PROGRAMMA FORMATIVO

TITOLO: **Validazione analitica di un sistema automatico per la diagnostica di Coronavirus mediante breath test**

La spettroscopia NIR (Near Infra-Red, ossia vicino infrarosso) è una tecnica in grado di identificare specie chimiche in base alla loro interazione con la radiazione elettromagnetica di lunghezza d’onda compresa tipicamente fra 780 e 2.500 nm. A seconda dello stato fisico del materiale campione, la risposta spettrale può essere misurata utilizzando misure di riflettanza (solidi) o di assorbanza (liquidi e gas). Le “firme spettrali” (dette anche “impronte digitali”) nella spettroscopia NIR sono caratterizzate in particolare dalla presenza di legami idrogeno quali O-H, C-H, N-H ed S-H, quindi la spettroscopia in tale banda è adatta alla diagnostica in ambito sanitario, nonché per il controllo di qualità della produzione farmaceutica. In campo clinico, specificatamente, la spettroscopia NIR permette di eseguire analisi in tempi ridotti, con grande precisione, accuratezza, rapidità e semplicità su campioni biologici solidi, liquidi o gassosi, per la determinazione di proteine, lipidi, glucidi e acidi nucleici. Le caratteristiche di rapidità e sensibilità della spettroscopia NIR la rendono adatta all’analisi di campioni e in particolare allo sviluppo di test “sul campo” del respiro (i cosidetti “breath test”). Si pensi ad esempio che questo tipo di test viene diffusamente utilizzato per la rilevazione “sul campo” del tasso alcolemico [1].

**Razionale dell’attività di ricerca**

Anche in ambito clinico i breath test sono ampiamente applicati alla diagnosi di diverse patologie, fra cui l’infezione gastrica da H. pylori e alcune intolleranze alimentari. È stata dimostrata anche la possibilità di diagnosticare patologie dovute a virus respiratori, come ad esempio i virus influenzali [2]. Recentemente, il breath test è stato proposto anche per la diagnosi del tumore al polmone, grazie alla possibilità di rilevare nell’espirato di pazienti oncologici frammenti di RNA qualitativamente e quantitativamente distinguibili rispetto a soggetti sani [3]. La spettroscopia NIR è sempre più applicata all’analisi e alla caratterizzazione di acidi nucleici, e approfonditi studi sia sperimentali che teorici hanno resto disponibili precisi riferimenti spettrali per l’identificazione di RNA da dati spettrali [4].

In base all’osservazione che in soggetti sani le quantità di RNA rilevabili nell’espirato sono estremamente ridotte supporta quindi l’ipotesi che in caso di infezione da SARS-CoV-2, che è un virus a RNA, la ricerca di RNA tramite breath test può rivelarsi un metodo sensibile e selettivo per la rilevazione della positività al virus.

**Attività**

1. Saranno innanzitutto definite le condizioni sperimentali e strumentali per l’acquisizione degli spettri NIR, con l’obiettivo di massimizzare la rilevabilità delle specie di interesse e di conseguenza l’affidabilità statistica del dato analitico. Mediante applicazione su CAMPIONI STANDARD che simulino la composizione dell’espirato e dell’RNA virale saranno prese in considerazione e ottimizzate le seguenti variabili:

* Intervallo operativo di lunghezze d’onda, che dovrà comprendere le regioni di massima significatività rispetto ai segnali caratteristici delle specie target selezionate.
* Procedura di raccolta del campione, con particolare riferimento ai tempi di campionamento e alla possibilità di selezionare quali-quantitativamente nell’espirato la frazione di aerosol (le cosidette “droplet”) con la maggiore capacità di veicolare il virus rispetto alla componente gassosa (prevalentemente costituita da anidride carbonica e umidità) che potrebbe rendere meno rivelabili i segnali caratteristici dell’RNA virale.
* Condizioni operative strumentali, incluse ad esempio l’intensità della sorgente, la lunghezza del cammino ottico di assorbimento, la frequenza di acquisizione e le condizioni di trasduzione e amplificazione del segnale.

1. Si passerà successivamente alla raccolta dei dati di prova su CAMPIONI REALI, dapprima raccolti da volontari sani e successivamente su soggetti positivi. In questa fase saranno condotte le seguenti attività, che consentiranno di definire completamente il metodo di analisi e di valutarne le prestazioni:

* Valutazione e definizione dei parametri chemiometrici più efficaci per la realizzazione del software di elaborazione dati: saranno presi in considerazione algoritmi di trattamento del segnale, di analisi multivariata e di classificazione.
* Determinazione dei parametri di qualità del metodo secondo le linee guida per la validazione di metodi diagnostici (sensibilità, intervalli dinamici di applicabilità, robustezza, limiti di rivelabilità, selettività, interferenze, probabilità di falsi positivi e falsi negativi).

Al termine di questa fase saranno quindi definite le procedure operative standard (SOP) per il campionamento, la misurazione e l’analisi dei dati.

1. L’ultima fase operativa prevede la validazione analitica del metodo e la valutazione dell’APPLICAZIONE “SUL CAMPO” della strumentazione. In particolare, saranno prese in considerazione le prestazioni in condizioni controllate (ad esempio in ambiente ospedaliero). Con la raccolta di un numero significativo di campioni sarà possibile valutare compiutamente la capacità di classificazione in presenza di interferenze legati a stati fisiologici o patologici dei soggetti. Passando all’applicazione “sul campo” in condizioni maggiormente esposte saranno valutati gli effetti delle variazioni di parametri ambientali quali ad esempio la temperatura, l’umidità, le vibrazioni e le sollecitazioni meccaniche.

**Bibliografia**

[1] T.D. Ridder et al. Noninvasive alcohol testing using diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. Appl Spectrosc. 2005 Feb;59(2):181-9.

[2] M. Phillips et al. Effect of influenza vaccination on oxidative stress products in breath. J. Breath Res. 4 (2010) 026001.

[3] A.Metha et al. Non‐invasive lung cancer diagnosis by detection of GATA6 and NKX2‐1 isoforms in exhaled breath condensate. EMBO Mol Med (2016)8:1380-1389.

[4] K. B. Bec et al. Simulated NIR spectra as sensitive markers of the structure and interactions in nucleobases Scientific Reports 9, Article number: 17398 (2019).