

9. Febbraio

Possibile non significa probabile, significa solo che non è impossibile

La realtà è solo una delle realizzazioni del possibile.
Anonimo

Le nostre menti sono *finite*, e nonostante queste condizioni di finitezza siamo circondati da possibilità che sono *infinite* e lo scopo della ricerca è cogliere il *più possibile* da questa *infinità* anche se possono sembrarci apparentemente *impossibili*. Solo se si è pronti a considerare *possibile l'impossibile* si è in grado di creare *qualcosa di nuovo* ad esempio diagnosticare *oltre i "tamponi"*

Tamponi rapidi e molecolari

La diagnosi di COVID-19 si basa sul rilevamento diretto nei campioni dei pazienti del suo agente eziologico noto come SARS-COV-2. I saggi PCR real-time di trascrizione inversa eseguiti su tamponi naso-faringei sono, ad oggi, il gold standard per la diagnosi. Un'ottima rassegna delle metodiche diagnostiche è nel report dell'Istituto di Biomateriali e Ingegneria Biomedica, Università di Toronto, (Udugama B 2020)

Dal 2020 al 2021 in Europa sono stati eseguiti **360 milioni di test molecolari** che richiedono personale specializzato, sono costosi e richiedono tempo, tutte caratteristiche in conflitto con la necessità di un pronto soccorso di isolare tempestivamente i pazienti COVID-19.

www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-testing.

Test rapidi alternativi basati sulla rilevazione di proteine virali (antigeni) sono stati rapidamente sviluppati da diverse aziende al fine di offrire una rilevazione più rapida ed economica dell'infezione da SARS-COV-2. Questi test sono attualmente in uso in diversi paesi ed il loro utilizzo si sta progressivamente diffondendo come autodiagnosi.

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/preparedness_response/docs/covid-19_rat_common-list_en.pdf

Nella sezione News c'è il report scritto all'inizio della *Cosa significa veramente scoprire di essere sars-cov-2 "positivo"* in cui manifestavo le mie perplessità sulla PCR, ovviamente non sulla metodica, ma sui possibili bias legati alle modalità di prelievo e di conservazione e sul proliferare delle aziende produttrici dei reagenti da utilizzare. Tuttavia, come ho più volte ricordato (vedi badeker) che i test rapidi per gli antigeni sono generalmente meno sensibili dei test molecolari essendo affidabili solo ad elevate cariche virali. Inoltre la variabilità delle prestazioni dei diversi test prodotti da diverse aziende è molto elevata.

Marco Ciotti del *Department of Laboratory Medicine, Virology Unit, Tor Vergata* ha valutato le prestazioni di un test antigenico rapido rispetto a una PCR qualitativa in tempo reale come gold standard. Cinquanta tamponi nasofaringei da casi sospetti di infezione da SARS-CoV-2 sono stati testati mediante il test **Ag Respi-Strip 2019*** della malattia da coronavirus Coris e il test **Allplex 2019n-CoV***.

Dei **50** tamponi nasofaringei testati

11 sono risultati **negativi** a entrambi i test * *

27 erano **negativi** al test Ag*, ma **positivi** alla PCR in tempo reale*

12 erano **positivi** con entrambi i metodi * *

La PCR ha rilevato i **39 campioni positivi** a un valore di soglia del ciclo mediano (Ct) di **22,78** (media: 24,51; intervallo: 13,59–39,6).

Nei **12** campioni concordanti, il valore *Ct mediano* era **17,37**.

La sensibilità del test Ag era **30,77%**

(intervallo di confidenza 95% [CI]: 17,02%–47,57%),

specificità **100%**

(IC 95%: 71,51%–100,00%),

valore predittivo **positivo 100%**,

valore predittivo negativo **85,25 %**

(IC 95%: 82,42%–87,69%)

accuratezza **86,15%**

(IC 95%: 73,45%–94,28%).

Il livello di accordo tra i due test era scarso, $k = 0,164$.

La conclusione è che **test antigenico** si comporta bene in presenza di **cariche virali elevate**. La scarsa sensibilità dei **test Ag** è ben nota ed è legata al suo disegno tecnico. A differenza della **PCR**, i **test Ag** non amplificano il loro segnale, quindi è possibile perdere una bassa quantità di proteina bersaglio. Per questo motivo, l'OMS raccomanda test antigenici rapidi che hanno una sensibilità **≥80%** e una specificità **≥97%**, mentre l'ECDC suggerisce di utilizzare test con sensibilità **≥90%** e specificità **≥97%**, caratteristiche vicine a quelle di un test in tempo reale Saggio PCR. In assenza di Ag test con le prestazioni raccomandate dalle agenzie internazionali, si consiglia di non utilizzare l'Ag test come unico strumento di screening per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2. I casi negativi dovrebbero essere confermati dalla PCR in tempo reale che rimane il gold standard per la rilevazione di SARS-CoV-2.

Approcci alternativi all'attuale diagnostica potrebbero essere orientati piuttosto che al rilevamento diretto di SARS-COV-2 alla **individuazione degli effetti** che produce e che potrebbero evidenziare **marcatori affidabili** per monitorare il decorso della malattia e utili per sviluppare farmaci e vaccini .

Questo è appunto l'approccio della **metabolomica** che analizza lo studio sistematico delle impronte chimiche, il **metaboloma**, le "tracce " che taluni processi lasciano nell'organismo (Wishart A .2016)

E' una scienza "omica" emergente che prevede la caratterizzazione completa dei metaboliti e del loro metabolismo nei sistemi biologici. E' già utilizzata in clinica, nello **screening neonatale**, e sta chiarendo **processi metabolici complessi** ed evidenziando **biomarcatori** per diverse malattie importanti come il **diabete**, il **morbo di Alzheimer**, l'**aterosclerosi** e il **cancro**. Questi risultati stanno evidenziando **bersagli terapeutici** precedentemente insospettati e suggerisce nuove potenziali strategie terapeutiche. La **metabolomica** svolge un "ruolo centrale" nella **medicina di precisione** attraverso lo sviluppo di una **fenotipizzazione personalizzata** e il **monitoraggio individualizzato della risposta ai farmaci**. (Hishart 2016)

L'analisi del **respiro** è un campo di ricerca giovane che affonda le sue radici nell'antichità. **Antoine Lavoisier** scoprì l'**anidride carbonica** nel respiro esalato durante il periodo 1777-1783, **Wilhelm Petters** scoprì l'**acetone** nel respiro nel 1857 e **Johannes Müller** ne riferì le prime misurazioni quantitative nel 1898.

Nel secolo scorso, quando ero studente del primo anno di medicina ero affascinato dai racconti mitologici a proposito del grande **Antonio Cardarelli** che una tradizione aneddotica narrava che fosse capace di fare diagnosi entrando nella stanza, senza vedere il paziente , semplicemente dalle **esalazioni** emesse dal "povero sventurato".

Attualmente tra i metaboliti indagati, quelli al centro dell'interesse sono i **VOC** piccole *molecole volatili o semi volatili*, che si trovano in fase gassosa. Questa frazione del *metaboloma o volatoloma* è costituita da molecole diverse, che rappresentano un'ampia *eterogeneità chimica*, sono presenti in diversi campioni umani.

Anton Amman della *Facoltà di Medicina di Innsbruck* in una revisione riportava **1765** composti volatili che apparivano nel respiro esalato, ma anche da *emanazioni cutanee, urina, saliva, latte materno umano, sangue e feci*. I *composti volatili* nel respiro esalato, che registrano cambiamenti nelle concentrazioni di composti organici volatili biogenici possono essere utilizzati per descrivere i *processi metabolici o (pato) fisiologici* o le concentrazioni ematiche di farmaci (ad es. propofol) in contesti clinici, anche durante la ventilazione artificiale o durante un intervento chirurgico (Amann A 2014)

Anche i composti rilasciati da ceppi batterici come *Pseudomonas aeruginosa* o *Streptococcus pneumonia* potrebbero essere molto interessanti. Il *metacrilato di metile* (CAS 80-62-6), ad esempio, è stato osservato nello "spazio testa collo" in corso di *polmonite da Streptococcus* in concentrazioni fino a **1420 ppb**.

Le *sostanze volatili fecali* sono state implicate nella differenziazione di alcune malattie infettive intestinali come *Clostridium difficile, Campylobacter, Salmonella* e *Colera*. Sono stati utilizzate anche per differenziare altre condizioni non infettive come la sindrome *dell'intestino irritabile e la malattia infiammatoria intestinale*. Inoltre, le alterazioni dei **VOC urinari** sono state utilizzate per rilevare infezioni del tratto *urinario, vescica, prostata* e diverse neoplasie.

La *perossidazione dei lipidi* e di altre biomolecole da parte di *specie reattive dell'ossigeno* produce composti volatili come *l'etano e l'1-pentano*. Il rilevamento non invasivo e il monitoraggio terapeutico dello *stress ossidativo* sarebbero alla base di altamente malattie autoimmunologiche, neurologiche, infiammatorie e nei tumori, ma anche durante gli interventi chirurgici e nelle unità di terapia intensiva. L'indagine sulle colture cellulari apre nuove possibilità per chiarire lo sfondo biochimico dei composti volatili.

È stato dimostrato che il *volatoloma* correla con una vasta gamma di fenomeni osservabili *in vitro*, anche a livello di singola cellula, e *in vivo*

Come strumento di monitoraggio, la *volatologica o breathomica* può essere applicata per definire l'eterogeneità osservata nelle malattie croniche, per studiare i patogeni responsabili delle infezioni che si verificano e per monitorare l'efficacia del trattamento. In particolare il **Dipartimento di Tossicologia, Università di Maastricht**, utilizza i **VOC** come biomarcatori di *stress ossidativo*, per lo studio *dell'infiammazione* e nella cancerogenesi sperimentale (Boots AW 2012)

Lo studio dei **VOC** nella volatologica dei fluidi corporei ha il suo centro di riferimento ad **Haifa** (Israele) ed in particolare nel *Technion-Israel Institute of Technology*, dove opera il team di **Yoav Broza** che applica approcci "ibridi" che combinano i profili **VOC** raccolti da due o più fluidi corporei. (Broza YY 2015, Serasanambati M 2018)

La *gascromatografia e gli spettrometri* di massa di ultima generazione sono le principali apparecchiature analitiche consentono un'indagine approfondita sulla composizione del volatoloma. Il team di **Corrado di Natale** del *Department of Electronic Engineering, University of Rome Tor Vergata*, ha messo a punto strumenti portatili e facili da usare basati su array di sensori sufficientemente sensibili e selettivi per identificare malattie analizzando vari campioni umani come respiro, urina e sudore (Di Natale C 2014)

Poiché il COVID-19 colpisce principalmente l'apparato respiratorio il *respiro* è stato considerato dal **Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwer** il campione più "ovvio" e più semplice da analizzare per valutare la presenza ed il comportamento di Sars-cov-2 (Lamote K 2020)

La *spettrometria di massa a trasferimento protonico* è stata utilizzata per confrontare il respiro di pazienti con ventilazione meccanica COVID-19 e non COVID presso *Hôpital Foch, Exhalomics®*, *Département des maladies des voies respiratoires, Suresnes*, (Grassin-delyle 2021)

Un altro studio ha utilizzato uno *spettrometro di massa ionico per gascromatografia* per studiare il respiro di pazienti COVID e non COVID reclutati presso il pronto soccorso di due ospedali nel Regno Unito e in Germania Entrambi gli studi coordinati da **Dorota Ruszkiewicz** confermano che COVID-19 può essere identificato attraverso l'analisi del respiro. (Ruszkiewicz DM, 2020)

Come di solito accade in volotologica, questi studi evidenziano che non si tratta di analizzare un singolo composto che può essere univocamente correlato all'infezione da COVID ma piuttosto di un *pattern* di più composti volatili (*VOCs*).

Questi sono stati singolarmente individuati e tipizzati da due ospedali cinesi grazie ad una di serie di *sensori nanostrutturati* utilizzati per analizzare il respiro dei soggetti . I risultati di questo studio mostrano che è così possibile differenziare COVID-19 rispetto a soggetti sani e soggetti affetti da differenti patologie polmonari. (Shan B, 2020)

L'insieme di questi studi sul respiro, effettuati con diverse tecnologie confermano che la *volotologica* offre una possibile via alternativa per il rilevamento del COVID-19. D'altra parte, il respiro è anche il principale veicolo di propagazione del SARS-COV-2, quindi l'analisi del respiro solleva problemi di sicurezza per gli operatori sanitari e per le apparecchiature analitiche. Questa preoccupazione crea interesse per le proprietà diagnostiche di altri campioni umani (ad es. urina e siero) che sono accessibili per *studi volotomici*.

Il **siero** è particolarmente interessante. È stato riscontrato infatti che i profili *proteomici*, *metabolomici* e *lipidomici* del siero sono fortemente influenzati da COVID. Inoltre, i campioni di siero presentano il vantaggio di essere sempre disponibili poiché l'analisi del sangue è un'indagine di routine negli ospedali e nei reparti di emergenza.(Shi D 2021)

Tuttavia il *volotoma sierico ematico* non è studiato frequentemente. Nella maggior parte degli studi di metabolica, i *metaboliti target* non sono volatili e devono essere necessariamente *derivatizzati* per diventare volatili ed essere rilevati attraverso gli analizzatori di gas (Dunn WB 2011)

Il team del *Department of Electronic Engineering, di Tor Vergata* ha analizzato le relazioni tra COVID e volotologica sierica. Lo studio è stato condotto con uno *spettrometro di massa per gascromatografia (GC/MS)* e *un array di sensori di gas*. In questo lavoro sono stati analizzati i COV rilasciati direttamente dal siero di **97 pazienti** in pronto soccorso. La classificazione dei dati **GC/MS** e *dell'array di sensori* mostra che il COVID-19 può essere identificato con una precisione di circa il **90%**.(Mougang YK 2021)

Prima di questo studio, i COV sierici coinvolti nella discriminazione di COVID-19 erano sconosciuti; inoltre questo studio mette in evidenza le proprietà diagnostiche del **siero** suggerendo che può essere considerato come una valida alternativa al respiro in diverse situazioni pratiche in cui

l'analisi del respiro può non essere praticabile ad esempio per mancanza di preparazione dei pazienti o per motivi di sicurezza .

Osservazione finale: è importante considerare che una *piena comprensione* della relazione tra COVID-19 e VOC sia nell'aria che nel siero, non è ancora disponibile. Sarà nell'immediato futuro particolarmente importante studiare l'unicità della relazione tra i modelli VOC e COVID-19 al fine di migliorare le previsioni del metodo basato sulla *volatolomica* verso l'obiettivo ottimale: trasformare il **90%** in **100%** di sensibilità e specificità.

Riferimenti:

- Ciotti M et al. Performance of a rapid antigen test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol.* 2021 May;93(5):2988-2991.
- Udugama B et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020 Apr 28;14(4):3822-3835.
- Boots AW et al. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *J Breath Res.* 2012 Jun;6(2):027108.
- Broza YY et al. Hybrid volatolomics and disease detection. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015 Sep 14;54(38):11036-48.
- Serasanambati M et al. Profiling Single Cancer Cells with Volatolomics Approach. *iScience.* 2019 Jan 25;11:178-188.
- Amann A et al. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res.* 2014 Sep;8(3):034001.
- Grassin-Delye S et al. Garches COVID-19 Collaborative Group RECORDS Collaborators and Exhalomics® Collaborators. Metabolomics of exhaled breath in critically ill COVID-19 patients: A pilot study. *EBioMedicine.* 2021 Jan;63:103154.
- Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jul;15(7):473-84.
- Amann A et al. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res.* 2014 Sep;8(3):034001.
- Di Natale C et al. Solid-state gas sensors for breath analysis: a review. *Anal Chim Acta.* 2014 May 8;824:1-17.
- Lamote K et al. The scent of COVID-19: viral (semi-)volatiles as fast diagnostic biomarkers? *J Breath Res.* 2020 Jul 21;14(4):042001.
- Ruszkiewicz DM et al. Diagnosis of COVID-19 by analysis of breath with gas chromatography-ion mobility spectrometry - a feasibility study. *EClinicalMedicine.* 2020 Dec;29:100609.
- Shan B et al. Multiplexed Nanomaterial-Based Sensor Array for Detection of COVID-19 in Exhaled Breath. *ACS Nano.* 2020 Sep 22;14(9):12125-12132.
- Shi D et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism.* 2021 May;118:154739
- Dunn WB et al. Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011 Jun 30;6(7):1060-83.
- Mougang YK et al. Sensor array and gas chromatographic detection of the blood serum volatolomic signature of COVID-19. *iScience.* 2021 Aug 20;24(8):102851.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 9 febbraio 2021

Convivere con le varianti

...La maggior parte delle varianti che vengono ormai quotidianamente segnalate non destano preoccupazione fino a quando non presentano una mutazione o una delezione in almeno uno degli amminoacidi di una proteina virale presente in una porzione del virus che potrebbe condizionare il modo in cui interagisce con il suo ospite, ad esempio una mutazione nell'ambito della proteina spike. Il Covid-19 Genomics UK Consortium in una recente indagine sulle mutazioni riscontrate in 126.219 genomi da campioni positivi, ha identificato 1.777 diverse mutazioni con sostituzione di aminoacidi nel gene della proteina spike. I tre principali vaccini attualmente in somministrazione producono anticorpi contro molte regioni della proteina spike. È come abbiamo visto nelle sezioni precedenti che una singola mutazione nella proteina spike, non dovrebbe interferire con l'azione di un anticorpo neutralizzante indotto dalla vaccinazione...

...La New and Emerging Respiratory Virus Threats Advisory Group (Nervtag) l'agenzia che valuta nel dettaglio le varianti ritiene che quella inglese sia certamente più trasmissibile delle altre come suggerito dall'analisi genomica con un trend di crescita di circa il 70% più rapido. Inoltre, ha definito una correlazione tra un valore R più alto e il rilevamento della nuova variante nei campioni di prova. (Il valore R è il numero di persone a cui ogni persona lo trasmette, Più è alto, più ampiamente si diffonde.) Intrigante è l'osservazione che le varianti compaiono e crescano esponenzialmente durante un periodo in cui sono in vigore misure anti-epidemia, quasi come se la variante possa essere considerata come una contro-reazione

virale. È possibile tuttavia che ci siano altre spiegazioni per questa rapida diffusione, ma l'idea che questa variante sia più trasmissibile è plausibile e sembra sempre più probabile. Gli studi attualmente in corso daranno una risposta definitiva. Queste riflessioni ci suggeriscono come i nostri sforzi per prevenire la diffusione della pandemia (igiene , distanziamento, mascherine e presidi di protezione individuali) vanno mantenuti e rispettati...

...L'identificazione delle mutazioni è un processo complicato che prevede la costruzione di modelli per valutare le modifiche alla struttura e alla funzione virale per una data mutazione. Tuttavia la modellizzazione non è di per sé dirimente e deve sempre essere confermata dall'evidenza clinica. Per ora, il modo migliore per sospettare e identificare eventuali varianti è il monitoraggio del tasso di diffusione del virus, definire la gravità della malattia e accertare se il virus è stato in grado di eludere l'immunità generata da una precedente infezione o da una recente vaccinazione. La proliferazione delle varianti dimostra quanto sia indispensabile il sequenziamento del genoma, e sottolinea il fatto che è solo quando questi dati sono collegati a informazioni epidemiologiche e cliniche puntuali possono fare la differenza nel controllo della malattia.

(vai al testo integrale)