

La diagnosi di Covid-19: dagli strumenti molecolari all'ultima frontiera dell'Intelligenza Artificiale

Barbara Illi

Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR), c/o Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Sapienza Università di Roma.

Note: evidenziate in corsivo sono riportate informazioni per "non biologi".

Introduzione

Dall'inizio della pandemia, la visione di Covid-19 e di SARS-CoV-2 (CoV-2) stesso è cambiata in maniera consistente. Le caratteristiche cliniche di Covid-19 vanno da nessun sintomo, a sintomi lievi, fino al collasso organico, dovuto ad una risposta immunitaria eccessiva (figura 1)

Figure 1

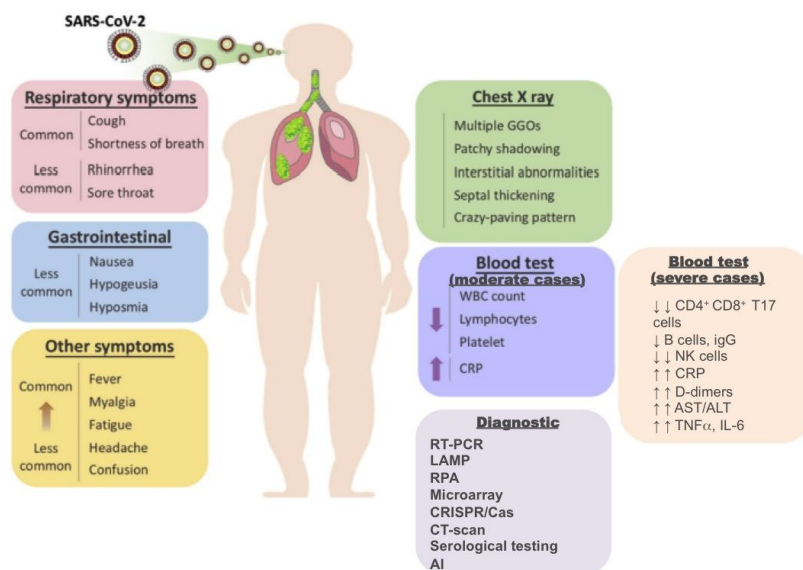


Figura 1. Panoramica dei sintomi di Covid-19. Abbreviazioni: CRP= proteina C reattiva; AST=aspartato aminotransferasi; ALT=alanina aminotransferasi; TNF- α =fattore di necrosi del tumore α ; IL-6=interleuchina-6; RT-PCR=reverse transcription-polymerase chain reaction; LAMP=Loop-mediated isothermal amplification; RPA=recombinase polymerase amplification; CT=Chest Tomography (tomografia del torace); AI=intelligenza artificiale. (Adattato da Tu et, al Int J Mol Sci, 2020)

Questa varietà di manifestazioni cliniche dipende, probabilmente, dalla carica virale a cui il paziente è stato esposto, da patologie pre- e co-esistenti, età, sesso e genetica del sistema immunitario (in particolare del sistema HLA). In effetti, è stato dimostrato che nei casi gravi la carica virale media è 60 volte superiore a quella dei casi lievi¹. CoV-2 può infettare molti tessuti e può essere isolato da diversi fluidi biologici, che rappresentano il materiale di partenza per la diagnosi di Covid-19.

Covid-19: ARDS or MICROCLOTS?

Il decorso clinico di Covid-19 presenta un ampio spettro di severità. Da febbraio 2020, i sintomi di Covid-19 includono febbre (98%), tosse (76%), dispnea (55%), mialgia o stanchezza (44%), catarro (28%), faringite (12%) mal di testa (8%), emottisi (5%), e diarrea (3%)^{2,3}. Tuttavia, nei casi lievi, la febbre si presenta nell' 11% dei pazienti, laddove i sintomi più frequenti sono faringite, tosse, accompagnati da iposmia, congestione nasale e rinorrea⁴. Il decorso severo della malattia presenta spesso le caratteristiche della Sindrome da Distress Respiratorio Acuto (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), con dispnea che si presenta 8 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi e una progressione rapida allo shock settico e disfunzione di molteplici organi². La necessità della Terapia Intensiva si rende necessaria dal 3 al 29% dei casi. Le complicazioni sono rappresentate da RNAemia (*ossia, la presenza di RNA virale nel sangue*), infarto del miocardio, infarto renale, infezioni secondarie. Co-morbidità maggiori sono: ipertensione, diabete e malattie cardiovascolari, in percentuale diversa, a seconda dello studio considerato. La TAC del torace dei pazienti moderati-severi ha mostrato alterazioni bilaterali nel 90% dei casi³. I parametri di laboratorio includono alti livelli di diverse citochine, linfopenia e eosinopenia (vedi anche Episodio 4 per i dettagli). Nonostante queste evidenze, il rapido peggioramento dei pazienti con Covid-19, nell'arco di poche ore, ha fatto nascere l'ipotesi che la patofisiologia di Covid-19 non fosse tipica dell'ARDS. Infatti, la maggior parte dei pazienti mostrano una conservata performance meccanica dei polmoni, con un'alta compliance respiratoria (cioè, il volume di gas nel polmone è ben conservato), in contrasto con l'ipossiemia (bassa concentrazione di ossigeno nel sangue) severa. Una spiegazione potrebbe essere che, in questi pazienti, la perfusione dei polmoni sia compromessa, a causa di una trombosi del microcircolo polmonare, dipendente dall'infiammazione. Infatti, l'iperattivazione del sistema immunitario, che caratterizza i casi severi di Covid-19, può attivare localmente la cascata del complemento, che non solo danneggia direttamente l'endotelio alveolare, ma, reclutando leucociti, sostiene la risposta infiammatoria, portando alla produzione di una moltitudine di citochine (figura 1). Anche i linfociti, macrofagi,

neutrofili esercitano la loro funzione pro-infiammatoria, portando ad un danno massiccio dell'epitelio ed endotelio alveolare e a trombosi del microcircolo dei polmoni, come

Figure 2

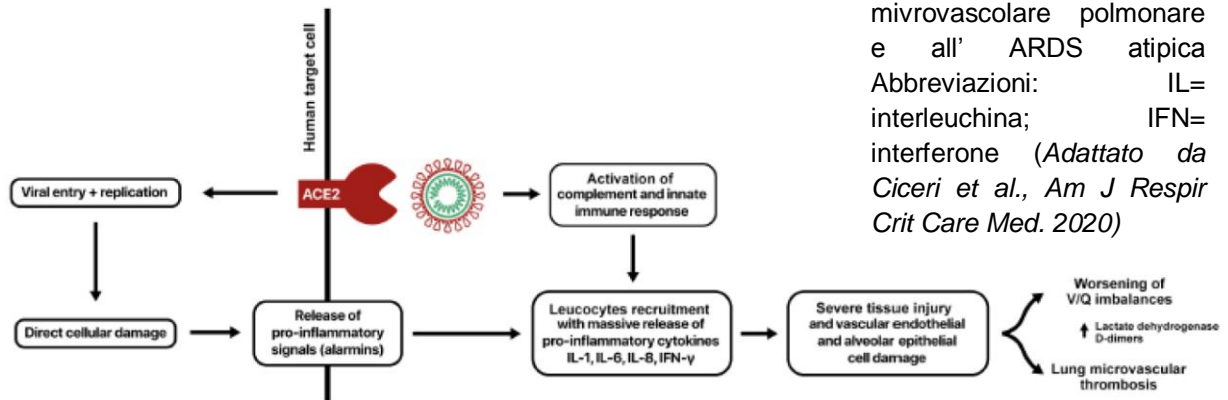


Figura 2. Cascata di eventi che portano alla disfunzione microvascolare polmonare e all' ARDS atipica
 Abbreviazioni: IL= interleuchina; IFN= interferone (Adattato da Ciceri et al., Am J Respir Crit Care Med. 2020)

suggerito dagli elevati livelli di D-dimero e lattato deidrogenasi (figura 2)^{5,6}. Questa condizione locale potrebbe, potenzialmente, espandersi a livello sistemico ad altri organi vitali, come il rene e il cervello. Pertanto, è stato proposto di recente che il danno polmonare nei pazienti Covid-19 sia principalmente di origine vascolare ed è stata suggerita un'altra definizione della malattia: MICROCLOTS, ossia Sindrome Ostruttiva Tromboinfiammatoria Microvascolare Polmonare (Microvascular Covid-19 Lung vessels Obstructive Thromboinflammatory Syndrome)⁶.

Tessuti bersaglio e trasmissione di CoV-2

- Tessuti. I tessuti che esprimono ACE2 (vedi anche Episodio 3) sono i bersagli diretti dell'infezione da CoV-2. Questi includono, non solo le cellule epiteliali delle vie respiratorie superiori ed inferiori, ma anche cellule vascolari (come i periciti)⁷ cellule epiteliali di bocca, gengiva, lingua e della mucosa orale⁸. ACE2 è stato anche rilevato nelle ghiandole salivari⁹. E' stato dimostrato che cellule epiteliali del dotto minore delle ghiandole salivari del Macaco Rhesus possono essere infettate da SARS-CoV¹⁰, perciò è concepibile che SARS-CoV-2 si comporti nello stesso modo. Inoltre, ACE2 è espresso anche in cellule dell'esofago e da altre cellule del tratto gastro-intestinale, inclusi gli enterociti. In effetti, è stato osservato di recente che questi ultimi esprimono alti livelli di ACE2 e possono essere infettati da SARS-CoV-2 (figura 3)¹¹.

Figure 3

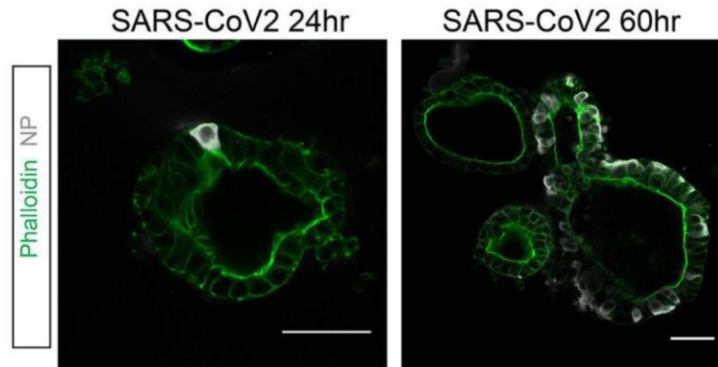


Figure 3. Immunofluorescenza* che mostra la presenza della proteina del nucleocapside (NP, in bianco) in organoidi di intestino umano[§]. La falloidina (in verde) marca l'actina del citoscheletro. *L' immunofluorescenza è una tecnica che consente di visualizzare la localizzazione di una proteina di interesse in cellule o tessuti, grazie al riconoscimento da parte di anticorpi specifici, coniugati a fluorofori, consentendo la rilevazione della proteina ad un microscopio a fluorescenza. [§]Gli organoidi rappresentano lo strumento più recente per gli studi "in vivo". Di fatto, riproducono una versione in miniatura dell'organo oggetto di studio, a partire da colture tridimensionali di cellule staminali su matrici extracellulari. (Adattato da Lamers et al., Science, 2020)

- Trasmissione. Come ogni virus respiratorio, la trasmissione di CoV-2 avviene per emissione di particelle dette droplets, principalmente starnutando o tossendo. (figura 4a). Laddove un individuo emette circa 75000 particelle a colpo di tosse¹², l'ordinario parlare può produrre un numero di droplets più alto, rappresentando, pertanto un veicolo di infezione. Inoltre, è stato mostrato che questo numero differisce a seconda dell'intensità del volume della voce. La dimensione dei droplets può variare da 1 a 500 μm , ma, dal momento che droplets piccoli evaporano velocemente e droplets grandi sono soggetti a velocità di caduta gravitazionale, i droplets di diametro medio (da 30 a 50 μM) raggiungono la distanza massima orizzontale, stimata in meno di 1 m durante il respiro fino a 6 m per uno starnuto¹³. Parlare ad alta voce può produrre 2600 particelle al secondo. Queste particelle si

Figure 4

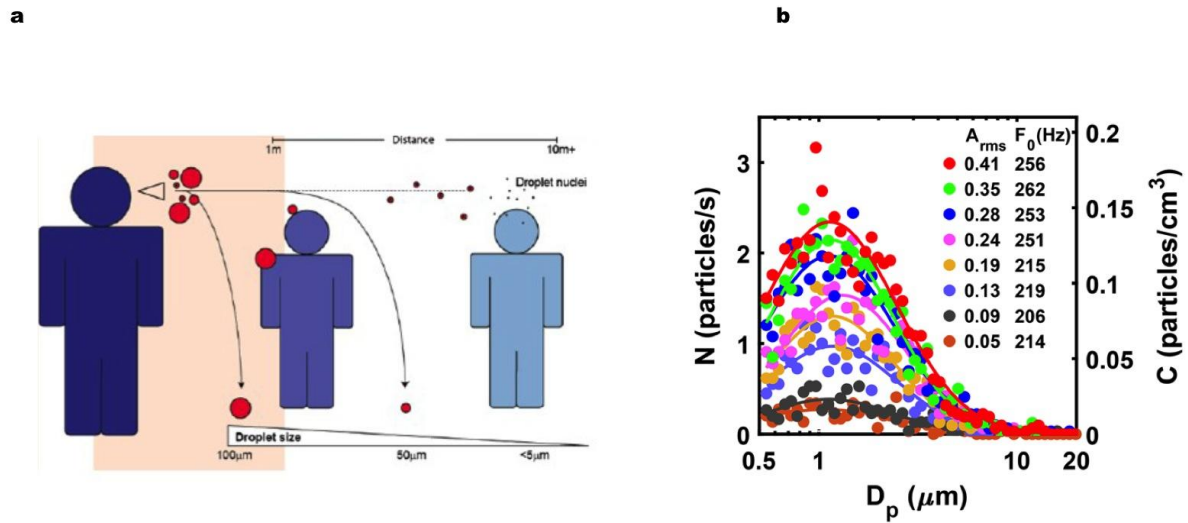


Figura 4. a) Relazione tra dimensione dei droplets e loro dispersione nell'aria. b) Distribuzione dei droplets per dimensione durante l'emissione di una lettera, ad 8 volumi di voce diversi, ripetuta per 6 volte. Abbreviazioni: A_{rms} =root mean square amplitude (scarto quadratico medio dell'estensione vocale; F_0 = frequenza fondamentale, ossia la frequenza alla quale le corde vocali vibrano mentre si parla. (Adattato da *International Federation of Infection control*, www.thelFC.org, 2016; Asadi et al., *Sci Rep* 2020)

disidratano velocemente (producendo i cosiddetti droplets nuclei). Per esempio, particelle di 12-21 μM , con un volume da 60 a 320 nL, si disidratano rapidamente fino a raggiungere un diametro di 4 μM . La vita media di queste particelle è 8 minuti e, considerando che la carica virale di CoV-2 nel fluido orale di circa 7×10^6 copie per millilitro (ml) (la carica virale media è stata stimata in 2.35×10^{11} copie/ml¹⁴), è stato calcolato che 1 minuto di conversazione ad alta voce può generare 1000 droplets contenenti virioni, che permangono in aria dagli 8 ai 14 minuti. La probabilità che piccole particelle contengano virioni cala dal 37% per droplets di 50 μM di diametro allo 0.37% per particelle di 10 μM , mentre la probabilità per queste ultime di contenere più di un virione è irrilevante¹⁵. Particelle più piccole possono rimanere indefinitamente nell'aria; tuttavia la probabilità per particelle disidratate di 1 μM (partendo da droplets di 3) di contenere un virione è dello 0.01%¹⁵. Sebbene il numero di particelle emesse aumenti con l'aumentare del volume della voce, la distribuzione delle dimensioni delle particelle non cambia (figura 4b). Inoltre, è stata dimostrata l'esistenza di "super-emettitori" di droplets, che potrebbero spiegare la presenza di "super-diffusori" di CoV-2¹⁶. Si è anche ipotizzata una trasmissione fecale, un argomento ancora dibattuto. Copie dell'RNA virale sono state rilevate

nelle feci, indipendentemente da tamponi naso-faringei negativi o positivi e dall'assenza/presenza di sintomi¹⁷. La rilevazione dell'RNA virale nelle feci non significa necessariamente che queste contengano virioni infettivi. Tuttavia, la presenza di virioni vitali nelle feci è stata riportata da osservazioni al microscopio elettronico¹⁸. La carica virale nei campioni di feci è stata determinata in 0.7-0.6 copie di RA virale per millilitro, nei pazienti con diarrea o meno, rispettivamente¹⁹. Questo è un punto importante, poiché CoV-2 potrebbe infettare un individuo anche a carica virale bassa. Per cui, sebbene si pensi che la carica virale nelle feci dovrebbe essere bassa, la trasmissione fecale dovrebbe essere considerata come preoccupante. Inoltre, l'RNA virale è stato rilevato anche nel sangue e nelle urine¹⁸ e la contaminazione può avvenire anche per contatto con superfici. Infatti, l'emivita delle particelle è diversa a seconda del materiale²⁰.

Figure 5

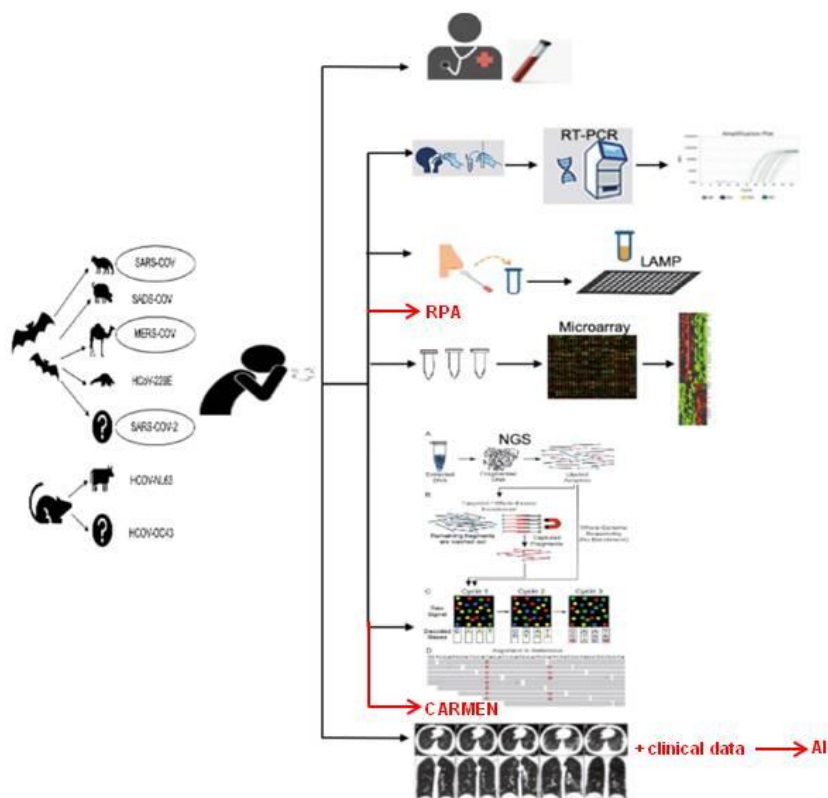


Figura 5. Panoramica degli strumenti diagnostici usati per la rilevazione di Coov-2. In rosso sono evidenziati gli ultimi avanzamenti diagnostici. (Adattato da Ozma et al., *Infez Med*, 2020)

La diagnosi di Covid-19

La figura 5 mostra una varietà di metodi, oggi impiegati per la rilevazione di CoV-2 e che consentono la diagnosi di Covid-19.

- Strumenti molecolari

a) Metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Inizialmente, l'identificazione molecolare di CoV-2 si è basata sul processo di trascrizione inversa associato alla PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) da tamponi naso-faringei od oro-faringei. *L' RT-PCR è un metodo basato sulla produzione e rilevazione di copie multiple del gene di interesse – in questo caso un gene CoV-2 specifico, come N che codifica la proteina del nucleocapside – partendo dall'RNA come stampo. L'enzima trascrittasi inversa, usando come stampo l'RNA totale estratto dalla cellula, piccole sequenze (oligonucleotidi) come inneschi e nucleotidi come “mattoni”, sintetizza un singolo filamento di DNA complementare alle sequenze di RNA (cDNA). Dopodiché, DNA-polimerasi batteriche, resistenti al calore (come la Taq polimerasi, del *Thermus Aquaticus* o la Pfu polimerasi del *Pyrococcus furiosus*), fanno copie multiple del gene di interesse partendo dal cDNA e da specifici oligonucleotidi che selezionano il gene bersaglio (figura 6a). I prodotti dell'amplificazione possono essere visualizzati su un gel di agarosio, che separa le molecole di DNA secondo il loro peso. Questa è, tuttavia, un' analisi qualitativa. Per monitorare la quantità di trascritto in un determinato campione, bisogna utilizzare la real time-PCR. Questa metodica è basata sull'emissione di fluorescenza man mano che le molecole di DNA aumentano nel campione. Si possono usare coloranti fluorescenti che legano il DNA a doppio filamento, come il SYBRGreen (meno specifici) o sonde specifiche fluorescenti, come le sonde Taqman (più specifiche). Differiscono perché i coloranti che legano il DNA a doppio filamento si legano ad ogni molecola (figura 6b), aumentando la fluorescenza del campione man mano che aumenta la quantità di molecole di DNA, mentre una sonda specifica fluorescente si lega solo a sequenze di DNA ad essa complementari. In questo caso, la fluorescenza è rilasciata solo alla fine della sintesi del filamento di DNA, quando la sonda è degradata (figura 6c). In ogni caso, la fluorescenza è rilevata da una macchina apposita e la quantità di DNA calcolata secondo il metodo descritto Livak and Schmittgen 2001²¹. All'inizio della pandemia, la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato un test*

commerciale per la rilevazione di CoV-2 della ditta Roche (cobas® SARS-CoV-2).

Figure 6

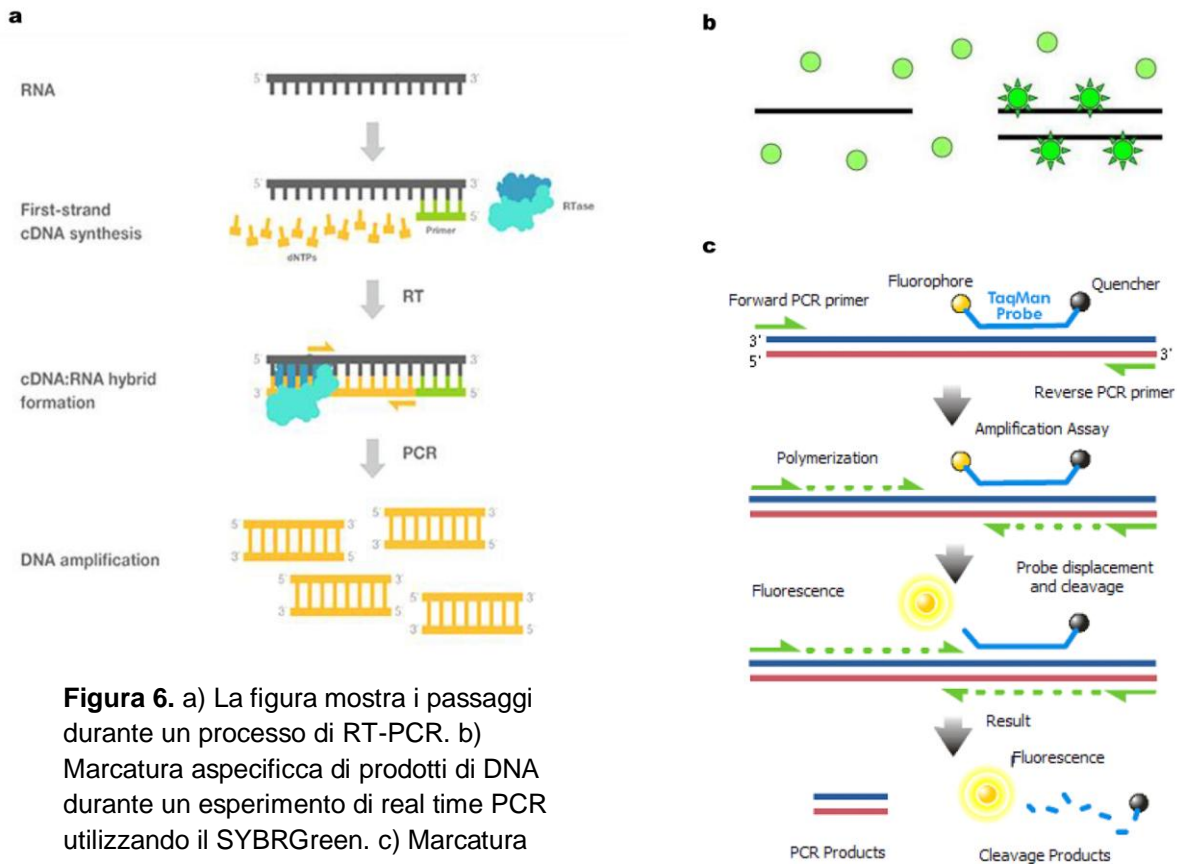


Figura 6. a) La figura mostra i passaggi durante un processo di RT-PCR. b) Marcatura aspecificca di prodotti di DNA durante un esperimento di real time PCR utilizzando il SYBRGreen. c) Marcatura specifica dei prodtti di DNA durante un esperimento di real time PCR, utilizzando le sonde Taqman.

Questo test richiede 3.5 ore, per cui un altro test, più veloce, è stato approvato, lo

Xpert® Xpress SARS-CoV-2 della ditta Cepheid Inc (USA), con cui si ottiene il risultato in 45 minuti.

- b) Amplificazione isotermica mediata da loop (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Questa è una metodica più economica e veloce. Inoltre, utilizzando inneschi multipli, è più sensibile e specifica. La rilevazione finale dei prodotti può essere fatta o per elettroforesi su gel di agarosio e/o per real time PCR. Questo metodo è stato già utilizzato per la rilevazione di altri Coronavirus (SARS-CoV²², MERS-CoV²³, HCoV-NL63²⁴). Con questo metodo si sono rilevate fino a 3.4 copie di MERS-CoV²³ e 0.01 unità formanti placche (plaque forming units , PFU) di SARS-CoV²². Per SARS-CoV-2, il limite di rilevazione è stato stimato in 2×10^2 copie per reazione²⁵.

- c) Amplificazione Ricombinasi Polimerasi. (Recombinase Polymerase Amplification, RPA). Un'evoluzione dei metodi basati sulla PCR è rappresentato dall'RPA, che usa 2 inneschi opposti, come la PCR, complementari alla sequenza che si vuole rilevare e complessati con l'enzima ricombinasi, formando un D-loop nella sequenza bersaglio a doppio filamento. Gli inneschi sono, poi, estesi da una DNA

Figure 7

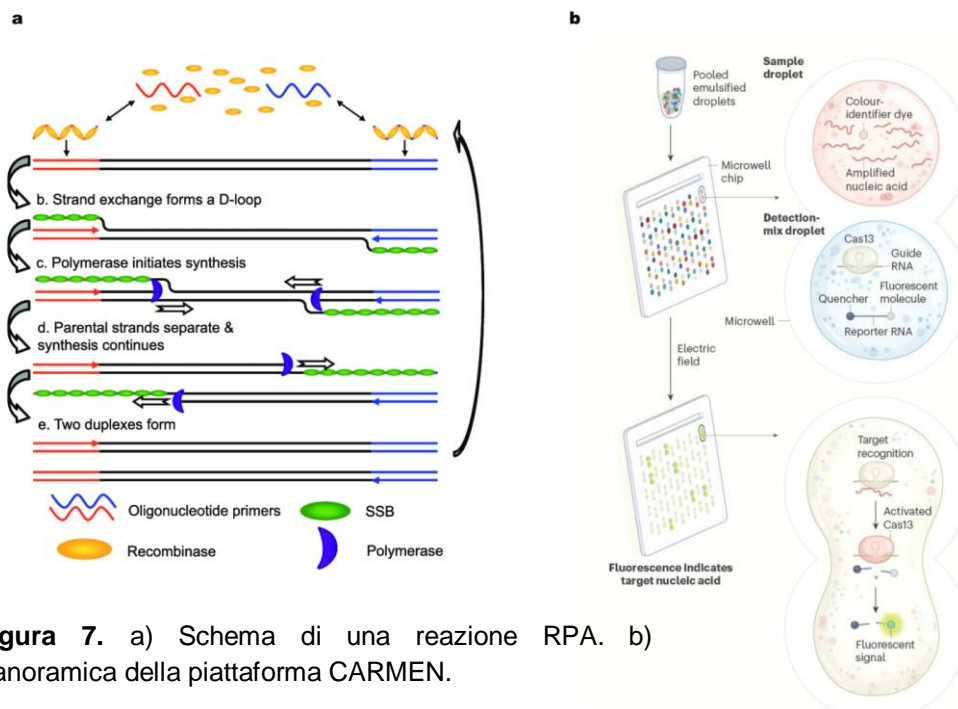


Figura 7. a) Schema di una reazione RPA. b) Panoramica della piattaforma CARMEN.

polimerasi mesofilica (*ossia, stabile a temperatura moderate*) (figura 7a). Se si aggiungono sonde fluorescenti, la reazione di RPA può essere monitorata in real time. Questo metodo è stato applicato di recente per rilevare CoV-2 in 20 minuti, con i primi risultati visibili dopo 7 minuti²⁶.

- d) Studi basati sui microarray possono essere utilizzati per la rilevazione di CoV-2. Altri Coronavirus sono stati rilevati con questo metodo²⁷. Di fatto, l'RNA virale viene retrotrascritto in cDNA e categorizzato da sonde specifiche. I cDNA marcati sono ibridati su un microarray su cui sono fissate le sonde specifiche. Una serie di lavaggi eliminano, poi, i cDNA che non si sono ibridati.
- e) Metodi basati sul sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS). I metodi NGS possono rilevare simultaneamente più genomi virali, sequenziando l'insieme degli RNA di una cellula infettata. L'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute, partendo dall'allineamento delle sequenze con altre sequenze disponibili in GeneBank, porta alla categorizzazione di nuovi

virus. Questi metodi sono anche (e soprattutto) utilizzati per identificare varianti genomiche e per studi di filogenesi (vedi anche Episodio 2). Ad esempio, di recente, l'analisi di 7666 genomi virali di CoV-2 in diversi Paesi è risultata nell'identificazione di mutazioni ricorrenti, occorse indipendentemente nel tempo (omoplasie), in specifiche regioni genomiche di CoV-2²⁸.

- f) Metodi basati sulla tecnologia CRISPR/Cas. l'avanzamento tecnologico più recente per la diagnosi molecolare di CoV-2 è rappresentato dalla piattaforma CARMEN: combinatorial arrayed reactions for multiplexed evaluation of nucleic acid, che si basa sulla tecnologia CRISPR/Cas²⁹. *Il sistema CRISPR/Cas dipende dall'utilizzo di un RNA guida complessato con l'enzima Cas. Se l'RNA guida si lega ad una sequenza complementare in un acido nucleico bersaglio, Cas si attiva e taglia il bersaglio.* CARMEN sfrutta Cas13, che taglia solo l'RNA e non il DNA. In questo metodo, Cas13 taglia un RNA reporter fluorescente in maniera non specifica quando è attivato dal riconoscimento di una sequenza complementare (figura 7b). La PCR o l' RPA sono necessari nella prima fase, per amplificare l'RNA virale (se presente). Un colorante fluorescente è mescolato al campione per dare all'RNA un codice-colore specifico. Diversi droplets da 1 nanolitro, emulsionati con olio, sono generati per tutte le differenti reazioni di amplificazione. E' anche prodotta un'altra serie di droplets con colori unici. Questi droplet colorati contengono un RNA reporter fluorescente e Cas13 legato ad un RNA guida, necessario per rilevare l'RNA virale bersaglio. I droplet mescolati (in un tubo singolo) sono caricati su un chip contenenti micro-pozzetti, capaci di alloggiare soltanto 2 droplet. Sul chip, ogni acido nucleico bersaglio è probabilmente esposto a ciascuna miscela di rilevazione, in replicati multipli, in diverse posizioni. L'esposizione ad un campo elettrico, mescolando la coppia di droplets, innesca la reazione di rilevazione. Se Cas13, complessato con l'RNA guida, riconosce una sequenza virale amplificata, nello stesso pozzetto, si attiva e genera fluorescenza dall'RNA reporter, a causa della sua attività di taglio non-specifica, che viene rilevata. Questa piattaforma è estremamente innovativa e permette la rilevazione di più di un virus a esperimento. E' stato dimostrato che è in grado di distinguere CoV-2 da altri coronavirus umani, SARS-CoV and MERS-CoV²⁹.

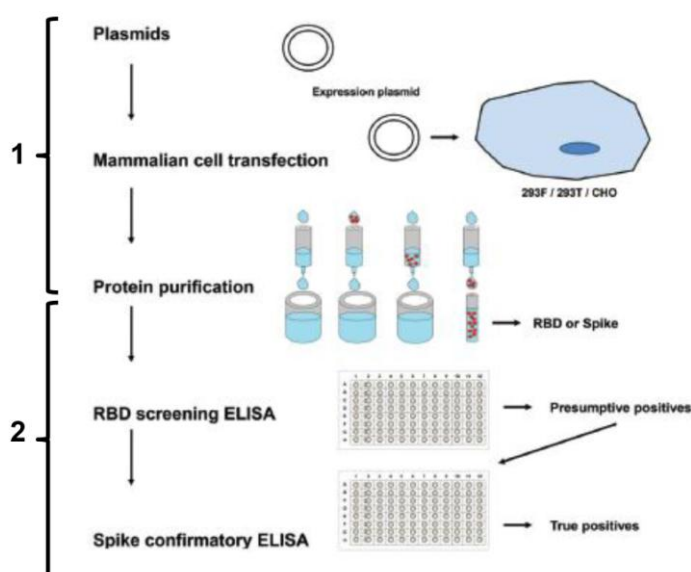
Radioimaging

La tomografia computerizzata del torace (chest computerized tomography scan, CT) è usata correntemente per la diagnosi clinica di Covid-19. I principali riscontri radiologici sono i seguenti: immagini a “vetro smerigliato” (ground glass opacity, GGO, regioni di opacità in cui le strutture e vasi polmonari sono ancora visibili), consolidamento (regioni in cui l’aria negli alveoli è sostituita da fluidi e/o cellule), ispessimento delle pareti bronchiali. Meno frequentemente si osservano reticolazione, un pattern cosiddetto “crazy paving” (in cui l’immagine del polmone sembra quella di un pavimento formato da pietre irregolari, causata da un ispessimento dei setti interlobulari, ispessimento dei setti intralobulari e degli interstizi intralobulari, o da deposizione di materiale negli spazi occupati dall’aria ai bordi degli acini), ingrossamento dei linfonodi intratoracici e bande subpleuriche^{30, 31}. La tomografia computerizzata del torace può aiutare nella diagnosi di pazienti falsi-negativi, a causa di errori tecnici o per la presenza di virioni nel liquido broncoalveolare e non nelle vie aeree superiori.

Test sierologici

La rilevazione degli anticorpi CoV-2-specifici è un altro metodo indiretto per identificare individui infetti. La rilevazione dell’RNA virale potrebbe essere efficace solo nella fase acuta della malattia, anche se alcuni pazienti risultano positivi fino a diverse settimane

Figure 8



dopo la guarigione. La rilevazione degli anticorpi è anche utile per identificare quelle persone

Figure 8. Procedura per la messa a punto di un test ELISA per CoV-2. Cellule HEK293T sono trasfettate con plasmidi* codificanti l’RBD di Spike o la forma trimerica di Spike, marcati da una coda di istidine. Successivamente, le proteine sono purificate su colonne di Ni-NTA[§] e immobilizzate su piastra. I sieri dei pazienti sono testati caricando i campioni nei pozzetti e tramite rilevazione con un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. I campioni positivi sono rilevati in un lettore ELISA ad una lunghezza d’onda 490nm, dopo l’arresto della reazione con acido cloridrico. *Un plasmide è una molecola di DNA circolare, usata per esprimere geni in cellule procariotiche ed eucariotiche. §Il sistema di purificazione basato su colonne di Ni-NTA (nickel nitrilotriacetic acid) sfrutta l’affinità del metallo per l’istidina. Abbreviazioni: HEK293T=human embryonic kidney (cellule umane embrionali di rene) 293T, dove T si riferisce all’antigene large T del virus di scimmia 40 (SV40). HRP=horseradish peroxidase. (Adattato da Stadblauer et al., Curr Protoc Microbiol, 2020)

potenzialmente immuni ad una re-infezione da CoV-2. I test sierologici per CoV-2 sono basati sulla metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), il cui principio, nel caso specifico, è il riconoscimento di una determinata proteina (o parte di esse) fissata su un substrato solido da parte di anticorpi presenti nel siero di un individuo. I più specifici sono gli ELISA a 2 passaggi, in cui i sieri vengono testati prima per il legame al dominio di legame al recettore di Spike (receptor binding domain, RBD) e poi per l'intero trimero di Spike (figura 8)³².

Intelligenza Artificiale (AI)

La rilevazione di CoV-2 per RT-PCR, che è ancora usata di routine per diagnosticare i pazienti infetti da CoV-2, può essere un processo lungo, in quanto può richiedere test multipli, per assicurare l'esclusione di falsi negativi. La tomografia computerizzata non può identificare i pazienti lievi, che possono non manifestare i tipici segni radiologici (vedi sopra).

Figure 9

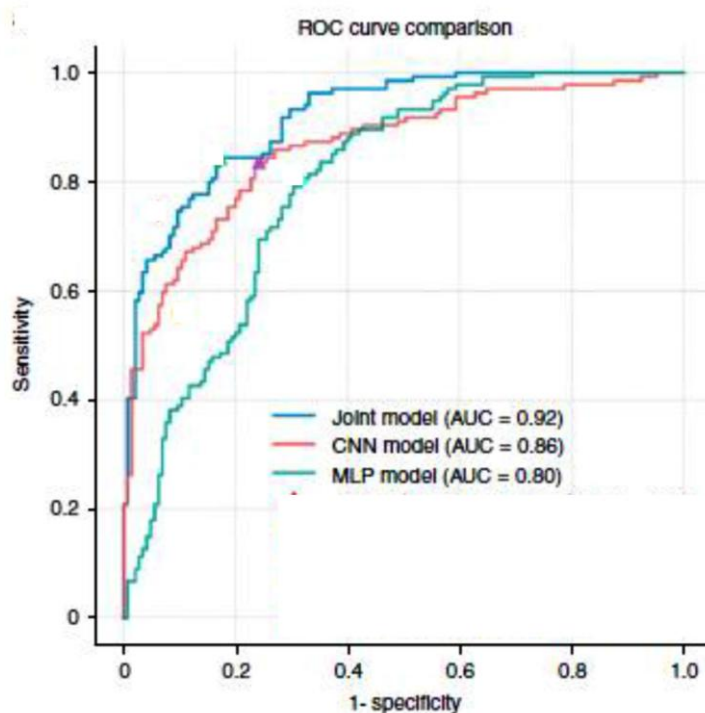


Figure 9. Il grafico illustra l'abilità diagnostica (definita dalla Receiver Operator Curve, ROC) del modello integrato (in blu), del modello che considera solo le immagini radiologiche (in rosso) e del modello che considera solo i dati clinici (in verde). Abbreviazioni: CNN=convolutional neural network; MLP=multilayer perceptron; AUC=area under the curve (area sotto la curva) che definisce la probabilità che un modello classifichi un campione casualmente positivo più sicuramente che un campione casualmente negativo e il suo valore va da 0 a 1. (Adattato da Mei et al., Nat Med, 2020)

Molto recentemente è stato sviluppato un algoritmo (una rete neurale) di intelligenza artificiale, a sostegno delle metodiche molecolari, che integra i dati radiologici, la storia clinica, i test, sintomi e risultati di laboratorio³³. È stato dimostrato che la rete neurale è più sensibile e specifica (84.3% e 82.8%) dei modelli basati solo sulle immagini radiologiche (83.6% e 75.9%) o sui dati clinici (80.6% e 68.3%) (figura 9)³³. Tenendo conto di queste evidenze, questo algoritmo potrebbe essere usato per l'identificazione rapida degli individui infetti da CoV-2, prima dei risultati dei test molecolari.

Conclusioni

Dal momento che la pandemia di Covid-19 non è ancora sotto controllo e sta ancora crescendo rapidamente nel mondo, è imperativo ottenere diagnosi rapide, per isolare i pazienti e relativi contatti. Una moltitudine di metodi sono stati applicati, dimostrando come differenti expertise di ricerca e diagnostiche possono convergere su di un terreno comune. Dai metodi di RT-PCR, alle ultime frontiere della tecnologia CRISPR/Cas e dell'intelligenza artificiale, si sta facendo un enorme sforzo per assicurare l'identificazione veloce e sicura degli individui infettati da CoV-2, un prerequisito per l'applicazione di protocolli terapeutici appropriati.

Referenze

1. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: 656-657. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
2. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, Lai WY, Yang DM, Chou SJ, Yang YP, Wang ML, Chiou SH. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 2657. doi: 10.3390/ijms21072657.
3. Lovato A, de Filippis C. Clinical Presentation of COVID-19: A Systematic Review Focusing on Upper Airway Symptoms. *Ear Nose Throat J.* 2020: 145561320920762. doi: 10.1177/0145561320920762.
4. Kim GU, Kim MJ, Ra SH, Lee J, Bae S, Jung J, Kim SH. Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. *Clin Microbiol Infect.* 2020: S1198-743X(20)30268-8. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.040.

5. Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Rossi S, Chiumello D. COVID-19 Does Not Lead to a "Typical" Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020. 201: 1299-1300. doi: 10.1164/rccm.202003-0817LE.
6. Ciceri F, Beretta L, Scandroglio AM, Colombo S, Landoni G, Ruggeri A, Peccatori J, D'Angelo A, De Cobelli F, Rovere-Querini P, Tresoldi M, Dagna L, Zangrillo A. Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. *Crit Care Resusc*. 2020. Online ahead of print.
7. Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 2020; 116: 1097-1100. doi: 10.1093/cvr/cvaa078.
8. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J. Oral. Sci*. 2020; 12: 8.
9. Song J, Li Y, Huang X, Chen Z, Li Y, Liu C, Chen Z, Duan X. Systematic analysis of ACE2 and TMPRSS2 expression in salivary glands reveals underlying transmission mechanism caused by SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2020; 22:10.1002/jmv.26045. doi: 10.1002/jmv.26045.
10. Liu L, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, Jiang H, Zhou J, Lam P, Zhang L, Lackner A, Qin C, Chen Z. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J. Virol*. 2011; 85: 4025-30.
11. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, Ravelli RBG, Paul van Schayck J, Mykytyn AZ, Duimel HQ, van Donselaar E, Riesebosch S, Kuijpers HJH, Schippers D, van de Wetering WJ, de Graaf M, Koopmans M, Cuppen E, Peters PJ, Haagmans BL, Clevers H. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*. 2020: eabc1669. doi: 10.1126/science.abc1669.
12. Lindsley WG, Pearce TA, Hudnall JB, Davis KA, Davis SM, Fisher MA, Khakoo R, Palmer JE, Clark KE, Celik I, Coffey CC, Blachere FM, Beezhold DH. Quantity and size distribution of cough-generated aerosol particles produced by influenza patients during and after illness. Version 2. *J Occup Environ Hyg*. 2012; 9: 443-9. doi: 10.1080/15459624.2012.684582.

13. Xie X, Li Y, Chwang AT, Ho PL, Seto WH. How far droplets can move in indoor environments--revisiting the Wells evaporation-falling curve. *Indoor Air*. 2007; 17: 211-25. doi: 10.1111/j.1600-0668.2007.00469.x.
14. Wölfel Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmman R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020. 10.1038/s41586-020-2196-x.
15. Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, Anfinrud P. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 11875-11877. doi: 10.1073/pnas.2006874117.
16. Asadi S, Wexler AS, Cappa CD, Barreda S, Bouvier NM, Ristenpart WD. Aerosol emission and superemission during human speech increase with voice loudness. *Sci Rep*. 2019 Feb; 9: 2348. doi: 10.1038/s41598-019-38808-z.
17. Amirian ES. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: Current evidence and implications for public health. *Int J Infect Dis*. 2020; 95:363-370. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.057.
18. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020; 323: 1843-4. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
19. Cheung KS, Hung IF, Chan PP, Lung KC, Tso E, Liu R, Ng YY, Chu MY, Chung TW, Tam AR, Yip CC, Leung KH, Yim-Fong Fung A, Zhang RR, Lin Y, Cheng HM, Zhang AJ, To KK, Chan KH, Yuen KY, Leung WK. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples from the Hong Kong Cohort and Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2020: S0016-5085(20)30448-0. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.065.
20. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020; 382: 1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973.

21. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
22. Kim JH, Kang M, Park E, Chung DR, Kim J, Hwang ES. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *Biochip J*. 2019;13: 341-351. doi: 10.1007/s13206-019-3404-3.
23. Shirato K, Semba S, El-Kafrawy SA, et al. Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol Method*. 2018; 258, 41-8.
24. Pyrc K, Milewska A, Potempa J. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of human coronavirus-NL63. *J Virol Method*. 2011; 175, 133-6.
25. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, Kim YI, Choi WS, Kim SG, Jeong JH, Chin BS, Nicolas HDG, Ahn JY, Shin KS, Choi YK, Park JS, Song MS. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. 2020; 9: 998-1007. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.
26. Behrmann O, Bachmann I, Spiegel M, Schramm M, El Wahed AA, Dobler G, Dame G, Hufert FT. Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clin Chem*. 2020: hvaa116. doi: 10.1093/clinchem/hvaa116.
27. Chen Q, Li J, Deng Z, Xiong W, Wang Q, Hu Y-Q. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. *Intervirology*. 2010; 53, 95-104.
28. van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, Owen CJ, Pang J, Tan CCS, Boshier FAT, Ortiz AT, Balloux F. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol*. 2020; 83: 104351. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
29. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, Ye SH, Boehm CK, Kosoko-Thoroddsen TF, Kehe J, Nguyen TG, Carter A, Kulesa A, Barnes JR, Dugan VG, Hung DT, Blainey PC, Sabeti PC. Massively multiplexed

- nucleic acid detection with Cas13. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2279-8.
30. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. *Radiol*. 2020; 200343.
31. Wei J, Xu H, Xiong J, Shen Q, Fan B, Ye C, Dong W, Hu F. 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia: Serial Computed Tomography Findings. *Korean J Radiol*. 2020; 21.
32. Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, Tan J, Bhavsar D, Capuano C, Kirkpatrick E, Meade P, Brito RN, Teo C, McMahon M, Simon V, Krammer F. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 57: e100. doi: 10.1002/cpmc.100
33. Mei X, Lee HC, Diao KY, Huang M, Lin B, Liu C, Xie Z, Ma Y, Robson PM, Chung M, Bernheim A, Mani V, Calcagno C, Li K, Li S, Shan H, Lv J, Zhao T, Xia J, Long Q, Steinberger S, Jacobi A, Deyer T, Luksza M, Liu F, Little BP, Fayad ZA, Yang Y. Artificial intelligence-enabled rapid diagnosis of patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020. doi: 10.1038/s41591-020-0931-3.