



Università degli Studi di Perugia

# Agenti biologici di bioterrorismo: caratteristiche microbiologiche e manipolazione in laboratorio

Antonella Mencacci, Francesco Bistoni

Sezione di Microbiologia  
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche

La risposta organizzativa dell'Università e della Ricerca alle minacce del Bioterrorismo  
Perugia, 6 Maggio 2002

Per bioterrorismo si intende l'uso deliberato di agenti biologici o chimici, nocivi per salute pubblica. Il rischio di attentati bioterroristici, già evidenziato in episodi sporadici negli scorsi anni, è purtroppo diventato quanto mai pressante e concreto dopo i fatti di New York dell'11 settembre 2001, come dimostrato dai casi di antrace verificatisi negli Stati Uniti.

A differenza di attacchi militari o cataclismi naturali, un attacco bioterroristico è per sua natura invisibile e silente, e quindi estremamente difficile da individuare. In particolare, mentre gli attacchi terroristici con agenti chimici causano per lo più effetti eclatanti ed immediati in seguito ad inalazione o assorbimento muco-cutaneo, quelli con agenti microbiologici sono più subdoli e difficilmente riconoscibili, a causa del tempo che intercorre tra l'esposizione all'agente infettivo e l'inizio della malattia e del fatto che spesso i segni e sintomi iniziali possono mimare comuni patologie infettive. Viceversa, rapidità ed efficienza nell'individuare e rispondere ad un attacco bioterroristico sono fattori cruciali sia per intervenire sulle persone direttamente contagiate sia per limitare la diffusione dell'agente infettivo anche al resto della popolazione. Per tale motivo si ritiene che le località meno attrezzate da un punto di vista sanitario siano maggiormente a rischio come bersagli di attacchi bioterroristici.

La disponibilità di un piano strategico di emergenza, di strutture appositamente progettate e di strumenti idonei per l'identificazione e caratterizzazione degli agenti infettivi eventualmente utilizzati a scopo bioterroristico, si rende dunque prioritaria ed imperativa. I laboratori di Microbiologia sono parte integrante di tale piano, essendo indispensabili per isolare ed identificare i microrganismi in causa e per trasmettere alle strutture competenti le conoscenze tecniche necessarie alla programmazione ed attuazione della risposta ad eventuali attacchi bioterroristici.

1

**Bioterrorismo**

Uso deliberato di agenti biologici o chimici nocivi per la salute pubblica

Definizione di bioterrorismo

2

Agenti chimici  
Agenti biologici

Invisibili  
Silenti

Gli agenti biologici e chimici a potenziale impiego bioterroristico hanno alcune caratteristiche comuni

3

Agenti chimici	Agenti biologici
Eclatanti	Subdoli
Immediati	Ritardati
Caratteristici	Non caratteristici
Facilmente Individuabili	Difficilmente Individuabili

... ma producono effetti differenti sulla popolazione colpita.

4

Rapidità ed efficienza nell'individuare e rispondere ad un attacco da agenti biologici

↓

- >Intervenire sulla popolazione colpita
- >Limitare la diffusione dell'agente infettivo

Rapidità ed efficienza nell'individuare e rispondere ad un attacco bioterroristico sono fattori cruciali sia per intervenire sulle persone direttamente contagiate sia per limitare la diffusione dell'agente infettivo anche al resto della popolazione

5

**Piano strategico di emergenza**

L'identificazione ed il controllo sanitario di un attacco bioterroristico sono processi estremamente complessi coinvolgenti numerose competenze ed attività, che devono agire in modo programmato, coordinato e finalizzato. Un piano strategico anti-terrorismo si deve quindi articolare in una sorta di tessuto connettivo di stretta interazione tra organi centrali e periferici e tra Strutture o Istituti con specifiche funzioni. Tale piano si articola in cinque punti essenziali.

6

**Agenti biologici: caratteristiche**

- Disponibili
- Facili da produrre
- Letali o invalidante
- Facili da aerosolizzare
- Facili da disseminare
- Stabili dopo la produzione
- Sicuramente patogeno

L'uso potenziale di alcuni microrganismi o di loro prodotti a scopo bioterroristico è strettamente correlato a certe caratteristiche.

7

**Agenti biologici: classificazione**  
CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report. April 21, 2000 / Vol. 49 / N° RR-4

**Categoria A** In grado di compromettere la sicurezza nazionale.

- Facilmente diffusibili e trasmissibili per contagio inter-umano
- Causano elevata mortalità
- Disseminano il panico nella società
- Richiedono programmi di allerta specifici

**Categoria B** Moderatamente diffusibili, causa di bassa mortalità, richiedenti il potenziamento delle capacità diagnostiche e di sorveglianza attuali

**Categoria C** Patogeni emergenti di potenziale impiego futuro

Gli agenti biologici potenzialmente implicati in attacchi bioterroristici vengono distinti in tre categorie (Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality. Weekly Report. Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. 2000, 49:N° RR-4).

8

**Agenti di categoria A**

-  Virus del vaiolo
-  Bacillus anthracis
-  Yersinia pestis
-  Tossina botulinica
-  Francisella tularensis
-  Filovirus
-  Arenavirus

La massima allerta deve essere indirizzata a quegli agenti infettivi che possono ledere maggiormente la salute e la sicurezza della Nazione, come quelli particolarmente contagiosi o che si diffondono per via aerea. L'identificazione rapida di tali agenti infettivi richiede l'acquisizione di conoscenze specifiche da parte del personale sanitario e la disponibilità strutture, strumenti, e mezzi diagnostici utili alla identificazione degli agenti infettivi in condizioni di massima sicurezza.

9



Forma vegetativa → Spora

*Bacillus anthracis* causa il **CARBONCHIO** o **ANTRACE**

 Forma intestinale

 Forma cutanea

 Forma polmonare  
 Forma setticemica

*Bacillus anthracis* è un microrganismo patogeno franco, responsabile di tre forme cliniche: cutanea, intestinale e polmonare. La trasmissione della malattia avviene per via percutanea, ingestione e inalazione di spore.

*B. anthracis* è un batterio sporigeno aerobio Gram+, immobile, di 1-1.5 µm di larghezza per 3-5 µm di lunghezza. Le spore hanno diametro di circa 1 µm. La germinazione delle spore è favorita da un ambiente ricco di amminoacidi, nucleosidi e glucosio, quale quello tissutale. Viceversa, la sporulazione delle forme vegetative avviene in assenza di nutrienti, condizione che si verifica nell'ambiente esterno.

10

**La spora è resistente a:**

- > Assenza di nutrienti
- > Ebollizione
- > Essiccamento
- > Raggi ultravioletti
- > Alcool

↓

Nell'ambiente può resistere decenni

**La spora è sensibile a:**

- > Ipoclorito di sodio 0.5% (varechina 10%)
- > Formalina al 10-30% (formaldeide 4-12%)
- > Sterilizzazione in autoclave (121°C per 5-30 min)
- > Riscaldamento a secco (120-140°C per 3 ore)
- > Incenerimento

Mentre la forma vegetativa è scarsamente resistente nell'ambiente esterno, la spora può resistere per lunghissimo tempo.

Solo trattamenti chimici e fisici drastici sono in grado di distruggere le spore di *B. anthracis*.

Viceversa, la forma vegetativa del batterio è relativamente facile da distruggere.

11

**L'antrace è una zoonosi, trasmissibile all'uomo attraverso prodotti animali contaminati**

↓

**L'uomo è un ospite occasionale**

Il carbonchio è presente in Italia, anche se la malattia è estremamente rara. Si stima che ogni anno vengano diagnosticati da 5 a 10 casi di carbonchio cutaneo in soggetti professionalmente esposti come veterinari, allevatori o addetti del settore zootecnico.

La forma più comune dell'infezione "naturale" è il carbonchio cutaneo, che può essere contratto in seguito a contatto con il batterio durante la lavorazione di prodotti animali contaminati, come pelli o lane di animali infetti. La forma polmonare, più rara, può conseguire all'inalazione di spore presenti in prodotti animali contaminati come, tipicamente, la lana. Infine, il carbonchio gastrointestinale è dovuto al consumo di carne di animali infetti.

12

**Rilascio intenzionale**

Le spore possono venire rilasciate sotto forma di aerosol o frammiste a polveri

- > Le spore devono essere disperse in particelle di 1-5  $\mu\text{m}$
- > 10.000-30.000 spore = dose infettante il 50% degli esposti (forma polmonare)
- > Poche spore = dose infettante per la forma cutanea

L'uso bioterroristico di *B. anthracis* consiste nel rilascio di spore nell'ambiente, sotto forma di aerosol o frammiste a polveri. Le spore devono essere altamente disperse in particelle di 1-5  $\mu\text{m}$  per poter raggiungere gli alveoli polmonari. La dose che causa malattia polmonare è elevata ed è stimata essere di 10.000-30.000 spore. Il periodo di incubazione può variare da 1 giorno a 8 settimane.

13

**Antrace polmonare**  
**Manifestazioni sistemiche**

Polmoni e Cuore → 

 ← Cervello

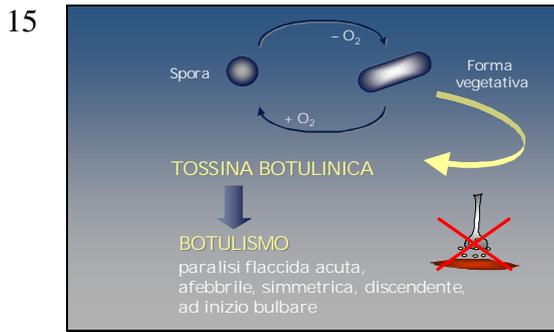
Forma polmonare: consegue alla inalazione di spore. La mortalità è estremamente elevata. La trasmissione da uomo a uomo non è riportata.

14

**Agenti di categoria A**

- Virus del vaiolo
- Bacillus anthracis*
- Yersinia pestis*
- Tossina botulinica
- Francisella tularensis*
- Filovirus
- Arenavirus

*Clostridium botulinum* è un batterio sporigeno, anaerobio obbligato, Gram+.  
La patogenicità di *C. botulinum* è legata alla produzione di una neurotossina: la tossina botulinica.



In assenza di ossigeno la spora di *C. botulinum* germina nella forma vegetativa. Solo quest'ultima produce la neurotossina, responsabile della malattia.

16

**TOSSINA BOTULINICA**

<b>Dose letale :</b>	Distrutta a $\geq 80^\circ\text{C}$ per 10'
Per via endovenosa o Intramuscolare 0.09 - 0.15 $\mu\text{g}$	Distrutta dalla clorazione dell'acqua (20' cloro residuo 0.2 mg/l)
Per via inalatoria 0.7 - 0.9 $\mu\text{g}$	Inattivata in acqua in 3-6 giorni
Per via orale 70 $\mu\text{g}$	Neutrazzata da NaOH per 15-20 minuti

( Botulinum Toxin as a Biological Weapon. JAMA. February 26, 2001 - Vol 285, No 8)

Solo specifiche procedure di sterilizzazione sono in grado di distruggere le spore di *C. botulinum*.  
La tossina è distrutta da trattamenti specifici.

17

**Botulismo**

<b>Intossicazione "naturale"</b>	<b>Rilascio intenzionale</b>
La tossina viene: Ingerita con cibo contaminato <b>Botulismo alimentare</b>	La tossina può essere rilasciata: Sotto forma di aerosol → <b>Inalata</b>
Prodotta a livello di ferite infette <b>Botulismo da ferita</b>	Mediante cibo contaminato → <b>Ingerita</b>
Prodotta nel tratto gastrointestinale <b>Botulismo infantile</b>	

Il botulismo è una paralisi flaccida acuta, afebrile, simmetrica, discendente, ad inizio bulbare. La velocità di progressione e la gravità di tale paralisi dipendono dalla quantità di tossina che entra in circolo. La morte sopraggiunge per paralisi dei muscoli respiratori.

18

**Agenti di categoria A**

- Virus del vaiolo
- Bacillus anthracis*
- Yersinia pestis*
- Tossina botulinica
- Francisella tularensis*
- Filovirus
- Arenavirus

*Yersinia pestis* è un cocco-bacillo aerobio-anaerobio facoltativo, Gram-, immobile, asporigeno, di dimensioni di 0.5  $\mu\text{m}$  per 1  $\mu\text{m}$ .

19



E' un batterio scarsamente resistente a diverse condizioni ambientali e relativamente sensibile a vari agenti chimici e fisici.

Le infezioni da *Yersinia* sono zoonosi, l'uomo è un ospite accidentale. La trasmissione della malattia avviene tramite il morso di pulce infettata da roditori infetti, contagio diretto e per inalazione.

20



Il rilascio intenzionale di *Y. pestis* comporterebbe la diffusione del batterio tramite aerosolizzazione. Ne deriverebbe un'epidemia di peste polmonare, rapidamente mortale, i cui sintomi iniziali, manifesti dopo 1-6 giorni dall'esposizione, sono simili a quelli di altre gravi patologie respiratorie. L'estensione dell'epidemia dipenderebbe dalla carica batterica impiegata, dal ceppo usato, dalle condizioni ambientali e dai metodi di aerosolizzazione. Il verificarsi di casi di peste polmonare in zone non enzootiche, in assenza di fattori di rischio noti, e la mancata evidenza di morte di roditori infetti dovrebbero indurre il sospetto di attacco bioterroristico con *Y. pestis*.

21



I laboratori microbiologici vengono classificati in base a) ai microrganismi che vi si manipolano, b) alle modalità operative che vi si attuano, c) alle barriere "primarie" e "secondarie" presenti, d) all'equipaggiamento personale di sicurezza utilizzato.

22



La classificazione prevede 4 livelli di biosicurezza: BSL 1 – a basso livello di biosicurezza BSL 2 – laboratori utili per la manipolazione di patogeni trasmissibili per via alimentare, percutanea, o per contatto. Tali laboratori sono utilizzabili solo per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di agenti biologici di bioterrorismo e per l'esclusione della presenza di tali agenti in un determinato campione biologico

23

**BSL3** Microorganismi Patogeni, trasmissibili per aerosol, causanti malattie gravi o letali

Attività  BSL2 + accesso controllato, decontaminazione dei rifiuti, controllo sanitario del personale

Barriere primarie  Dispositivi personali di sicurezza mascherine FFP-S3 etc, cappe di classe II o III.

Barriere secondarie  BSL2 + pressione negativa, eliminazione dell'aria dopo filtrazione HEPA, doppia porta a chiusura automatica, separazione fisica dal corridoio di accesso principale.

BSL 3 – laboratori ad elevata capacità di diagnosi rapida ed ad elevato rischio biologico, utili alla manipolazione di patogeni trasmissibili per aerosol, agenti eziologici di malattie gravi o letali, come alcuni agenti di bioterrorismo (ad es. *Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*)

24

**BSL4** Microorganismi Letali, trasmissibili per aerosol o per modalità sconosciute

Attività  BSL3 + accesso con respiratori a pressione positiva, doccia all'uscita e decontaminazione di tutti i materiali

Barriere primarie  Dispositivi personali di sicurezza, cappe di classe III, respiratori a pressione positiva

Barriere secondarie BSL3 + edificio separato o zona isolata dal resto dell'edificio, strumentario completamente autonomo.

BSL 4 – Laboratori in cui si manipolano specifici microrganismi letali, trasmissibili per aerosol o per modalità sconosciute (Ad es. virus delle febbri emorragiche, virus del vaiolo).

25

Decreto legislativo n° 626 del 19-09-1994

Specifiche sulle misure di contenimento e sui livelli di contenimento



In Italia la classificazione dei laboratori in base ai livelli di contenimento è codificata dalla legge 626.

26

**Febbri emorragiche virali**

Malattie letali associate a specifici virus caratterizzate da febbre, shock ed emorragia




Per febbre emorragica virale si intende una malattia associata a specifici virus, caratterizzata da febbre, shock ed emorragia. Gli agenti eziologici delle febbri emorragiche virali, come i virus della febbre di Lassa, Marburg, Ebola, e Crimea-Congo, possono causare gravi epidemie umane, a causa di una facile trasmissibilità per contagio interumano.

27

**Virus delle febbri emorragiche**

Virus	EBOLA	MARBURG	LASSA	JUNIN
Famiglia	Filo	Filo	Arena	Arena
Vettore	?	?	Roditori	Roditori
Distribuzione geografica	Africa (Ovest)	Africa (Ovest)	Africa (Ovest)	America (Sud)
Incubazione	2-21	3-9	7-21	7-16

I virus responsabili delle febbri emorragiche sono endemici in aree geografiche definite

28

I virus delle febbri emorragiche si trasmettono per:

- Contagio interumano (contatto con secrezioni infette)
- Aerosol
- Vettori
- Oggetti contaminati

In generale sono virus scarsamente resistenti

Sono inattivati da:

- Ipoclorito di sodio 0.5% (varechina 10%)
- Glutaraldeide 2%
- Disinfettanti fenolici 0.5-3%
- Saponi e detergenti

Le modalità di trasmissione dei virus delle febbri emorragiche sono molteplici. Tali virus sono sensibili a vari agenti chimici e scarsamente resistenti nell'ambiente.

29



Per la "manipolazione" del virus delle febbri emorragiche sono necessarie strutture complesse e altamente specializzate: Laboratori di livello di biosicurezza 4

I virus delle febbri emorragiche sono manipolabili solo in laboratori altamente specializzati, provvisti di speciali strutture e sistemi di sicurezza, come i laboratori di livello 4, strutturati per lavorare con agenti ad elevato rischio biologico, potenzialmente letali, che si trasmettono per aerosol o con modalità ignote e che richiedono personale con addestramento specifico.

30

Tra gli agenti biologici di classe A i virus sono quelli di più complessa produzione e impiego

- Disponibile
- Facile da produrre
  - **Letale o invalidante**
- Facile da aerosolizzare
- Facile da disseminare
- Stabile dopo la produzione
  - **Sicuramente patogeno**

Pertanto, un attacco di bioterrorismo con virus delle febbri emorragiche, nonostante la loro elevata letalità, è difficilmente ipotizzabile.

31



Virus del vaiolo



Il virus del vaiolo infetta solo l'uomo e si trasmette per:

- Via respiratoria !!!
- Contagio interumano !!! (contatto con secrezioni infette)
- Contagio indiretto (contatto con biancheria, vestiti o altro materiale)

Il virus del vaiolo resiste...

- Nell'ambiente per meno di 2 giorni, se non esposto ai raggi UV
- Per circa 24 ore a 10-11°C, umidità relativa 20%
- Per molto tempo nelle secrezioni e croste infette:
  - 3 settimane a 35°C, umidità relativa 65%
  - 8 settimane a 26°C, umidità relativa 65%
  - 12 settimane con umidità relativa < 10%

Il vaiolo, caratterizzato da un tipico rash cutaneo maculo-papulare, si verifica in seguito alla penetrazione del virus del vaiolo a livello della mucosa orofaringea o respiratoria, cui seguono una fase viremica primaria asintomatica, la moltiplicazione del virus a livello di milza, linfonodi e midollo osseo e, infine, una fase viremica secondaria, seguita da febbre e grave tossiemia.

In seguito alla campagna vaccinale mondiale il vaiolo è stato debellato e l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha dichiarato il mondo libero dal vaiolo nel 1980. Da tale data la vaccinazione antivaiolosa è indicata solo per il personale che lavora abitualmente con il virus del vaiolo o virus ad esso correlati (virus vaccino, monkeypox).

Il virus del vaiolo si trasmette da persona a persona per contagio diretto o per inalazione di goccioline di Flugge infette. Data la resistenza del virus nell'ambiente, è possibile anche un contagio indiretto attraverso biancheria, vestiti o altro materiale contaminato. Non sono descritti reservoir animali o

insetti vettori.

Tale virus, a differenza di quelli delle febbri emorragiche, è relativamente resistente. Infatti, è stabile se liofilizzato, congelato o semplicemente conservato in glicerina. Nelle croste delle lesioni il virus può persistere a lungo. La dose infettante è a tutt'oggi sconosciuta, ma si ritiene essere di pochi virioni.

32

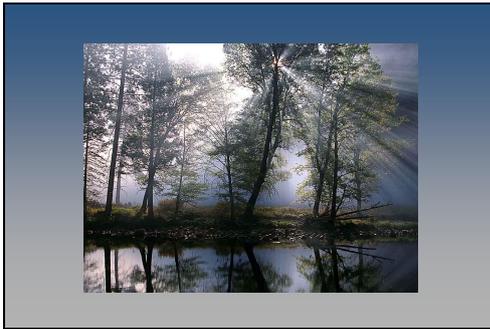
➤WHO - 1980 - Dichiarazione della definitiva scomparsa del vaiolo dal mondo  
➤Sospensione della vaccinazione  
➤Bassa carica infettante (pochi virioni)  
➤Relativa stabilità del virus

↓

"Il rilascio intenzionale di virus del vaiolo rappresenterebbe un crimine internazionale di proporzioni inimmaginabili"  
(JAMA, 1999, 281, N° 22)

Il rilascio intenzionale di virus del vaiolo a scopo terroristico rappresenterebbe un crimine internazionale di proporzioni inimmaginabili. Il rilascio di virus sotto forma di aerosol sarebbe seguito da una disseminazione molto ampia, in quanto tale virus è relativamente stabile in aerosol e la dose infettante è molto bassa.

33



*Conclusioni* - Per affrontare con efficacia ed efficienza l'eventualità di un attacco di bioterrorismo si rende prioritaria ed imperativa la disponibilità di un piano strategico di emergenza preordinato, in cui i mezzi di comunicazione ed intervento, le strutture appositamente progettate e gli strumenti idonei per l'identificazione e caratterizzazione degli agenti infettivi si fondono in un perfetto incastro.

L'identificazione rapida di agenti impiegati a scopo bioterroristico inoltre richiede non solo l'acquisizione di conoscenze specifiche da parte del personale sanitario di base, ma anche:

- 1) il miglioramento dei sistemi di comunicazione tra tale personale e gli organismi ufficiali, sanitari e non,
- 2) la disponibilità per i laboratori di tutte le strutture, gli strumenti ed i mezzi utili alla identificazione degli agenti infettivi in condizioni di massima sicurezza,
- 3) la possibilità di espandere la ricerca ad eventi non comuni o a malattie non spiegabili, ed in particolare a test diagnostici, farmaci e vaccini eventualmente impiegabili.

Per tali ragioni il ruolo delle strutture universitarie, classicamente deputate alla promozione culturale e alla ricerca scientifica, è insostituibile. Il loro impegno a collaborare con tutti gli organismi coinvolti nella prevenzione dei danni di un eventuale attacco bioterroristico appare doveroso.