora più marcata nei confronti degli episodi di bioterrorismo, che sfuggono a qualsiasi logica di regolamentazione giuridica; in tali episodi un certo deterrente può solo derivare dal potere sanzionatorio sviluppato attraverso legislazioni nazionali e accordi bilaterali o multilaterali fra Stati ai fini di estradizione. La lot-

ta bioterroristica è infatti una lotta asimmetrica di piccole cellule, che hanno il vantaggio della sorpresa, contro importanti istituzioni, le quali generalmente risultano totalmente vulnerabili per l'effetto sorpresa.

Fra le organizzazioni internazionali che la Convenzione per le Armi Biologiche riconosce come partner irrinunciabili sono rappresentate l'OMS con sede a Ginevra, per la sorveglianza degli agenti biologici con effetto sull'uomo, l'Ufficio Internazionale per le Epizootie, con sede a Parigi, per la sorveglianza degli agenti biologici a tropismo animale, e infine la FAO, con sede a Roma, per la sorveglianza degli agenti biologici a tropismo vegetale. L'OMS, nella seconda metà degli anni '90, ha varato un progetto consistente nel coordinamento di un largo numero di scienziati appartenenti alle diverse aree geografiche del mondo, con il compito di revisionare una pubblicazione OMS del 1970: *Health aspects of chemical and biological weapons*; tale revisione, circolata nel novembre 2001 come *prepublication issue*, nella sua edizione finale rappresenterà la guida per i governi per l'organizzazione di piani di preparazione e risposta a eventi di chemio- o bioterrorismo.

Inoltre, in relazione all'art. 10 della Convenzione, che prevede la possibilità di scambio di materiali e di *know-how* biotecnologico fra i Paesi aderenti - soprattutto dai



Paesi sviluppati verso quelli in via di sviluppo - finalizzato all'applicazione pacifica, vi è ampia discussione all'interno della comunità internazionale se affidare tale funzione al Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie delle Nazioni Unite, con sede a Trieste.

## CONCLUSIONI

In conclusione, il ruolo della Sanità Militare e delle organizzazioni internazionali è fondamentale nel disegnare una strategia globale e nazionale di preparazione e risposta a eventi di bioterrorismo, ma il successo di tale azione preventiva può unicamente derivare da un'accurata attività di *intelligence*, eventualmente integrata, all'interno della sua struttura, da una componente sanitaria specializzata, in grado di cogliere tempestivamente i segnali sospetti nel settore specifico.

## Special issue: in brief

### Bioterrorism: preparedness and countermeasures

With, and probably more than, other health care professionals, microbiologists stay in the front line before the scourge of bioterroristic attacks, of which we all fear the future scenarios yet suffering from recent experience with anthrax. Their role is not only making rapid and accurate diagnosis of even totally unknown pathogens but also to create an efficient, possibly real-time responsive network of peripheral and central laboratories for only the integrated work of the network may ensure a prompt and efficient response. This issue of the *Notiziario* is in itself a seed, at the national level, of this strategy. It summarizes the contributions presented at a ISS Course on microbiological preparedness to bioterrorism, with obvious emphasis on principal, mostly feared class A pathogens and a narrow deal of contributions on general aspects of preparedness and response. The seminal recent experience with hoaxes of anthrax attack in Italy and the particular role of the Military Health System are also dealt with. It is hoped that these contributions are of value to and help microbiologists switch from "awareness to preparedness" to what we pessimistically but realistically foresee as a rather long fight against bioterrorism.

# Corso

## EDITORIA SCIENTIFICA: PRODUZIONE E ORGANIZZAZIONE DI CONTENUTI INFORMATIVI SU SUPPORTI TRADIZIONALI E IN INTERNET

*Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 4-6 settembre 2002*

Il corso intende offrire strumenti utili per organizzare le informazioni nei canali più appropriati alla loro diffusione (articoli scientifici, rapporti tecnici, opuscoli informativi, diapositive e lucidi per presentazioni orali, poster, pagine web); saranno presentate e discusse le problematiche connesse all'affidabilità e alla sicurezza dei dati in Internet e alla gestione del copyright, e saranno introdotti i principi di valutazione della letteratura scientifica.

### **Direttori del corso**

*Paola De Castro e Franco Piccinno, Servizio per le Attività Editoriali, ISS*

### **Segreteria scientifica**

*Elisabetta Poltronieri*

Tel. 06 49902296, E-mail: [elisabetta.poltronieri@iss.it](mailto:elisabetta.poltronieri@iss.it)

*Paola De Castro*

Tel. 06 49902944; E-mail: [paola.decastro@iss.it](mailto:paola.decastro@iss.it)

### **Segreteria tecnica**

*Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*

Tel. 06 49902943; E-mail: [segr-sae@iss.it](mailto:segr-sae@iss.it)

Per le iscrizioni al Corso consultare il sito dell'Istituto Superiore di Sanità:  
[www.iss.it/formazione/index.htm](http://www.iss.it/formazione/index.htm)

# Notiziario

La Redazione del **Notiziario** è a disposizione per accogliere commenti e suggerimenti e rendere questo strumento sempre più utile e rispondente alle reali esigenze dei suoi lettori

### **Notiziario** dell'Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299  
00161 Roma

**Tel.** 06 4990 3374

**Fax** 06 4990 2253

**e-Mail:** [notiziario@iss.it](mailto:notiziario@iss.it)  
<http://www.iss.it/notiziario>

### **Nei prossimi numeri**

Sistemi di sorveglianza  
sulle donazioni di sangue  
in Italia

Problemi etici  
e ricerca dell'informazione