

11Marzo

Biosensing e genosensori nel monitoraggio pandemico

*Quando non sai che cosa stai facendo,
fallo con la massima precisione.*

Arthur Bloch,

Seconda legge del laboratorio, La legge di Murphy

Milan Kundera sostiene che la velocità è la forma di estasi che la rivoluzione tecnologica ha regalato all'uomo. Che la diagnostica di laboratorio sembra anteporre la velocità nell'analisi piuttosto che alla precisione. La ricerca è costantemente alla definizione di test rapidi, sempre più rapidi.

La reazione a catena della polimerasi a trascrittasi inversa (RT-PCR) è il gold standard per la diagnosi di COVID-19, come raccomandato dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e dall'American Center for Disease Control (CDC). Nonostante l'elevata sensibilità di questo metodo, i rapporti che studiano la valutazione dei metodi diagnostici COVID-19 hanno rilevato che questi test possono essere suscettibili a tassi di falsi negativi a causa di materiale genetico virale insufficiente nel campione, nonché di errori di laboratorio e di trasporto, ma in particolare per la velocità nel ricavare un risultato. Una mancanza di precisione può essere pericolosa quando il margine di errore è piccolo.

L'impressione è che anche nella diagnostica prevalga il principio dell'efficienza scandinava di Percy Barnevik "Ho privilegiato la velocità alla precisione, perché il costo di un ritardo supera di gran lunga quello di un errore

La sensibilità superiore e il limite di rilevamento (LOD) di una piattaforma diagnostica dipendono dalla **dose infettiva e dalla carica virale minima** del virus SARS-CoV-2.

La **dose infettiva** di un virus è il numero di particelle virali che sono sufficienti per infettare il 50% di una data popolazione e la **carica virale** è il numero di particelle virali in un individuo infetto

Per SARS-CoV-2, la **dose infettiva è sconosciuta** e la carica virale è stocasticamente avariabile, ne consegue che, la definizione del limite di rilevamento minimo per la piattaforma diagnostica è quanto meno impegnativa. E' proprio vero che un po' di imprecisione talvolta risparmia tonnellate di spiegazioni (Saki)

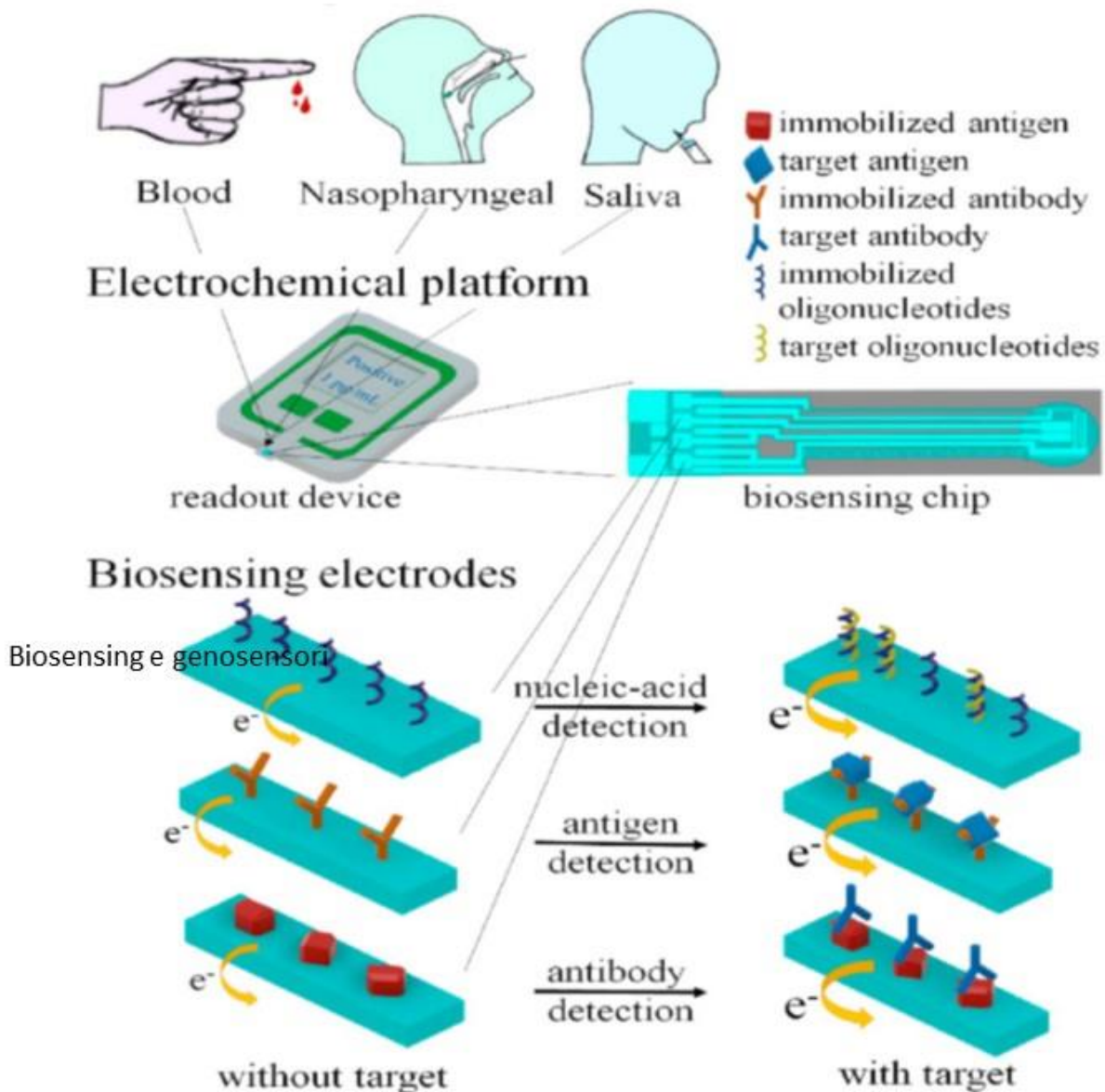
Diventa sempre più evidente la necessità di poter disporre di test rapidi ma precisi economici e portatili che siano facili da usare su larga scala come alternativa ai metodi di rilevamento dei patogeni convenzionali.

Una risposta tecnologica è offerta dalla tecnologia biosensing che propone soluzioni laboratoristiche diagnostiche innovative e di precisione.

Quello che segue è un "trailer" dei biosensori che potrebbero essere di un enorme aiuto nella gestione del Covid-19 ma in particolare nel monitoraggio dello sviluppo nelle varie fasi dello sviluppo e dell'utilizzo di un vaccino.

....

Biosensori & Genosensori



Biosensori elettrochimici per la diagnostica dei patogeni
Rilevamento di RNA / DNA per i coronavirus. I genosensori
Rilevazione di anticorpi e antigeni per i coronavirus
Rilevazione di virus mediante anticorpi
Rilevazione di anticorpi utilizzando antigeni / proteine

Per informazioni generali: vedi testo

Per informazioni dettagliate: gianfrancotajana@mail.com)

Biosensori elettrochimici per la diagnostica dei patogeni

I (bio) sensori elettrochimici sono diventati uno strumento ideale per la rilevazione diretta di biomarcatori correlati, ad esempio, a patogeni in campioni umani. In particolare SARS-CoV-2 può essere rilevato in diversi modi: analisi del menoma virale, attraverso gli antigeni virali, o mediante test sierologico degli anticorpi. Durante la pandemia, la conoscenza del virus è cresciuta in modo esponenziale, in particolare disegnando somiglianze tra il nuovo SARS-CoV-2 e virus fisicamente e geneticamente simili, come SARS-CoV, MERS-CoV o influenza. Ad esempio, uno dei meccanismi di ingresso di SARS-CoV-2 è stato determinato dalla ricerca esistente su SARS-CoV. Questa pratica può essere ulteriormente impiegata per i meccanismi di rilevamento. Studiando piattaforme consolidate in grado di rilevare virus ben studiati, è possibile progettare metodi più efficienti per rilevare SARS-CoV-2.

Rilevamento di RNA / DNA per i coronavirus. I genosensori

I sensori elettrochimici basati su acidi nucleici (genosensori) utilizzano costrutti oligonucleotidici sintetici come elementi di riconoscimento, con sequenze specifiche complementari al DNA o RNA bersaglio. Approcci elettrochimici, per la rilevazione degli acidi nucleici SARS-CoV, utilizzano sonde complementari a una porzione del genoma bersaglio, che vengono immobilizzati sulla superficie di un elettrodo. I genosensori elettrochimici disponibili in commercio sono principalmente una combinazione di PCR con sistemi microfluidici, come la piattaforma ePlex di GenMark Diagnostics, in grado di rilevare una varietà di patogeni respiratori, incluso il coronavirus umano, in modalità multiplex in un unico test. Questa piattaforma prevede fasi di dispensazione del campione, estrazione di acido nucleico, amplificazione e rilevamento con un sistema di trasporto fluidico automatizzato. Durante il test PCR, vengono generati ampliconi target a filamento singolo. Questi ampliconi sono parzialmente ibridati a sonde di segnale coniugate con ferrocene e in parte alle loro sonde di cattura complementari, precedentemente immobilizzate sulla superficie dell'elettrodo d'oro. Come risultato dell'ibridazione, la frazione redox del ferrocene genera un segnale quando è sottoposta a un potenziale ea contatto con la superficie dell'elettrodo. Più recentemente, è stata segnalata la rilevazione elettrochimica di materiali genetici SARS-CoV-2 utilizzando lo smartphone come trasduttore di segnale portatile.

Rilevazione di anticorpi e antigeni per i coronavirus

Oltre al materiale genetico, le proteine virali e gli anticorpi possono fungere da biomarcatori specifici per la malattia. Le strategie di riconoscimento per la rilevazione di queste molecole sono molto diverse rispetto alle molecole di DNA / RNA. Includono non solo sonde di riconoscimento basate su acidi nucleici, come proteine leganti gli aptameri, ma anche anticorpi, proteine e loro derivati peptidici. In questo caso, l'affinità di legame proteina bersaglio e la specificità della reazione sono i principali obiettivi quando si tratta di rilevamento di target nei media complessi. Simili ai genosensori, questi sensori utilizzano un trasduttore di segnale elettrico per quantificare una variazione proporzionale alla concentrazione indotta da una reazione chimica, in particolare una reazione immunochimica.

Rilevazione di virus mediante anticorpi

La rilevazione diretta di agenti patogeni tramite biosensori elettrochimici utilizzando anticorpi virali come elemento di riconoscimento è un potenziale candidato per affrontare le sfide dei metodi attuali. Come con i sensori a base di acido nucleico, tali piattaforme devono raggiungere sensibilità paragonabili ai test RT-PCR.

Rilevazione di anticorpi utilizzando antigeni / proteine

I test sierologici funzionano attraverso la rilevazione di anticorpi nei fluidi corporei, in particolare il sangue, e attraverso una finestra diagnostica più ampia possono essere utilizzati per rilevare infezioni passate e presenti, anche in individui asintomatici.. La capacità di rilevare gli anticorpi contro i virus in individui asintomatici e guariti è fondamentale per un'epidemiologia accurata, la comprensione dell'immunità di gregge e la determinazione delle tendenze di trasmissione e della prevalenza . I test sierologici sono stati utilizzati durante l'epidemia di SARS originale, l'epidemia di MERS, e sono attualmente in fase di studio per la pandemia di SARS-CoV-2. Le due proteine globuline coinvolte nella risposta immunitaria a questi virus sono gli anticorpi IgM e IgG. Dopo l'infezione da SARS, l'anticorpo IgM può essere rilevato entro 3-6 giorni e l'anticorpo IgG può essere rilevato nel sangue dei pazienti dopo 8 giorni . Studi precedenti sulla rilevazione elettrochimica di virus simili hanno dimostrato l'uso di proteine virali, tra cui la glicoproteina di superficie spike (S) e la proteina nucleocapsidica (N), come elementi di riconoscimento degli anticorpi virali. Gli anticorpi sono stati rilevati a diluizioni di siero da 1×10^8 a 1×10^9 volte, che è circa 10^7 volte più sensibile rispetto ai test ELISA standard . Nonostante l'elevata sensibilità, il successo di questi test si basa sulla risposta immunitaria al virus, non sul virus stesso. Di conseguenza, questi test svolgerebbero in gran parte un ruolo supplementare nella diagnostica. Le attuali piattaforme per i test sierologici di SARS-CoV-2 hanno illustrato l'uso dell'ELISA convenzionale saggio immunologico a flusso laterale (LFA) o tecniche di immunodosaggio (elettro) chemiluminescente. Queste piattaforme utilizzano le proteine S o N come elementi di riconoscimento degli anticorpi virali. Ad esempio, ha presentato una piattaforma LFA con nanoparticelle d'oro e proteine S ricombinanti per rilevare sia anti-SARS-CoV-2-IgM che anti-SARS-CoV-2-IgG con una sensibilità dell'88,66% e una specificità del 90,63%. Tuttavia, attualmente, nessuna di queste piattaforme ha impiegato l'uso di biosensori elettrochimici con strategie di lettura elettrochimica per la rilevazione degli anticorpi SARS-CoV-2.