



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Scienze Infermieristiche

**Screening per infezione da Sars-Cov-2:  
un aiuto da chi non ti aspetti.  
Progetto C19 screendog  
Cani anti Covid.**

Relatore:  
**Liberati Stefania**

Tesi di Laurea di:  
**Pesce Francesco**

Correlatore:  
**Rippo Maria Rita**

A.A. 2020/2021

# INDICE

<b>Abstract</b>	1
<b>Capitolo 1</b>	
1.1: Introduzione al Sars-Cov-2	2
1.2: L'outbreak in Cina	3
1.3: L'epidemia nel territorio Italiano	5
1.4: I dati mondiali	8
<b>Capitolo 2</b>	
2.1: La Covid19	10
2.2: Gli attuali metodi di screening	10
2.3: Importanza ed organizzazione dei metodi di screening	14
<b>Capitolo 3</b>	
3.1: Il progetto C19-screendog	16
3.2: Obbiettivi dello studio	20
3.3: Unità operative partecipanti	21
3.4: Protocollo	23
3.5: Materiali	27
3.6: Eventuali potenzialità applicative, impatto scientifico, sociale ed economico	27
3.7: Risultati	28
<b>Conclusioni</b>	32
<b>Bibliografia</b>	33
<b>Sitografia</b>	36
<b>Allegati</b>	37
<b>Ringraziamenti</b>	45

## **Abstract**

La capacità dei cani da rilevamento di fiutare con elevata sensibilità e specificità i VOC, ossia sostanze volatili presenti in molti campioni biologici umani, è nota da tempo ed è stata applicata con successo in vari campi. Alcuni studi scientifici pubblicati recentemente su riviste internazionali hanno dimostrato come cani da rilevamento, opportunamente addestrati, siano in grado di riconoscere i VOC contenuti in campioni di saliva, secrezioni tracheobronchiali o sudore ascellare di soggetti positivi al test molecolare per il rilevamento di Sars-Cov-2. L'obiettivo di questo studio coordinato dall'Università Politecnica delle Marche è quello di confermare i dati già presenti in letteratura validando la sensibilità e la specificità del test su campioni di sudore ascellare raccolto da soggetti asintomatici o paucisintomatici e successivamente sulle persone senza prelievo di campione. Per raggiungere tale obiettivo, i cani da rilevamento, ritenuti idonei allo studio da cinofili esperti, sono stati impegnati in una prima fase di addestramento su campioni di sudore ed attualmente stanno operando per la fase di validazione su soggetti che si recano ai drive in per diagnosi di positività al Sars-Cov-2. Nella fase di training i cani sono stati addestrati a discriminare i campioni biologici positivi e negativi prelevati da soggetti che si sono recati al drive in per il tampone molecolare naso-faringeo; l'addestramento viene ora validato direttamente al drive in testando un numero statisticamente significativo di soggetti senza bisogno di prelievo di campione (il cane viene condotto dal suo addestratore in prossimità del soggetto da testare). Lo studio terminerà nelle aule di UNIVPM come luogo di comunità. I risultati di questa ricerca, condotta da personale esperto nell'addestramento dei cani e competente in campo sperimentale e sanitario, offriranno un metodo rapido, non invasivo ed economico per lo screening della popolazione.

# Capitolo 1

## 1.1 Introduzione al Sars-Cov-2

Il coronavirus fu scoperto negli anni '30 quando fu isolato per la prima volta nei polli ma soltanto a metà del 1960 fu identificato il primo coronavirus umano. Successivamente nell'anno 2003 durante l'epidemia di SARS, si notò come questo virus fosse altamente contagioso e capace di provocare anche pandemie su scala planetaria. I coronavirus comuni in tutto il mondo sono responsabili di circa il 10-15% dei raffreddori soprattutto nei mesi invernali e di sindromi respiratorie come la MERS (Sindrome Respiratoria Mediorientale, *Middle East Respiratory Syndrome*) e la SARS (Sindrome Respiratoria Acuta Grave, *Severe Acute Respiratory Syndrome*). La famiglia dei coronavirus si suddivide in "sottofamiglie" identificate con le lettere dell'alfabeto greco "alfa", "beta", "gamma" e "delta".

I coronavirus umani conosciuti ad oggi sono sette, alcuni identificati diversi anni fa (i primi a metà degli anni Sessanta), altri identificati nel nuovo millennio.

Coronavirus umani comuni:

- 1 - 229E (coronavirus alpha)
- 2 - NL63 (coronavirus alpha)
- 3 - OC43 (coronavirus beta)
- 4 - HKU1 (coronavirus beta)

Altri coronavirus umani:

- 5 - MERS-CoV (il coronavirus beta che causa la *Middle East respiratory syndrome*)
- 6 - SARS-CoV (il coronavirus beta che causa la *Severe acute respiratory syndrome*)
- 7 - SARS-CoV-2 (il coronavirus che causa la Covid-19) [1]

Il Sars-Cov-2 è un virus ad RNA a singolo filamento dal genoma di grandezza -30kb contenuto all'interno di un capsido ed avvolto da una serie di proteine che danno al virus l'aspetto di una corona da cui l'agente patogeno prende il nome. La proteina che si trova

nell'envelope (rivestimento) del virus prende il nome di proteina Spike ed è responsabile della trasmissione tra esseri umani.

In particolar modo è quest'ultima proteina ad aver mutato e ad aver consentito lo "Spillover" cioè il "salto di specie" permettendo al virus di poter passare dai pipistrelli, considerati reservoir o serbatoi di molte famiglie di coronavirus, ad altri animali detti ospiti intermedi nei quali il virus continua a mutare fino ad avere le caratteristiche per poter essere trasmesso all'uomo. Ciò accade grazie appunto alla proteina Spike che è in grado di legarsi al recettore ACE-2 (Angiotensin-converting enzyme 2) presente nei polmoni, nel cuore, nei reni e nel tratto gastrointestinale dell'essere umano mostrando un'affinità perfetta e causando una sintomatologia di tipo respiratorio e non solo. La modalità di trasmissione del Sars-Cov-2 accertata è mediante esposizione diretta ai droplets, mentre è ancora in fase di studio la trasmissione per via aerea [2].

## **1.2 L'outbreak in Cina**

I primi quadri di polmonite da Sars-Cov-2, definita al principio "anomala", sono stati evidenziati a Wuhan (Cina) all'inizio del mese di Dicembre 2019, precisamente l'8 Dicembre. Molti dei casi iniziali riferivano la frequentazione del mercato all'ingrosso del pesce di Wuhan, dove vengono venduti anche animali selvatici di specie disparate, utilizzati a scopo alimentare [3].

Non poteva essere una semplice coincidenza che tutti i casi fossero passati dal mercato del pesce e della carne selvatica, ma secondo quanto dichiarato dalle autorità Cinesi, solo a fine Dicembre 2019 l'informazione giunse a Pechino. Il 1° Gennaio 2020 quest'ultime disposero la chiusura del mercato di Wuhan. Fino a metà Gennaio i malati di "polmonite misteriosa" per le autorità cinesi erano soltanto 45 e il governo cinese tentò in tutti i modi di oscurare le notizie dell'insorgenza di questo nuovo focolaio epidemico.

Nel mentre c'erano medici ospedalieri a Wuhan che non credevano più alla versione della "misteriosa polmonite" di cui parlavano le autorità e temevano l'inizio di un'epidemia. Tentarono di supportarsi scambiandosi informazioni in chat private, il leader del gruppo era il dottor Li Wenliang giovane medico di 34 anni (contagiato a sua volta dal virus e morto il 7 Febbraio 2020). Il Dott. Li raccontava che nel suo ospedale erano ricoverati in

isolamento sette pazienti con sintomi respiratori gravi, convinto che si trattasse di un ritorno della SARS debellata a suo tempo nel 2003. Era il 30 Dicembre 2019, quando uno screenshot del suo post fu intercettato dalle autorità di Wuhan le quali ordinarono alla polizia di censurare la chat online con l'accusa di aver disturbato gravemente l'ordine sociale.

Il Dott. Li fu interrogato e ammonito e la polizia si vantò di aver neutralizzato chi metteva in giro notizie false, ma il 9 Gennaio il China CDC (il Centro per il controllo e la prevenzione delle malattie della Cina) ammise che a Wuhan era stato isolato un nuovo coronavirus responsabile della polmonite chiamato provvisoriamente novel Cov – nCoV. Sul web la gente iniziò a dire che gli otto medici che tentarono di dare l'allarme su questo nuovo potenziale pericolo avevano ragione.

La questione fu rivista dalla Corte suprema del popolo che decise di non incolpare il Dott. Li di aver fabbricato notizie false, ma allo stesso tempo per non smentire il sistema che lo aveva censurato, la Corte ribadì che si era trattato di un errore diagnostico in quanto l'infezione non era provocata dalla SARS ma da un nuovo tipo di coronavirus [4]. I comportamenti adottati dalle autorità cinesi ovviamente hanno consentito al virus di propagarsi rapidamente. Le varie autorità, in particolar modo l'OMS, discutevano il tema principale della possibile trasmissione del virus da persona a persona. Nella città di Wuhan si raggiungevano intanto i 6.065 casi positivi al Sars-Cov-2 e 132 decessi (29 Gennaio 2020). Iniziano ad emergere i primi casi fuori dal territorio cinese: Giappone, Thailandia, Corea del Sud; anche in Europa compaiono i primi soggetti positivi in particolare in Francia e Germania.

L'OMS, nel mentre, raccomanda lo screening in uscita dalle aree di infezione, pur rimanendo contraria all'applicazione di restrizioni nei confronti del traffico internazionale. Ciò porta l'Emergency Committee a riunirsi per la seconda volta il 30 Gennaio dichiarando lo stato di PHEIC (Public Health Emergency of International Concern/Stato di emergenza sanitaria di interesse internazionale). Inoltre il Comitato ritiene prevedibile un'ulteriore diffusione dell'epidemia, raccomandando una globale attenzione alle misure di contenimento attraverso precoce identificazione dei casi, sorveglianza attiva, isolamento e tracciamento dei contatti.

Tracciamento che viene effettuato tramite l'esecuzione di un tampone naso-faringeo inserito prima nelle narici e poi nella gola, con lo scopo di prelevare materiale biologico dalle alte vie respiratorie del soggetto.

Il tampone naso-faringeo viene effettuato per eseguire due test, l'antigenico rapido ed il molecolare, il primo molto sensibile ma non altrettanto specifico rileva la presenza delle proteine virali e permette di avere una risposta molto veloce, il secondo ritenuto il "gold standard" in quanto molto sensibile e specifico necessita di una metodica più lunga, la real-time RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) che permette l'amplificazione dei geni virali maggiormente espressi durante l'infezione. L'11 febbraio 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità decide di denominare la malattia infettiva causata dal nuovo coronavirus recentemente scoperto: "COVID-19" (acronimo di COronaVirus Disease, il 19 indica l'anno di insorgenza dei primi casi). Sempre l'11 Febbraio 2020, il Gruppo di studio sui coronavirus dell'International Committee on Virus Taxonomy (ICTV) propone su bioRxiv di riconoscere il 2019-nCoV come un "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)" sulla base di un'analisi filogenetica di coronavirus correlati [5].

### **1.3 L'epidemia nel territorio Italiano**

In Italia i primi casi di positività al Sars-Cov-2 compaiono il 31 Gennaio 2020, quando una coppia di turisti cinesi a seguito della comparsa di sintomi riconducibili alla Covid19, risultano positivi al tampone molecolare.

Da qui in avanti in Italia non vengono registrati nuovi positivi e si tenta di aggirare il problema chiudendo i voli da e per la Cina. Tutto questo fino al 20 Febbraio quando emerge quello che verrà poi definito "paziente 1". Si tratta di un individuo adulto, sano, residente a Codogno che all'insorgere dei sintomi si reca al pronto soccorso della medesima cittadina risultando poi positivo al tampone.

L'allarme di una possibile infezione da Sars-Cov-2 scatta durante la raccolta dell'anamnesi nel quale il paziente racconta di una cena tenutasi con un amico rientrante dalla Cina, il pronto soccorso di tale ospedale verrà poi chiuso per sole 2 ore senza eseguire il tampone ai pazienti in attesa che verranno successivamente dimessi.

Probabilmente tale scelta sarà causa di infezione per ulteriori individui e del focolaio epidemico che scatterà in Lombardia. Il Ministro della Salute pone in quarantena obbligatoria 60 persone che hanno avuto contatti con il paziente 1. Non si individua il paziente 0: per la tempistica e per l'estrema contagiosità del virus, si ritiene plausibile che si tratti di uno dei due turisti cinesi trovati positivi il 31 Gennaio [6]. La stampa locale porta all'attenzione delle polmoniti emerse nella stessa zona geografica, a Castiglione d'Adda, prima dell'identificazione del paziente 1.

A distanza di 24 ore, in data 21 febbraio, si individuano altri 36 casi nell'area di Codogno e Lodi (Lombardia); inoltre è resa nota la notizia di un ulteriore focus epidemico nella zona di Vo' Euganeo (Veneto) e ciò costringe il governo a introdurre l'isolamento domiciliare obbligatorio per i contatti stretti dei positivi e si pone in "lockdown" l'area dei comuni lombardi di Codogno, Castiglione d'Adda, Casalpusterlengo, Fombio, Maleo, Somaglia, Bertonico, Terranova dei Passerini, Castelgerundo e San Fiorano oltre che Vo' Euganeo. Il 25 febbraio viene firmato un nuovo DCPM che restringe ulteriormente le possibilità di aggregazione di massa, allargando i limiti per le manifestazioni sportive, le attività scolastiche, socioculturali e in generale i momenti di ritrovo sociale, all'interno del territorio delle regioni dell'Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lombardia, Veneto, Piemonte e Liguria. Il giorno 8 marzo il conteggio dei casi confermati in Italia sale a 7.375 e 366 decessi totali. Nella stessa data, a fronte del quadro epidemico, è promulgato un nuovo DPCM che applica il regime di lockdown a tutta la regione Lombardia così come alle 14 province di Modena, Parma, Piacenza, Reggio Emilia, Rimini, Pesaro e Urbino, Alessandria, Asti, Novara, Verbanco-Cusio-Ossola, Vercelli, Padova, Treviso e Venezia. In tali aree sono vietati spostamenti in entrata e uscita, sono sospesi tutti gli eventi e competizioni sportive nonché tutte le manifestazioni organizzate ed eventi pubblici/privati, tutte le attività scolastiche e socio-culturali, come tutti i motivi di aggregazione sociale e parallelamente sono calmierati gli esercizi commerciali.

Ciò però non contrasterà l'avanzata del virus in quanto molti cittadini Lombardi riescono prima dell'entrata in vigore del decreto ad andarsene dalla regione sfruttando gli ultimi treni ed aerei e portando probabilmente il virus in giro per il paese. Il 9 Marzo 2020 infine il governo decide di estendere le misure di contenimento su tutto il territorio nazionale per evitare di far crollare il sistema sanitario a causa dei molti ricoverati gravi (il picco è stato raggiunto il 3 Aprile 2020 con 4.068 ricoverati in terapia intensiva per Covid19 al



fronte di circa 5.000 posti letto disponibili a livello nazionale) introducendo quindi il “lockdown” con il quale si instaura il divieto di uscire di casa se non per estrema necessità come: comprare alimentari, farmaci o motivi di salute che devono essere segnati nell’autocertificazione resa disponibile dal governo e obbligatoria, insieme alla mascherina, nel momento in cui si deve lasciare la propria abitazione per i motivi sopraelencati, allo stesso tempo vi è la sospensione di ogni tipo di attività lavorativa ritenuta non essenziale [7].

Il tutto durerà fino al 4 Maggio 2020 dove grazie alla discesa della curva epidemica, in Italia comincia la tanto attesa “Fase 2” con la quale riprende il lavoro di alcune categorie e si ha la possibilità di incontrare i congiunti (termine che scatenerà non poche polemiche a livello nazionale per la sua poca chiarezza), e il lockdown vedrà la parola fine solo il 18 Maggio con l’apertura di ulteriori attività come bar e ristoranti e l’abolizione dell’autocertificazione all’interno della propria regione.

Un’apertura totale, inclusi: parrucchieri, cinema, teatri e parchi divertimento che fino ad allora si vedevano ancora negato il lavoro, arriverà il 15 Giugno 2020 insieme all’introduzione dell’applicazione per telefono chiamata Immuni con lo scopo di attivare un tracciamento digitale che ci segnali di essere entrati in contatto con un soggetto positivo al Sars-Cov-2 a patto che quest’ultimo abbia l’app attiva nel momento in cui si trova fuori dalla propria abitazione (il tutto risulterà un tentativo per lo più fallimentare per la scarsa adesione della popolazione). Durante l’estate l’Italia vedrà i numeri del contagio abbassarsi drasticamente e si avvia un tentativo di ripresa di una vita normale fino ai primi di Ottobre (2020), infatti nel 18 di questo mese scoppia la così detta “seconda ondata” che il governo tenterà di gestire con limitazioni differenti da quelle della prima basandosi per ogni regione sull’indice Rt che indica il tasso di contagiosità del virus sulla base delle misure di contenimento approvate in determinata zona, ma nonostante ciò l’Italia raggiungerà un picco di 40.902 contagi in un giorno il 13 Novembre 2020.

Una svolta significativa per la lotta alla pandemia si avrà il 21 Dicembre 2020 quando l’EMA (European Medicines Agency/Agenzia Europea del Farmaco) decide di dare il via libera al primo vaccino contro il Sars-Cov-2 prodotto dall’azienda americana Pfizer insieme alla tedesca Biontech, approvazione ottenuta poi anche dall’AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco).

Parte così il 27 Dicembre 2020 la campagna vaccinale in tutta Italia e Europa, decidendo di procedere in base alla categoria lavorativa e all'età di ogni soggetto partendo dagli operatori sanitari. In Italia comunque si registra una terza ondata che si verificherà il 26 Febbraio 2021 dopo un periodo di minor circolazione, seppur comunque presente, del virus che costringe il governo a proseguire con le restrizioni.

Con l'aumentare delle vaccinazioni e l'arrivo della stagione estiva però nel periodo di Maggio 2021 il coronavirus segue un brusco rallentamento che consentirà al paese di riaprire tutte le attività e abolire le restrizioni fino ad allora presenti come il tanto discusso coprifuoco.

Il Sars-Cov-2 lascia ad oggi un bilancio però assai negativo con circa 4,29 milioni di contagiati e 128.000 decessi ma soprattutto uno scenario incerto legato al periodo autunno-invernale 2021 dovuto anche all'alta capacità di mutazione del virus che può renderlo più o meno contagioso/aggressivo [8].

## **1.4 I dati mondiali**

La pandemia da Sars-Cov-2 ha colpito almeno 229.373.963 persone in tutto il mondo da fine Dicembre 2019, di queste, 4.705.111 sono morte.

Gli Stati Uniti sono il paese più colpito con 629.891 decessi, forse causati anche dalla sanità privata che non permette di garantire le cure a chi non possiede un'assicurazione sanitaria. Oltre agli Stati Uniti altri paesi particolarmente interessati dal fenomeno sono Brasile (575.742 morti), India (435.110), Messico (253.526) e Perù (197.921). L'OMS inoltre stima, tenendo conto dell'eccesso di mortalità legato direttamente e indirettamente al Sars-Cov-2, che il bilancio della pandemia potrebbe essere da due a tre volte superiore a quello calcolato dai dati ufficiali [9].

Inoltre i virus a RNA come i coronavirus, evolvono costantemente attraverso mutazioni del loro genoma. Mutazioni del virus Sars-Cov-2 sono state osservate in tutto il mondo fin dall'inizio della pandemia.

Mentre la maggior parte delle mutazioni non ha un impatto significativo, qualcuna può dare al virus alcune caratteristiche come ad esempio un vantaggio selettivo rispetto alle

altre, attraverso una maggiore trasmissibilità, una maggiore patogenicità con forme più severe di malattia o la possibilità di aggirare l'immunità precedentemente acquisita da un individuo o per infezione naturale o per vaccinazione. In questi casi diventano motivo di preoccupazione, e devono essere monitorate con estrema attenzione [10]. Una delle varianti che destano più preoccupazione è la cosiddetta "variante Kent", dal lignaggio B.1.1.7, ora denominata variante Alpha. Questa variante ha una trasmissibilità aumentata di circa il 50% e probabilmente aumenta la gravità della malattia acuta.

Al 30 giugno 2021, la variante Alpha è stata confermata in più di 275.000 casi nel Regno Unito e si è diffusa in almeno 136 paesi in tutto il mondo. Altre varianti di interesse o oggetto di indagine sono le così dette: Beta, Gamma, Zeta, Theta e Kappa.

Nuove mutazioni del Sars-Cov-2 continueranno ad emergere e diffondersi man mano che avanziamo attraverso la pandemia, ad esempio, sono emerse le varianti Eta e Delta quest'ultima trova origine in India e considerata a rapida diffusione [9]. Tutto ciò è stato reso possibile grazie ad un'errata gestione della fase iniziale della pandemia, tra ritardi nella comunicazione di dati e scelte sbagliate come il mancato blocco dei trasporti internazionali, probabilmente serbatoi di molteplici inizi di diffusione in tutto il mondo.

## Capitolo 2

### 2.1 La Covid19

La patologia da Sars-Cov-2 presenta varietà nella sintomatologia e nei tempi di manifestazione. Dal momento in cui si entra in contatto con un soggetto portatore del virus i tempi di incubazione sono variabili: da 1 a 14 giorni, in media i sintomi insorgono dopo 5 giorni. Approssimativamente l'80% dei contagiati presenta un quadro di blando malessere o di non sintomatologia, il 14% dei casi è caratterizzato da una patologia severa e il 5% subisce invece manifestazioni critiche; la variabilità della gravità del quadro è associata all'età avanzata e a comorbidità sottostanti e preesistenti.

I meccanismi fisiopatologici predominanti della malattia da Sars-Cov-2 in fase acuta includono:

- 1-Tossicità virale diretta con danno endoteliale e danno microvascolare;
- 2-Disregolazione del sistema immunitario e stimolazione di uno stato iperinflammatorio;
- 3-Ipercoagulabilità con conseguente trombosi in situ;
- 4-Disadattamento della via dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) [11];

Ciò si traduce in una sintomatologia più comune che risulta essere: febbre, tosse, dispnea, mialgia, fatigue e in alcuni casi anche: mal di gola, rinorrea, cefalea e confusione. In minoranza, si possono verificare: diarrea, emottisi, addominalgia e, talvolta, riduzione dell'olfatto e del gusto, mentre nelle condizioni più gravi il tutto può evolvere in Sindrome acuta respiratoria o polmonite che nel caso del Sars-Cov-2 si presenta in modo aggressivo e di tipo bilaterale da un punto di vista radiologico [7].

### 2.2 Gli attuali metodi di screening

Ad oggi possiamo aver accesso a molteplici metodi di diagnosi di infezione da Sars-Cov-2, questi variano in tipologia, sensibilità, costo e tempo di risposta. Tampone molecolare o antigenico, test salivare e prelievo ematico con ricerca sierologica sono i quattro metodi al momento disponibili per individuare la presenza di un'infezione da Covid19, in corso o pregressa. Il **tampone molecolare** o Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) naso-faringeo è il metodo Gold standard per la diagnosi di Covid19, almeno

durante i primi giorni della malattia, quando la sensibilità e la specificità di questo tipo di test sono quasi ottimali. L'esame consiste in un prelievo di muco dalla sezione del rinofaringe e dell'orofaringe introducendo prima nelle narici poi nella bocca un bastoncino cotonato utilizzato per il prelevamento del materiale biologico.

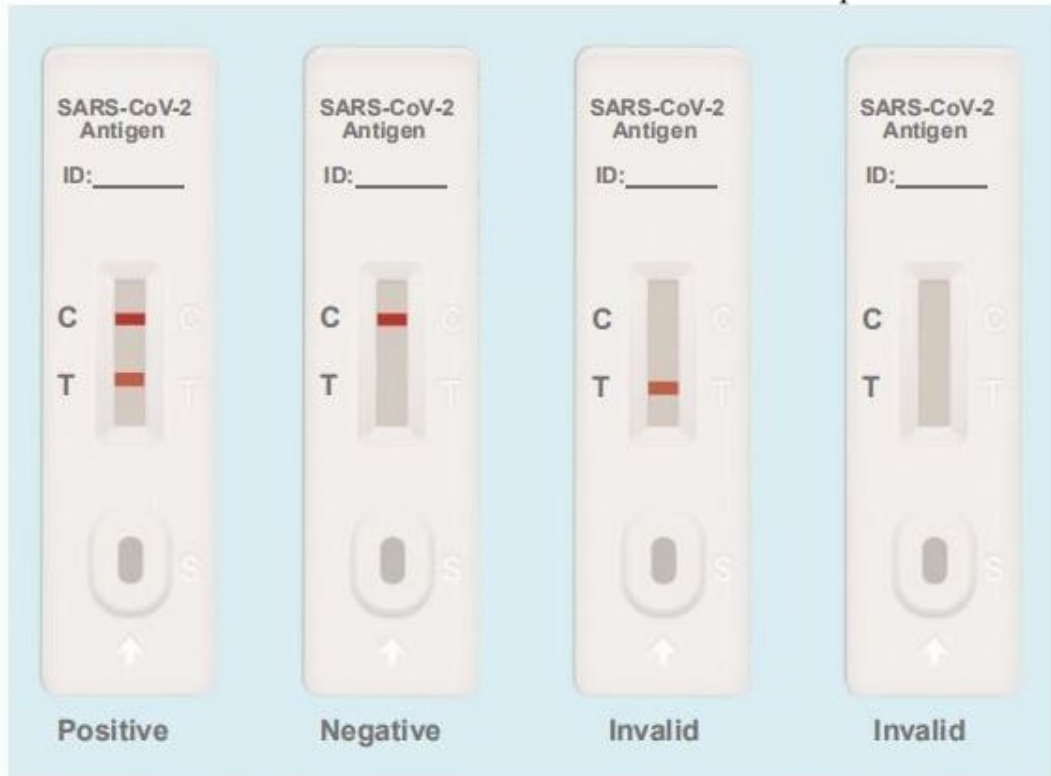
Una volta che il tampone è a contatto con la parete nasofaringea e orofaringea, viene ruotato più volte, tenuto a contatto per alcuni secondi per assorbire le secrezioni, quindi estratto con un movimento rotatorio. E' una pratica non dolorosa ma fastidiosa per il soggetto. Il tampone viene poi inserito all'interno di una provetta contenente soluzione fisiologica e inattivante il virus, che viene poi sigillata e inviato in laboratorio dove si procede all'estrazione, alla purificazione e alla ricerca dell'RNA virale nel muco prelevato.

Il test risulta avere ad oggi una specificità del 100% ed un'affidabilità del 98%. Tuttavia, la RT-PCR presenta diversi inconvenienti come: la raccolta del campione che espone l'operatore sanitario a un possibile contatto diretto con una persona infetta; la necessità di attrezzature come il termociclatore che consente di eseguire cicli di amplificazione degli acidi nucleici secondo parametri definiti di temperatura e tempo che alternando calore a fasi di raffreddamento del campione, permettono di estrarre l'RNA dal materiale. Il macchinario presenta però un prezzo assai elevato e non è reperibile in ogni struttura pubblica o privata; inoltre il costo del tampone rimane alto (circa 60-70 euro). L'utilizzo di questo test comporta un ritardo nell'ottenimento dei risultati in quanto l'esito arriva mediamente dopo 24-48 ore [12-13]. Per questi motivi, sono stati sviluppati e sono disponibili da diversi mesi i **test antigenici** detti anche test rapidi Sars-Cov-2 (SC2-RAT). Questo test rileva la presenza della nucleoproteina del Sars-Cov-2 in un campione naso-faringeo con anticorpi monoclonali specifici. In breve, dopo il prelievo che prevede la raccolta di materiale soltanto dalla sezione rinofaringea con la medesima modalità del tampone molecolare, il campione viene immerso in 0,3 mL (10 gocce) di reagente per 1 minuto.

Quindi, 100 µL (microlitri), circa quattro gocce, vengono fatti cadere nella striscia reattiva del dispositivo e il risultato viene letto nella finestra apposita dopo 15 min. massimo; due

righe (C e T) indicano un risultato positivo; una riga (C) indica un risultato negativo.

## Testing Results



[Immagine 1: Esempio di lettura ed esito di un test antigenico]

Questo metodo ha già ottenuto la certificazione CE per gli standard di salute, sicurezza e protezione ambientale [12]. Il test rapido, è stato recentemente introdotto per le situazioni dove è importante avere una risposta in tempi brevi, viene utilizzato ad esempio per lo screening negli aeroporti. I test antigenici esistono in versione POCT (Point Of Care Test) ovvero eseguibili ed analizzabili nel luogo di esecuzione o in versione “da laboratorio” che richiedono attrezzature di laboratorio specifiche per l’analisi del campione prelevato. La sensibilità e specificità di questo test sono inferiori a quelle di un tampone molecolare, quindi le diagnosi di positività devono essere confermate da un secondo tampone che implementa ancor di più i costi e il disagio per il soggetto.

Recentemente è stato introdotto anche il **test salivare** come potenziale campione per la rilevazione di infezione da Sars-Cov-2. La raccolta del campione di saliva è una procedura pratica, economica e non invasiva e comporta un basso rischio di trasmissione di malattie agli operatori sanitari. Inoltre può anche essere raccolto autonomamente,

consentendo il monitoraggio regolare della carica virale e lo screening di grandi popolazioni [14].

I campioni di saliva possono essere eterogenei: saliva orale e saliva orofaringea posteriore. Viene preso un campione di saliva con un cotton fioc, si appoggia quest'ultimo sulla striscia reattiva e in tre minuti, con l'utilizzo congiunto di tre reagenti, il tampone restituisce il risultato (stessa modalità di interpretazione del test antigenico), il test può anche essere effettuato in maniera laboratoristica ricercando nella saliva l'RNA virale (Test Molecolare Salivare), quest'ultimo fornisce il risultato in circa 24 ore. Il campione di saliva può però presentare delle inconvenienze legate alla presenza di muco, sangue o residui alimentari che possono falsificare l'esito dell'esame.

Per cui le diverse tecniche e sedi di raccolta hanno un impatto sulla sensibilità che risulta essere compresa tra il 53 e il 73% [15].

Infine l'ultimo metodo utilizzabile per ricercare la presenza di un'eventuale infezione da Sars-Cov-2 è attraverso l'esecuzione di un prelievo ematico con **ricerca sierologica** standard di tipo quantitativo per cui in grado di quantificare la risposta anticorpale. Il test prevede la ricerca di due tipi di immunoglobuline che indicano la presenza di anticorpi, le IgM e le IgG. I primi anticorpi ad essere prodotti in seguito al contatto con un agente estraneo sono le IgM presenti nel sangue dopo circa 10-15 giorni dall'inizio dell'infezione. Le IgG invece hanno un'impennata nella loro produzione generalmente dopo qualche settimana dall'infezione, in seguito il loro valore cala fino a stabilizzarsi. Esse hanno il compito di garantire una risposta immunitaria pronta in caso di una nuova possibile esposizione allo stesso microrganismo.

La sieroconversione di anticorpi specifici IgM e IgG è stata osservata, nel caso di infezione da Sars-Cov-2, già dal 4° giorno dopo l'insorgenza dei sintomi. Gli anticorpi possono essere rilevati nella fase intermedia e nelle fasi successive della malattia. Se una persona con sintomatologia sospetta per Covid19 rimane negativa al test RT-PCR e se i sintomi sono presenti per almeno diversi giorni, la ricerca di anticorpi può essere utile per fare diagnosi. Tuttavia, il test sierologico non è escluso da bias in quanto l'eterogeneità molecolare dei sottotipi del Sars-Cov-2, le prestazioni imperfette dei test disponibili e la reattività incrociata con gli altri coronavirus stagionali devono essere considerate come possibili fonti di falsi positivi.

Secondo un'analisi Cochrane su 57 pubblicazioni con 15.976 campioni ematici, la sensibilità dei test anticorpali è troppo bassa nella prima settimana dall'insorgenza dei sintomi per avere un ruolo primario nella diagnosi di Covid19, ma allo stesso tempo questi test possono ancora avere un ruolo complementare ad altri esami in individui con sintomatologia sospetta [16].

Il costo di tale esame rimane comunque alto in quanto si aggira intorno ai 40 euro e per avere un esito si devono attendere almeno 48 ore.

Oltre al test sierologico standard di tipo quantitativo esistono anche test sierologici di tipo qualitativo eseguibili in autonomia tramite l'esecuzione di un prelievo capillare. Questi garantiscono una risposta in 15 minuti indicando semplicemente la presenza o meno di anticorpi senza quantificarne un valore, sono disponibili a prezzi minori, ma allo stesso tempo sono anche meno affidabili [17].

### **2.3 Importanza ed organizzazione dei metodi di screening**

Le attività di identificazione e gestione dei contatti dei casi probabili o confermati di Covid19, mediante quarantena e sorveglianza attiva, hanno lo scopo di individuare e isolare tempestivamente i casi secondari, in modo da interrompere le catene di trasmissione, fondamentale per evitare il progredire della malattia e l'aumento dei ricoveri, specialmente quelli in terapia intensiva dove il numero dei posti letto è più limitato rispetto a quelli di una degenza ordinaria.

Finora oltre all'esecuzione volontaria del tampone molecolare o antigenico in strutture private, l'attività di screening è stata organizzata mediante lo svolgimento di tamponi naso-faringei in soggetti considerati, dalle unità competenti che svolgono l'attività di "contact tracing", contatti stretti di soggetti positivi e quindi a rischio. I tamponi sono stati organizzati in due modalità: a domicilio o nei "drive in".

In entrambi i casi sono stati eseguiti dal personale infermieristico adeguatamente formato. L'operatività segue più step:

1-L'organo competente individua il "caso sospetto", effettua il contact tracing e lo segnala alla centrale operativa territoriale.



2-Viene fissato l'appuntamento per l'esecuzione del tampone e viene contattata la persona da testare

3-Viene informato il soggetto su data, orario e modalità di esecuzione del tampone.

4-In caso di modalità "drive in" la tecnica prevede l'esecuzione del tampone attraverso il finestrino aperto dell'automobile su cui permane il paziente, riducendo così il rischio di esposizione all'eventuale contagio per il personale sanitario o per altri pazienti.

5-Tutti i campioni raccolti in giornata vengono inviati al laboratorio di riferimento e analizzati, successivamente l'esito viene comunicato via email o pubblicato in siti appositi dove è possibile entrare con credenziali personali consegnate al momento del tampone [18].

A fronte di un rilevante sforzo organizzativo iniziale nel reperire e coordinare in modo ottimale le molteplici figure professionali, il modello drive in presenta molteplici punti di forza come la riduzione dei tempi di attesa e l'affollamento nei siti di prelievo, contribuendo quindi ad un minor rischio di trasmissione del virus tra gli utenti. Inoltre viene ridotto il consumo di DPI e si concorre al controllo dei costi sostenuti dal SSN (Sistema Sanitario Nazionale).

Il modello drive in rappresenta quindi uno strumento vantaggioso in contesti di malattie infettive diffuse come l'attuale pandemia, poiché i pazienti rimangono nella loro auto garantendo il distanziamento necessario a limitare il contagio e limitando la trasmissione del virus ai soli membri della stessa unità familiare o comunque alla ristretta cerchia di contatti dell'individuo [19].

## Capitolo 3

### 3.1 Il progetto C19-screendog

I metodi tradizionali per le diagnosi delle malattie prevedono l'utilizzo di esami e test che risultano essere, come elencato nel capitolo precedente invasivi, quindi dolorosi o fastidiosi ed inoltre come nel caso del Sars-Cov-2, i risultati non sono immediati e prevedono un costo elevato. Per tale motivo la ricerca è sempre più indirizzata verso metodi di diagnosi non invasivi specialmente nella pratica clinica routinaria. Il progetto si basa sul riconoscimento delle sostanze volatili, definite VOC, che caratterizzano l'odore del nostro corpo.

Queste sono prodotte da una moltitudine di tipi cellulari attraverso molteplici processi metabolici che nel complesso costituiscono il volatiloma e i campioni biologici più ricchi di VOC sono: l'espriato, il sudore, l'urina, il sangue, le feci e le secrezioni vaginali. In molte patologie umane si osserva un cambiamento del volatiloma con produzione specifica di alcuni VOC e, tra queste troviamo quelle causate da agenti eziologici di natura microbiologica come: batteri (colera, difterite, scarlattina, tubercolosi, tifo, polmoniti), funghi (polmoniti) e virus (polmoniti, vaiolo, febbre gialla); i tumori (mammella, polmone, vescica, leucemie); le malattie metaboliche (diabete) e anche quelle ereditarie (fenilchetonuria) [20-21].

I VOC sono identificabili e quantificabili con strumentazioni di laboratorio apposite e sofisticate come la gas-cromatografia e la spettrofotometria di massa ma un altro metodo sicuramente meno sofisticato e più economico, è quello dell'utilizzo dell'olfatto. Quest'ultimo veniva già utilizzato da medici nel 400 a. C. per diagnosticare determinati tipi di malattie [22]. Tuttavia l'olfatto umano presenta dei grossi limiti al contrario di quello del cane, tale infatti è molto più sviluppato e sensibile, tanto da avere un limite inferiore di rilevamento dei VOC a concentrazioni di una parte per trilione (ppt) [23] (Walker DB, 2006); limite che è di tre ordini di grandezza più sensibile rispetto agli strumenti ad oggi disponibili, per rendere l'idea, un cane sarebbe in grado di rilevare l'equivalente di una goccia in un volume corrispondente a quello di 20 piscine olimpioniche.

I VOC sono emessi in concentrazioni corrispondenti a parti per bilione/trilione (ppb/ppt) nell'alito umano e parti per milione/bilione (ppm/ppb) nel sangue umano e nelle urine indicando che la maggior parte dei VOC sono presenti nel volatiloma a concentrazioni che rientrano nel range delle capacità di un cane da rilevamento [24]. Questi cani, grazie alla loro grande sensibilità del sistema olfattivo e alla predisposizione all'addestramento, sono stati utilizzati per decenni nella ricerca di particolari sostanze odorose come: droghe, armi, esplosivi, persone in vita e cadaveri o altre tracce biologiche. L'uso dei cani offre notevoli vantaggi poiché questi riescono ad esaminare efficientemente centinaia di campioni in aree estese, il che è molto utile nella ricerca di tracce in grossi gruppi di animali, persone o oggetti (come ad esempio negli aeroporti) [24]. Inoltre i sistemi di rilevamento canini, oltre ad essere estremamente sensibili, sono spontaneamente mobili: infatti i cani possono sentire la traccia odorosa direttamente dalla sua fonte e sono capaci di muoversi verso di essa; non vi sono finora strumenti conosciuti che hanno tutte queste caratteristiche indispensabili in condizioni emergenziali e ambientali difficili e/o quando le risorse sono limitate [24].

In uno studio pilota pubblicato nel 2016, è stato dimostrato come i cani adeguatamente addestrati, possano distinguere tra cellule infette *in vitro* con diversi virus - BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), BHV1 (Bovine Herpes Virus 1) e BPIV3 (Bovine Parainfluenza Virus 3) - e cellule non infette, con sensibilità e specificità molto elevate, suggerendo il loro utilizzo come "tecnologia real time" di rilevamento virus. Gli stessi autori suggeriscono che la capacità di discriminare tra campioni positivi e negativi è plausibilmente dovuta alla produzione di cellule VOC specifiche da parte delle cellule infette [25].

Nella pandemia di Sars-Cov-2 sistemi di identificazioni mobili real time sono assolutamente necessari per identificare quante più persone positive nel minor tempo possibile considerando anche la ancora non totale copertura vaccinale della popolazione. Due recentissimi lavori hanno valutato la capacità dei cani di identificare soggetti positivi al Sars-Cov-2 utilizzando campioni di saliva, secrezioni tracheobronchiali o sudore ascellare.

Nel primo studio randomizzato, doppio cieco e controllato, otto cani da rilevamento sono stati addestrati per una settimana per rilevare il virus nella saliva o nelle secrezioni

tracheobronchiali di pazienti infetti sintomatici e ricoverati per Covid19. I cani sono stati in grado di discriminare tra campioni di soggetti positivi e negativi (1012 campioni totali) con sensibilità diagnostica media del 82,63% e specificità del 96,35% [26].

Nell'altro studio, multicentrico, è stata valutata la capacità di 18 cani addestrati di riconoscere specificatamente l'odore del sudore ascellare prodotto da soggetti ricoverati per Covid19 e quindi positivi rispetto a negativi per altre patologie (198 campioni totali ottenuti in differenti ospedali).

Per ogni cane coinvolto, l'acquisizione dell'odore specifico dei campioni di sudore Covid19 ha richiesto solamente da una a quattro ore e al termine dell'addestramento le percentuali di successo dei cani nel trovare il campione positivo in una linea contenente diversi altri campioni negativi è stata variabile dall'83% al 100% a seconda del cane. Il materiale è stato campionato utilizzando tamponi di garza sterili, filtri di garza e tubi polimerici inerti usualmente impiegati per il rilevamento di esplosivi, droghe o criminologia. I dati sono molto incoraggianti ed indicano che l'odore del sudore ascellare di persone con Covid19 è diverso, e che i cani possono rilevare una persona infetta dal virus Sars-Cov-2 [27]. Un'informazione importante da non trascurare è che una ricerca recentissima indica che il sudore ascellare, così come quello della fronte, prelevato tramite tamponi e analizzato mediante analisi molecolare (RT-PCR), non contiene tracce di Sars-Cov-2, e non rappresenterebbe dunque un vettore di trasmissione del virus (sebbene gli stessi autori della ricerca sottolineino l'importanza di prendere comunque precauzioni generali durante l'esecuzione di procedure interventistiche) [28]. Un editoriale pubblicato su Nature a Novembre 2020 dedicato a questa linea di indagine ha puntualizzato la sua importanza e quanto la validazione di questi dati e protocolli possa essere utile ad identificare soggetti positivi in luoghi pubblici o affollati o in paesi poveri. Sono attualmente in atto esperimenti negli aeroporti degli Emirati Arabi, della Finlandia e del Libano dove vengono utilizzati cani addestrati a rilevare il Sars-Cov-2 nel sudore dei passeggeri che vengono poi controllati con test convenzionali. Sarkis, uno dei ricercatori che ha collaborato allo studio del gruppo di Grandjean citato precedentemente [27], sostiene di aver utilizzato i due migliori cani per testare in Libano 1680 passeggeri trovando tra questi 158 casi Covid, confermati poi dal test molecolare (PCR). Il dato ha una valenza importantissima considerando che i cani hanno identificato correttamente

tutti i casi negativi con un'accuratezza del 100% e identificato correttamente il 92% dei casi positivi [29].

È importante capire come impiegare i cani e addestrarli per questo scopo. I ricercatori selezionano i cani con spiccate capacità olfattive, propensione innata nella ricerca di campioni biologici e un insieme calcolato di abilità metodiche. Bisogna tuttavia tener presente che non tutti i VOC emessi dall'organismo sono frutto del metabolismo del corpo umano: fattori modificabili quali cibi, bevande, medicazioni, farmaci, prodotti assorbiti tramite la pelle o tramite il respiro, come nel caso del fumo di sigaretta, possono variare la composizione del volatiloma; mentre altri fattori non modificabili (sesso ed età) possono variarne la concentrazione [24]. Anche Pleil [30] ha mostrato come i composti esogeni possano compromettere i VOC emessi da un organismo, pertanto nelle fasi di reclutamento è bene tener presenti queste variabili. I cani riescono a sentire il volatiloma principalmente in due modi: negli oggetti statici come contenitori dei campioni di laboratorio, oppure attivamente nell'ambiente seguendo una pista. Per questo ultimo caso, è importante cercare di capire il movimento del volatiloma per massimizzare al meglio la capacità del cane di cercare la traccia desiderata. Craven et al. In due studi nel 2006 e 2014 si sono dedicati a comprendere il movimento dei VOC all'interno del cosiddetto "plume termale umano", ossia quel gradiente di temperatura che si forma tra il corpo umano e l'ambiente esterno, quindi quella differenza di temperatura che provoca una corrente convettiva attorno alla persona che trasporta con sé, oltre a numerose sostanze come le cellule morte della pelle, o le particelle depositate sul pavimento, anche i VOC. Questo movimento ipotizzato dei VOC all'interno del plume termale dovrebbe essere tenuto in considerazione poiché potrebbe ancor di più aiutare nell'ottimizzazione del loro rilevamento tramite i cani [24]. Uno studio recentemente pubblicato ha dimostrato come l'attività svolta da questi cani non comporti nessun tipo di stress in questi soggetti, che peraltro vivono l'esperienza come un'attività ludica [31].

### **3.2 Obiettivi dello studio**

L'obiettivo di questo studio multicentrico esplorativo prospettico è quello di validare i protocolli per l'utilizzo di cani da allerta esperti per l'identificazione rapida di soggetti positivi al Sars-Cov-2 in luoghi dove il virus potrebbe diffondersi rapidamente, come le scuole di qualsiasi ordine e grado, comprese le università. Queste rappresentano infatti un luogo di aggregazione importante e per questo penalizzate da chiusure forzate.

Il progetto è stato suddiviso in 4 fasi:

1. Raccolta dei campioni di sudore ascellare da soggetti positivi e negativi che si sottopongono a tampone molecolare presso strutture dell'ASUR e ATS nel percorso prima diagnosi (drive in, domicilio o strutture mobili) e il cui esito viene tempestivamente comunicato al servizio di igiene pubblica per la fase di addestramento dei cani. Tali campioni, raccolti tramite piccoli tubi polimerici atossici, verranno conservati in appositi frigoriferi in una delle strutture messe a disposizione dall'ASUR, ATS o dall'università Politecnica delle Marche.
2. Addestramento dei cani: in questa seconda fase i cani sono stati addestrati nell'identificare correttamente i campioni positivi e a discriminarli da quelli negativi da esperti cinofili appartenenti ad associazioni già operanti nel campo sanitario ed investigativo nel territorio nazionale. Contestualmente è stato valutato il livello di stress dei cani utilizzati in questa attività, tramite l'impiego di indicatori clinici oggettivamente rilevabili (descritti nel protocollo).
3. Validazione dell'addestramento e del test: in questa terza fase attualmente in corso i cani vengono portati nelle strutture dove si eseguono tamponi per l'analisi molecolare, e si analizza il loro comportamento per valutare e quindi validare l'efficacia dell'addestramento su un numero di soggetti statisticamente significativo (numero che attualmente in base ai dati epidemiologici si aggira intorno a 1500) : i cani vengono condotti dall'addestratore vicino al soggetto che si sottopone a tampone e tutti i dati comportamentali (risposta positiva o negativa) collezionati e registrati vengono confrontati con quelli dell'esito del test molecolare per valutare la sensibilità e la specificità del test C19-screendog. Verranno scelti i cani che avranno dato risposta

migliore per la successiva fase. Anche in questo caso, verrà valutato il livello di stress dei cani utilizzati in questa attività.

4. Validazione del test: il test potrà essere validato in ambienti tipo, diversi dai punti di screening, come l'università o le abitazioni. In questa ultima fase infatti si testa la capacità dei cani di avvicinare soggetti positivi e indicarli come tali. I cani verranno accompagnati in aule campione dove saranno presenti dei figuranti portatori di campioni positivi, successivamente nelle case dove sono presenti soggetti positivi in quarantena e familiari conviventi appena "tamponati" (segnalati dall'asur) o nei piccoli comuni per lo screening di popolazione previa autorizzazione dei sindaci.

### **3.3 Unità Operative partecipanti**

Questo studio vede la partecipazione di più unità operative (UO), alcune delle quali in regioni diverse dalla nostra (Veneto, Sardegna), rappresentate da associazioni cinofile esperte nel campo dell'addestramento di cani da rilevamento, università e strutture ASUR. Il **Promotore** è la: Prof.ssa Maria Rita Ripponi (Professore associato in Scienze Tecniche e Medicina di Laboratorio e Presidente del CdL Inf. MC), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari; laboratorio di Patologia Sperimentale e Corso di Laurea in Infermieristica, Polo di Macerata (MC).

Le unità operative partecipanti sono:

**UO1: Sperimentatore Principale (PI)** Prof. Antonio Domenico Procopio (Professore ordinario di Patologia Generale), Direttore del Laboratorio di Patologia Sperimentale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Facoltà di Medicina e Chirurgia. Il prof Procopio si avvale dell'esperienza dei Suoi collaboratori, Prof.ssa Fabiola Olivieri (Professore Ordinario di Patologia Generale e Direttore della Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica), il Dott. Jacopo Sabbatinelli (specializzando in Patologia Clinica) e la Dott.ssa Angelica Giuliani (Assegnista). L'UO1 si avvarrà inoltre dell'aiuto delle dottoresse Rita Fiorentini (Direttore delle attività didattiche professionalizzanti) e Stefania Liberati (tutor a tempo pieno) del CdL Infermieristica (MC).

**UO2: Area vasta 3, Regione Marche:** Referente Dott.ssa Daniela Corsi (Direttore AV3), Dott. Alberto Tibaldi (Dipartimento Prevenzione di AV3).

**UO3: ASSL Sassari. Referenti:** Dott. (veter.) Franco Sgarangella (Direttore del Dip. di Prevenzione e coordinatore dell'unità di crisi COVID), Dott.ssa Francesca Soggiu (P.O.A. Ozieri, ATS -Azienda per la Tutela della Salute ed educatore cinofilo nel centro Semplicementecane affiliato alla UO4 Progetto Serena Onlus), Dott.ssa Sebastiana Mossa, Dott.ssa Lina Raspa (primario Laboratorio Analisi P.O.A Ozieri) e dott. Ciriaco Ligios (veter), (Direttore Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna subcontractor del dipartimento di prevenzione diretto da Sgarangella).

**UO4: Progetto Serena Onlus (VR).** Questa associazione ha proposto il progetto e collabora già con l'UO4. Progetto Serena vanta una pluriennale esperienza nel campo rilevamento per il diabete di cui ha allestito i protocolli (protocollo allerta diabete) e il cui obiettivo è quello di riuscire a far avere a tutti coloro che convivono con questa malattia cronica un cane allerta per le crisi ipo/iperglicemiche. L'associazione è attiva con numerose collaborazioni a livello nazionale e in Spagna e vanta più di cento addestratori e 150 cani esperti. Dal 2019 è in corso una ricerca scientifica per portare al riconoscimento del cane allerta nel diabete, come importante supporto per chi vive la patologia, con l'Università di Verona, guidata dal Professore Enzo Bonor. I referenti per questo progetto sono il suo fondatore, Roberto Zampieri, e la sua collaboratrice Sara Calgaro. Progetto Serena ONLUS A.P.S., C.F.: 91022710239 - via Udine, 35 ± 30020 Cinto Caomaggiore (VE) TEL.0442/1908049 - CELL.392 3851354 ± info@progettoserenaonlus.it ± www.progettoserenaonlus.it.

**UO5: Cluana Dog (Civitanova Marche, MC),** collabora con la protezione civile, esperta nell'addestramento di cani da soccorso. I referenti, proponenti questo progetto insieme alle altre associazioni con le quali è già in contatto, sono Andrea Arbuatti ed Emanuele Baldoni. <https://cluanaadog.it/lassociazione/> cinofilo Semplicementecane ASD, Castelsardo (SS), affiliata a Progetto Serena Onlus APS.

**UO6: UNICAM, Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria.** Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD). Referenti Andrea Spaterna (professore ordinario in semeiotica e patologia medica veterinaria, direttore sanitario OVUD e Prorettore con delega a Cooperazione Territoriale e Terza Missione); Riccardo Benedetti (Medico Veterinario), Andrea Marchegiani (Ricercatore a tempo determinato tipo A nel settore



clinica medica veterinaria), Alessandro Malfatti (Professore Associato di Fisiologia Veterinaria -Veterinary Physiology, Animal Behaviour and Welfare-).

**UO7:** Rosario Grimaldi, responsabile del portale di divulgazione “Ilmiocane” (<https://www.ilmiocane.org>). Il ruolo della UO sarà quello di promozione, informazione e crowdfunding.



[Immagine 2: Le UO partecipanti al progetto]

### 3.4 Protocollo

**-I cani da rilevamento:** I cinofili esperti hanno scelto i cani, meticci o di razza, con caratteristiche molto improntate sotto l’aspetto esplorativo ed olfattivo, ma con una tempratura ed un temperamento medio in quanto, se questi ultimi due fossero troppo bassi o troppo elevati, potrebbero creare difficoltà nel lavoro soprattutto nelle fasi di validazione. I cani utilizzati sono tutti di proprietà dei conduttori/addestratori (cinofili con brevetto) e conviventi. I cani sono stati preparati a riconoscere particolari VOC attraverso un meticoloso lavoro di discriminazione olfattiva che permette loro di memorizzarli. Per questo studio in ogni fase di sperimentazione il benessere dei cani è stato valutato dall’UO7 mediante invio di documentazione e filmati, oltre ad assistere ad alcune sessioni di addestramento e di validazione ai drive in.

**-Raccolta, distribuzione e conservazione dei campioni di sudore:** i campioni da utilizzare nella fase di addestramento sono stati raccolti posizionando per 10 minuti piccoli tubi polimerici (dimensione, 3.5 lunghezza e 0.5 diametro) sotto l'ascella di soggetti volontari (2 tubi sotto la stessa ascella per ogni soggetto), che dovevano effettuare il tampone naso-faringeo per il test molecolare (RT-PCR) nel percorso prima diagnosi (drive in allestiti dall'AV3 della Regione Marche (UO2) e ASSL Sassari (UO3) o domicilio). Tali tubicini (Getxent, <https://getxent.com>, brevetto europeo), atossici e latex free, hanno la caratteristica di assorbire i VOC, sono commerciali e sono già stati utilizzati sull'uomo nello studio di Grandjean pubblicato su Plos One per il rilevamento del Sars-Cov-2, e approvati dai comitati etici cui fa riferimento lo studio: Institutional review board: APHP (Assistance Publique Hopitaux de Paris) Biosafety committee approval: ENVA (Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort) Ethic committee approval: ENVA (Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort) Scientific committee approval: APHP (Assistance Publique Hopitaux de Paris) and Hopital d'Instruction des Armees Begin Approval of the research and form of consent obtained: name "COVIDOG" by APHP (Assistance Publique Hopitaux de Paris global project "COVIDeF") [27]. I soggetti disposti a sottoporsi a prelievo di sudore hanno sottoscritto il consenso informato [allegato 1] ed è stata compilata la scheda anamnestica [allegato 2] al momento del prelievo naso-faringeo. Personale infermieristico qualificato, munito di tutti i dispositivi di protezione individuale (DPI), in servizio presso le UO1, 2 e 3 ha effettuato il prelievo di campione di sudore contestualmente al tampone molecolare. I campioni appena prelevati sono stati inseriti in apposite provette e quindi in buste biohazard e conservati a temperatura controllata (4°C) nel laboratorio di Patologia Sperimentale di UNIVPM (UO1) e nel laboratorio analisi dell'ospedale di Ozieri (UO3). I campioni poco prima dell'addestramento vengono inseriti in appositi contenitori metallici forati e portati a temperatura ambiente per poi essere nuovamente riposti a 4°C per essere riutilizzati (un campione può essere utilizzato numerose volte entro un periodo di 2 mesi dalla data del prelievo).

**-Addestramento dei cani:** *Step 1: Imprinting del cane:* per questa operazione per ogni cane sono necessari un numero massimo di 5 campioni positivi e 5 negativi prelevati da soggetti diversi [27]. Poiché le UO cinofile sono 3, Progetto Serena Onlus (VR), Cluana Dog (MC) e SemplicementeCane (SS, affiliato a Progetto Serena Onlus) e poiché per i

cani della stessa UO cinofila si possono usare gli stessi campioni, il numero di campioni positivi e negativi diversi collezionati in questa fase è pari a 15+15. In questa fase il cinofilo insegna al cane a riconoscere il campione positivo premiandolo ogni volta che il cane lo annusa e inserendo la segnalazione, la migliore delle quali si presenta come una zampatina sul conduttore: in pratica quando l'addestratore è certo che il cane sappia riconoscere bene la molecola, farà in modo che il cane si giri verso di lui, zampando per chiedere il premio. Grazie ad una serie di sequenze in cui il cane viene premiato ed elogiato solo quando segnala il campione positivo e incoraggiato con un "bravo tranquillo" quando annusa quello negativo, si arriva all'obiettivo. Nell'ultima fase, il conduttore non deve conoscere dove sono locati i campioni negativi e positivi per evitare, anche involontariamente, di spronare il cane sul campione positivo. Il lavoro può proseguire ininterrottamente fino ai primi segnali di stress o difficoltà, quindi va tolta la pettorina o collare e tante feste dando un comando tipo "finito". Ovviamente questo lavoro andrà ripetuto finché il cane non opererà in sicurezza. Una volta arrivati al risultato corretto al 100% si prosegue con la fase successiva di consolidamento. *Step 2: Consolidamento dell'imprinting*: la fase di consolidamento è rappresentata da un maggior grado di difficoltà. In questa fase saranno necessari un maggior numero di campioni, per ogni cane 5 positivi e 15 negativi (in rapporto 1:3), il numero totale di campioni necessario sarà quindi pari a 15+45. In pratica si ripeterà la procedura descritta per l'imprinting, aumentando via via il numero di campioni da riconoscere (da 3 a 5), distribuendoli in ordine random e cambiandone l'ordine ad ogni passo successivo. *Step 3: Valutazione dell'efficacia dell'imprinting*: terminata la fase operativa dell'imprinting ne verrà valutata l'efficacia sia operativa (il cane accetta volentieri la metodologia di lavoro) che di assenza di errori (100% di risposte corrette). In caso di successo si può procedere con la fase 3 del progetto), altrimenti si deve riprendere la fase di imprinting dall'inizio. Il protocollo si basa sulle ricerche svolte recentemente [26-27] ed è stato messo a punto da Roberto Zampieri (UO4) da anni già attivo con la sua associazione [www.progettoserenaonlus.it](http://www.progettoserenaonlus.it) nell'addestramento di cani per l'allerta diabete con i quali segue una procedura simile. I dettagli del protocollo non possono ancora essere resi noti poiché sono oggetto di valutazione e di futura pubblicazione scientifica

**-Validazione dell'addestramento al drive in.** I cani che hanno superato al 100% la fase di imprinting vengono condotti dai loro proprietari cinofili (gli stessi che li avranno

addestrati) ai drive in allestiti dall'AV3 (UO2), dalla ASSL di Sassari (UO3). Ai cani, al guinzaglio e con la museruola, vengono presentati i soggetti che si sottopongono al test molecolare (e identificati anonimamente con lo stesso codice del test) e che acconsentono a partecipare allo studio e firmano il consenso informato [Allegato 1] e per i quali viene compilata la scheda anamnestica [Allegato 2] al momento del prelievo per il test molecolare. In questa fase non è prevista nessuna procedura di prelievo campione di sudore ma viene registrata la risposta del cane (positiva/negativa) di fronte al soggetto testato in apposita tabella. I dati vengono quindi confrontati con quelli del referto del tampone molecolare. Per la stima della dimensione campionaria, si è ipotizzata una soglia di sensibilità del test diagnostico pari al 90%, in linea con la raccomandazione del Consiglio Europeo n. 5451 del 2021 sull'uso e la validità dei test diagnostici rapidi per Covid19 (<https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-5451-2021-INIT/en/pdf>). Assumendo un errore  $\alpha$  di 0.05, una potenza (1- $\beta$ ) del 90%, un margine di errore del 15% e un tasso di prevalenza del 7%, determinato in base alla percentuale di tamponi molecolari positivi per Covid19 ad Aprile 2021, sarà necessario reclutare un totale di 929 soggetti, per 65 dei quali è attesa una positività al tampone molecolare. Nell'analisi dei dati verranno considerati genere, età e pregressa vaccinazione anti covid. I test vengono sempre fatti con la presenza di due cani, in quanto nel caso di positività si fa intervenire il secondo per conferma mentre, nella normalità, se l'afflusso di persone è consistente, ogni 20 minuti il cane tester deve essere fatto riposare e giocare per altrettanto spazio di tempo.

**-Simulazione scuola.** Poiché uno degli obiettivi di questo progetto è quello di validare un metodo per poter effettuare screening real time in luoghi come le scuole, verranno utilizzati dei figuranti e aule del corso di laurea di infermieristica UNIVPM (UO1) a cui verranno fatti indossare i barattolini contenenti campioni positivi o negativi (gli stessi collezionati nelle fasi di addestramento) e verranno simulate due diverse situazioni: l'entrata a scuola e gli studenti già seduti in classe. Il conduttore si posiziona con il cane, a seconda di come è strutturato il luogo, all'interno e ad una distanza di almeno due metri dalla porta di ingresso (questo per dare la possibilità a chi non vuole essere testato di accomodarsi); un responsabile farà entrare una persona per volta ed il conduttore la farà annusare dal cane per ottenere una risposta. In questa prima fase l'operatore conosce i possessori di campione ed una volta entrate tutte le persone ed accomodate al banco con

il dovuto distanziamento, l'operatore entrerà con il cane e farà annusare uno ad uno gli studenti: se il lavoro è stato svolto correttamente, avrà le stesse risposte avute all'ingresso e cioè confermati i positivi. Se questa prova non riesce perfettamente, si ripete.

**-Valutazione del benessere dei cani.** Il benessere dei cani verrà valutato in tutte le fasi dello studio dall'UO6 misurando il loro livello di stress tramite l'impiego di indicatori comportamentali e clinici oggettivamente rilevabili come descritto nei lavori di Corsetti e Clark [31-32].

### **3.5 Materiali**

Per la raccolta dei campioni ed il loro stoccaggio: DPI (camici usa e getta, calzari usa e getta, guanti, mascherine, maschera viso protettiva), tubi polimerici commerciali per il prelievo del campione di sudore (Getxent, <https://getxent.com>), provette sterili, scatoline di alluminio forate (commerciali), bustine biohazard. Frigorifero per la conservazione del campione e borsa termica per il trasporto dei campioni biologici. Per l'addestramento del cane: pettorina o collare, guinzaglio medio lungo per favorire la libertà di movimento del cane; zaino contenente: ciotola, premi, acqua, campioni, materiale per l'igiene, disinfettante.

### **3.6 Eventuali potenzialità applicative, impatto scientifico, sociale ed economico.**

I cani da rilevamento Covid19 possono essere addestrati con rapidità e facilità da persone competenti e rappresentano una risorsa importante ed economica per il servizio sanitario nazionale. Qualora la sperimentazione dovesse confermare la validità del test su soggetti asintomatici o paucisintomatici con risultati comparabili a quelli delle altre ricerche scientifiche internazionali, che mostrano caratteristiche di sensibilità e specificità elevate dei test eseguiti con i cani su campioni di sudore prelevati da soggetti perlopiù sintomatici (assimilabili a quelle dei test molecolari), il vantaggio appare evidente. I cani potrebbero individuare in breve tempo e a distanza anche di metri molte persone potenzialmente positive in un ambiente chiuso o aperto, anche affollato, senza la necessità di ricorrere a procedure invasive e che richiedono tempo, lavoro, strutture laboratoristiche e denaro per lo screening. Questo è importante nella nostra società per permettere la ripresa di tutte quelle attività necessarie per la crescita e la salute dell'individuo e dell'economia. I cani

infatti potrebbero essere utilizzati per lo screening di routine o periodici non solo nelle scuole e nelle università, ma dalle società sportive, nei teatri, nei cinema, nei musei, negli aeroporti, nei luoghi di culto, in ambienti lavorativi con molti dipendenti... E' auspicabile che molti studi simili vengano effettuati da più gruppi non solo in Italia ma a livello mondiale e che il sistema di addestramento venga standardizzato e diffuso a livello globale anche nei paesi a basso reddito dove non vi è ancora accesso ai sistemi di screening di laboratorio o limitati a pochi. I dati ottenuti da questo studio verranno divulgati tramite pubblicazioni su riviste scientifiche, attenendosi alle convenzioni internazionali sulle pubblicazioni cliniche, convegni e tramite portali nazionali di divulgazione, aspetto che verrà gestito dalla UO7 che si impegnerà anche a reperire fondi tramite crowdfunding.

**Gantt chart**

Settimane	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX-X	XI-XII	XIII-XIV	XV-XVI	XVII-XVIII
Raccolta campioni per imprinting									
addestramento cani									
Validazione addestramento drive in									
Simulazione scuola (validazione. test)									

[Immagine 3: Asse Orizzontale: Tempistica fasi operative del progetto in settimane a partire dall'approvazione; Asse Verticale: fasi operative]

### 3.7 Risultati

Approvazione del protocollo. Ad oggi il progetto è stato approvato dal CERM (Comitato Etico Regione Marche) nella seduta del 15/05/2021 e dal Comitato Etico della Regione Sardegna (15/06/2021).

Per l'approvazione sono stati sottoposti al CERM numerosi documenti: oltre al protocollo nella sua interezza, la sinossi, il consenso informato, la scheda anamnestica, la scheda

tecnica dei tubi getxent per attestarne la sicurezza, la non tossicità e l'anallergicità, i consensi dei responsabili di tutte le unità alla partecipazione al progetto, inclusi quelli delle asur, la dichiarazione che il progetto è senza scopo di lucro.

Il progetto è stato realizzato nelle sue prime 2 fasi mentre è ancora in esecuzione la fase 3.

Raccolta dei campioni e imprinting. Nella fase 1 sono stati raccolti 104 campioni presso l'ATS di Sassari e 125 presso AV3 Marche, di cui il 40% è rappresentato da campioni positivi ed il rimanente negativi, sia di soggetti vaccinati che non. Di questi, 30 campioni positivi ed 80 negativi sono stati utilizzati per l'imprinting iniziale e la validazione dell'imprinting stesso della fase 2.

Quest'ultima prevedeva 3 step: i) imprinting del cane, ii) consolidamento dell'imprinting e iii) valutazione dell'efficacia dell'imprinting.

Dopo un'attenta valutazione dei responsabili esperti dell'unità Progetto Serena Onlus dell'indole e delle caratteristiche dei cani disponibili e dell'esperienza/specializzazione, dei loro conduttori, sono stati selezionati 6 cani di cui 5 hanno attualmente concluso la fase 2 in maniera efficace mentre 1 è in fase conclusiva: Cloe, Nenna, Dayanne, Shaila (Sardegna), Wave (Veneto), Inna (Marche-Ancora non conclusa la fase 2).

Per i primi 5 cani è stata valutata l'efficacia operativa (il cane accetta volentieri la metodologia di lavoro) e l'assenza di errori (100% di risposte corrette) in modo tale di poter effettuare lo step iii) di validazione

Validazione imprinting. Questa fase si è tenuta in Sardegna il 3 e 4 Luglio 2021. Per ciascuno dei 5 cani sono stati calcolati i parametri presenti in tabella 1, espressi come proporzione (valore compreso tra 0 e 1), considerando come gold standard il risultato del tampone molecolare. I dati mostrano, per 4 dei 5 cani, valori di sensibilità e specificità molto alti, comparabili con quelli dei tamponi antigenici attualmente in commercio.

Il parametro relativo al valore predittivo positivo riveste particolare importanza alla luce del setting nel quale vengono attualmente impiegati i cani, ossia la rilevazione di soggetti probabilmente affetti da Sars-Cov-2 e da indirizzare verso il tampone molecolare di conferma. A tale riguardo i campioni rilevati come positivi da 3 dei 5 cani (Cloe, Nenna, Wave) appartenevano a soggetti realmente positivi in una percentuale molto alta dei casi.

Per quanto riguarda la specificità, il tasso di falsi positivi, tutti i cani hanno lavorato in maniera ottimale. Da segnalare che 2 cani hanno segnalato come positivo un soggetto risultato negativo al tampone molecolare ma che aveva eseguito il vaccino il giorno antecedente al prelievo.

Nel complesso 3 cani hanno dimostrato un'ottima accuratezza (>0.90), mentre gli altri 2 una buona accuratezza (>0.75).

	Cloe	Nenna	Dayanne	Wave	Shaila
Sensibilità	1	0.92	0.67	0.90	0.83
Specificità	0.95	0.94	0.83	1	0.86
Valore predittivo positivo	0.88	0.85	0.57	1	0.67
Valore predittivo negativo	1	0.97	0.88	0.97	0.94
Falsi positivi	0.05	0.06	0.17	0	0.14
Falsi negativi	0.13	0.08	0.33	0.10	0.17
Accuratezza	0.96	0.94	0.79	0.98	0.85

Tabella 1. Validazione 3-4 luglio 2021 ' Performance dei cani.

Successivamente si è proceduto all'analisi della concordanza delle risposte tra cani utilizzando il coefficiente Kappa di Cohen che si applica per valutare la concordanza tra 2 operatori.

Tale analisi si rivela di particolare utilità nel momento in cui si prevede di impiegare più di un cane nella stessa sessione di rilevamento, è infatti opportuno in tale circostanza che i cani impiegati siano il più possibile allineati.

Validazione fase 3. Alla luce dell'esito positivo emerso dalla fase 2, i 5 cani hanno iniziato la fase 3 di validazione al drive in di Sassari il 16/07/2021. Fino ad ora sono state analizzate circa 800 persone ed i risultati sembrano molto promettenti poiché si ha un numero esiguo di falsi positivi e nessun falso negativo. Siamo in attesa di ricevere il numero preciso dall'unità sarda e di avviare lo screening ai nostri drive in quando la



cagnolina Inna avrà superato la validazione dell'imprinting e le unità cinofile delle altre regioni potranno trasferirsi per qualche giorno a Macerata.

Non appena il numero prefissato per la significatività statistica verrà raggiunto si procederà con l'analisi della sensibilità e specificità.

## **CONCLUSIONI**

Il progetto sembra dare ottimi risultati in vista di una potenziale applicazione futura per tracciamento e screening in condizioni di assembramento. Tuttavia durante lo studio si è osservato che i cani si stancano facilmente e quindi sono necessarie più unità che si alternano nel lavoro per garantire lo screening di un numero elevato di persone. Inoltre, poiché i cani lavorano meglio in un ambiente non troppo affollato o troppo ricco di distrazioni o odori, la loro performance è eccellente quando i soggetti da analizzare vengono “annusati” uno alla volta in maniera ordinata. Pertanto il test risulta promettente in situazioni come scuole, palestre, cinema, teatri, ovvero contesti in cui può essere garantito un controllo ordinato in entrata e meno in situazioni di forte affollamento come stadi o grandi discoteche etc. Il test C19-screendog può quindi fornire un valido contributo nel combattere la pandemia da Sars-Cov-2 che ad oggi continua a progredire con l'emergere di nuove varianti ed anche a causa della non totale partecipazione alla campagna vaccinale.

## Bibliografia

- [1] - Coronavirus - Cosa sono i coronavirus, Gennaio 2020, Giovanni Rezza, Antonino Bella, Flavia Riccardo, Patrizio Pezzotti – Dipartimento Malattie Infettive ISS
- [2] - La storia del SARS-CoV-2 Marco Tinelli Consiglio Direttivo SIMIT - Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali, 2020
- [3] - Li Q, Guan X, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New Engl J Med* 2020
- [4] - Coronavirus, morto il medico Li Wenliang: diede l'allarme ma non fu creduto. Guido Santavecchi, Febbraio 2020
- [5] - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **5**, 536–544 (2020).
- [6] - F. Carinci, Covid-19: preparedness, decentralisation, and the hunt for patient zero, *BMJ* 2020;368:bmj.m799
- [7] - IL COVID-19: STORIA E SVILUPPO DELLA PRIMA PANDEMIA DA CORONAVIRUS, G. L. Castellani, M. Portas, G. Giannini (Verona), L. Di Mauro (Catania), Maggio 2020
- [8] - La pandemia che ha sconvolto le nostre vite e resterà per sempre nell'immaginario comune. Una cronistoria degli eventi che non avremmo mai potuto immaginare. Luca Salvioli, Valerio Bassan e Biagio Simonetta, Luglio 2021
- [9] - WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Overview
- [10] - ISS, Varianti del Virus, Istituto Superiore di Sanità
- [11] - Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A. *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* **27**, 601–615 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
- [12] - Jung, C., Levy, C., Varon, E., Biscardi, S., Batard, C., Wollner, A., Deberdt, P., Sellam, A., Hau, I., & Cohen, R. (2021). Diagnostic Accuracy of SARS-CoV-2 Antigen Detection Test in Children: A Real-Life Study. *Frontiers in pediatrics*, *9*, 647274. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.647274>
- [13] - Test per Covid-19: quali sono e che cosa rilevano Pubblicato il Novembre 23, 2020 Humanitas Dott.ssa Maria Teresa Sandri
- [14] - Atieh, M. A., Guirguis, M., Alsabeeha, N., & Cannon, R. D. (2021). The diagnostic accuracy of saliva testing for SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis. *Oral diseases*, 10.1111/odi.13934. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/odi.13934>
- [15] - Test salivare, ok del ministero: ecco come funziona e chi può farlo, Giornale "Il Messaggero". Pubblicato il 15 Maggio 2021.

- [16] - Covid Reference: ESAMI E PROCEDURE DIAGNOSTICHE di Christian Hoffman
- [17] – I.R.C.C.S. Ospedale San Raffaele Gruppo San Donato – Test Rapidi Covid cosa sono e come funzionano. Pubblicato il 20 Ottobre 2020
- [18] - L’organizzazione dello screening per COVID19 con test con tamponi a domicilio e “drive trough”. L’esperienza infermieristica della ASL Roma 2, di Romolo Cacioni\*, Barbara Porcelli, Flori Degrassi, Marina Cerimele, Giuseppe De Angelis, Fabio Boldrini, Gianluca Lemma, Luciana Cirillo
- [19] - Organizzazione e sviluppo di un modello drive-through per l’esecuzione di tamponi in risposta alla pandemia di COVID-19: l’esperienza di una azienda sanitaria locale nel Nord Italia Pompili E, Catozzi D, Cigliano F, Dalmasso M, Pasqualini O, Amprino V, Castella A, Gallone A, Greco G, Procopio E, Audisio L, Minniti D, Boraso F
- [20] - Shirasu M, Touhara K. The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. 2011, *J Biochem* 150:257-266. doi: 10.1093/jb/mvr090.
- [21] - Dottoressa Miriam Sauro - tesi i cani d'assistenza in ambito medico – UniTE, AA2015/16 [https://www.unite.it/UniTE/Engine/RAServeFile.php/f/avvisi\\_facolta/ELENCO\\_LAUREANDI\\_TBA\\_POMERIGGIO.pdf](https://www.unite.it/UniTE/Engine/RAServeFile.php/f/avvisi_facolta/ELENCO_LAUREANDI_TBA_POMERIGGIO.pdf)
- [22] - Adams, F. ed. 1994. Hippocratic Writings: Aphorism 4, 5. Web Atomics, New York.
- [23] - Walker DB, Walker JC, Cavnar PJ, Taylor TL, Pickel DH, Hall SB, et al. Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. 2006, *Appl Anim Behav Sci* 97:241–54. doi:10.1016/j.applanim.2005.07.009.
- [24] - Angle C, Waggoner LP, Ferrando A, Haney P, Passler T. Canine Detection of the Volatilome: A Review of Implications for Pathogen and Disease Detection. 2016a, *Front Vet Sci*. 3:47. doi: 10.3389/fvets.2016.00047.
- [25] - Angle TC, Passler T, Waggoner PL, Fischer TD, Rogers B, Galik PK, Maxwell HS. RealTime Detection of a Virus Using Detection Dogs. 2016b, *Front Vet Sci*. 2:79. doi:10.3389/fvets.2015.00079.
- [26] - Jendryn P, Schulz C, Twele F, Meller S, von Köckritz-Blickwede M, Osterhaus ADME, Ebbers J, Pilchová V, Pink I, Welte T, Manns MP, Fathi A, Ernst C, Addo MM, Schalke E, Volk HA. Scent dog identification of samples from COVID-19 patients - a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2020 Jul 23;20(1):536. doi: 10.1186/s12879-020-05281-3. PMID:32703188; PMCID: PMC7376324.
- [27] - Grandjean D, Sarkis R, Lecoq-Julien C, Benard A, Roger V, Levesque E, Bernes-Luciani E, Maestracci B, Morvan P, Gully E, Berceau-Falancourt D, Haufstater P, Herin G, Cabrera J, Muzzin Q, Gallet C, Bacqué H, Broc JM, Thomas L, Lichaa A, Moujaes G, Saliba M, Kuhn A, Galey M, Berthail B, Lapeyre L, Capelli A, Renault S, Bachir K, Kovinger A, Comas E, Stainmesse A, Etienne E, Voeltzel S, Mansouri S, Berceau-

Falancourt M, Dami A, Charlet L, Ruau E, Issa M, Grenet C, Billy C, Tourtier JP, Desquilbet L. Can the detection dog alert on COVID-19 positive persons by sniffing axillary sweat samples? A proof-of-concept study. *PLoS One*. 2020 Dec 10;15(12):e0243122. doi: 10.1371/journal.pone.0243122. PMID: 33301539; PMCID: PMC7728218

[28] - Arslan, B., Bercin, S., Aydogan, S. et al. SARS-CoV-2 is not found in the sweat of COVID19 positive patients. *Ir J Med Sci* (2021). <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02537-y>

[29] - Else H. Can dogs smell COVID? Here's what the science says. *Nature*. 2020 Nov;587(7835):530-531. doi: 10.1038/d41586-020-03149-9. PMID: 33230277.

[30] - Pleil JD, Stiegel MA, Risby TH. Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders. *J Breath Res*. 2013 Mar;7(1):017107. doi: 10.1088/1752-7155/7/1/017107. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23445880.

[31] - Corsetti, S.; Ferrara, M.; Natoli, E. Evaluating Stress in Dogs Involved in Animal-Assisted Interventions. *Animals* 2019, 9, 833. <https://doi.org/10.3390/ani9100833>

[32] - Clark, S.D.; Martin, F.; McGowan, R.T.S.; Smidt, J.M.; Anderson, R.; Wang, L.; Turpin, T.; Langenfeld-McCoy, N.; Bauer, B.A.; Mohabbat, A.B. Physiological State of Therapy Dogs during Animal-Assisted Activities in an Outpatient Setting. *Animals* 2020, 10, 819. <https://doi.org/10.3390/ani10050819>

## **Sitografia**

- <https://www.who.int/>
- <https://www.iss.it/cov19-varianti-del-virus>
- <https://www.iss.it/>
- <https://www.simlaweb.it/>
- <https://lab24.ilsole24ore.com/>
- [https://covidreference.com/diagnosis\\_it](https://covidreference.com/diagnosis_it)
- <https://www.nature.com/nmicrobiol/>
- <https://link.springer.com/>
- <https://www.mdpi.com/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://www.humanitas-care.it/>
- <https://www.bmj.com/>
- <https://www.corriere.it/>
- <https://www.ilmessaggero.it/>
- <https://repo.epiprev.it/>
- <https://www.hsr.it/news/2020/ottobre/test-rapidi-covid>
- [https://www.buonepracticesicurezzasanita.it/images/Covid-19/Documenti/ASLRM2/drive\\_trough.pdf](https://www.buonepracticesicurezzasanita.it/images/Covid-19/Documenti/ASLRM2/drive_trough.pdf)

## **Allegati**

[Allegato 1]

### **FOGLIO INFORMATIVO E MODULO DI CONSENSO INFORMATO ALLA PARTECIPAZIONE AL PROGETTO DI RICERCA UTILIZZO DI CANI ADDESTRATI PER LO SCREENING DEL COVID-19**

#### **Egr. Sig. / Gent.le Sig.ra**

La informiamo che desideriamo avvalerci della collaborazione e della disponibilità di persone come Lei che soddisfano i requisiti idonei al reclutamento nello studio in oggetto, che si propone di testare la capacità dei cani da rilevamento di riconoscere persone positive al SARS Cov-2. Per questo motivo Le proponiamo di partecipare allo studio promosso e coordinato dall'Università Politecnica delle Marche e che sarà condotto dalla stessa Università con la partecipazione e collaborazione dell'ASUR MARCHE AV3 e della ASSL di Sassari.

Prima che Lei decida se accettare o rinunciare, La invitiamo a leggere con attenzione questo documento; qualora Lei desideri avere ulteriori informazioni e chiarimenti potrà rivolgersi alla Professoressa Maria Rita Rippono, al Prof. Antonio Domenico Procopio, alla Dott.ssa Daniela Corsi o alla Dott.ssa Francesca Soggiu i cui recapiti sono indicati in fondo al presente documento) che Le dedicheranno tutto il tempo necessario per chiarire ogni Suo dubbio, fermo restando che Lei potrà rivolgersi in qualsiasi momento anche agli operatori coinvolti nell'esecuzione dello studio.

#### **Premesse e scopo dello studio**

I cani da allerta vengono utilizzati ormai da anni, anche in Italia, in diversi contesti emergenziali, per rilevare veleni, armi, per trovare persone disperse e per l'allerta in diverse malattie, come tumori e diabete. Questo studio, avvalendosi di personale altamente qualificato sia nell'ambito dell'addestramento che in campo sanitario e della ricerca, è mirato a testare la capacità di questi cani esperti di individuare soggetti positivi al Sars-Cov2 per poterli utilizzare in un prossimo futuro per lo screening di comunità.

La fase in cui Lei potrebbe essere reclutato dando il Suo consenso appartiene ad una delle seguenti:

- 1) prelievo di campione di sudore ascellare: con questi campioni i cani verranno addestrati in un secondo momento a riconoscere le sostanze volatili presenti nel sudore (i cosiddetti VOC) e riconducibili all'infezione virale. Il campione di sudore verrà conservato a temperatura controllata (4° C) in appositi frigoriferi nel laboratorio di Patologia Sperimentale di UNIVPM e nel laboratorio analisi dell'ospedale di Ozieri per 4 mesi.
- 2) Incontro con il cane per verificare la validità dell'addestramento: il cane, condotto al guinzaglio dal suo conduttore/addestratore verrà accompagnato vicino a Lei e con un semplice gesto (zampatina al suo conduttore) segnalerà, grazie al suo infallibile fiuto, se Lei può essere positivo. L'esito della segnalazione del cane verrà confrontato con l'esito del tampone a cui Lei si sta sottoponendo.

#### **Procedure previste dallo studio**

Lo studio prevede che i soggetti partecipanti vengano sottoposti ad un prelievo non invasivo e assolutamente indolore di sudore ascellare con l'ausilio di piccoli stick polimerici atossici e latex free; in alternativa dovranno solo aspettare che il cane si avvicini a loro e che li annusi.

#### **Possibili benefici relativi alla partecipazione allo studio.**

La partecipazione allo studio non modifica e non La esclude dal normale programma previsto per la procedura a cui è sottoposto (Tampone naso-faringeo per analisi molecolare).

Questo studio consentirà di validare un protocollo grazie al quale si potranno effettuare nel prossimo futuro screening di comunità (scuole, università, centri sportivi, cinema, teatri, aeroporti...) per l'identificazione di soggetti positivi al SARS Cov-2 con l'ausilio di cani da rilevamento senza ricorrere a procedure invasive.

Si ribadisce che questa è una fase sperimentale di preparazione del cane e che non è in nessun modo diagnostica o predittiva di infezione da virus Covid-19.

#### **Possibili rischi / effetti collaterali legati alla partecipazione allo studio.**

Il progetto è basato sulla raccolta di campioni di sudore ascellare e di informazioni tramite apposita scheda anamnestica, quindi la partecipazione allo studio non comporta rischi e/o effetti collaterali né implica la necessità di sottoporsi a esami invasivi.

Le valutazioni previste dallo studio saranno condotte da personale qualificato appartenente all'equipe dell'ASUR Marche, della ASSL di Sassari e dell'Università Politecnica delle Marche e da esperti addestratori cinofili appartenenti alle associazioni, senza scopo di lucro, Progetto Serena Onlus (VR) e la sua affiliata Semplicementecane ASD (SS) e Cluana Dogs (MC),.

#### **Assicurazione**

Data la natura non farmacologica dello studio, e la completa assenza di rischi per i pazienti, non è necessaria una copertura assicurativa.

#### **Partecipazione allo studio**

La Sua partecipazione è completamente libera e volontaria.

Se Lei acconsente a partecipare Le sarà chiesto di firmare il Modulo di Consenso Informato, allegato al presente documento, prima che Lei inizi a eseguire la procedura prevista per la diagnosi di positività al Covid-19.

La firma del modulo allegato è al fine di garantire che Lei abbia ricevuto un'informazione completa e che abbia espresso liberamente la Sua volontà di partecipare; tale firma non implica alcun impegno da parte Sua a proseguire lo studio, non costituisce un vincolo di natura contrattuale, né rappresenta una rinuncia ai diritti che Le spettano.

Nel caso in cui Lei decida di ritirarsi dallo studio, dopo avere inizialmente accettato, potrà interrompere la Sua partecipazione in qualsiasi momento dandone comunicazione al responsabile dello studio senza dover fornire una giustificazione. La scelta di non partecipare, o di ritirarsi dopo l'iniziale accettazione, non comporta l'esclusione o la limitazione dell'assistenza che Lei riceve presso le nostre strutture, né alcuna penalizzazione nel Suo rapporto con il personale che La assiste.

La partecipazione allo studio non determina alcun tipo di onere economico o di spesa aggiuntiva a Suo carico.



## **Trattamento dei dati personali**

### Titolari del trattamento e finalità

Il Laboratorio di Patologia Sperimentale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche (UNIVPM), in accordo con le responsabilità previste dalle norme di pratica clinica (D.M. 15.7.1997, D.Lgs. 211/2003, D.Lgs. 200/2007) e di protezione dei dati personali (regolamento europeo n. 679/2016, legge sulla privacy D.Lgs.196/2003 e successive modifiche) nonché dalle disposizioni dell'Autorità Garante per la protezione dei dati personali<sup>1</sup> tratterà in qualità di Titolare i Suoi dati personali e i Suoi dati sensibili relativi al Suo stato di salute, nella misura in cui sono indispensabili in relazione all'obiettivo dello studio ed esclusivamente in funzione della realizzazione dello stesso.

Responsabile dei trattamenti è stata designata la prof.ssa Maria Rita Rippo (promotore del progetto) anche per le finalità della tutela della riservatezza dei dati sensibili.

### Natura del conferimento dei dati

Il conferimento dei dati personali sopramenzionati è facoltativo, ma l'eventuale rifiuto, totale o parziale, al conferimento e al trattamento da parte Sua non Le consentirà di partecipare allo studio.

### Natura dei dati e modalità di trattamento

Tutte le informazioni, personali e cliniche che La riguardano, raccolte durante questo studio sono confidenziali e saranno trattate nel rispetto della normativa vigente sopra richiamata.

I dati da Lei forniti saranno resi anonimi, con un codice che potrà ricollegarli a Lei solamente da parte dello sperimentatore principale ed il personale autorizzato. I dati in formato cartaceo resteranno riservati e saranno custoditi, come qualsiasi altre informazione medica, per un periodo di 7 anni presso il Laboratorio di Patologia Sperimentale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche. I dati registrati saranno conservati su un supporto elettronico in forma anonima, saranno identificati tramite un codice dal referente e saranno depositati presso il Laboratorio di Patologia Sperimentale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, UNIVPM. Potranno accedere ai dati i referenti delle unità operative afferenti al progetto -il Prof. Antonio Domenico Procopio (Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, UNIVPM), la Dott.ssa Daniela Corsi (Dirigente AV3 Asur Marche), la Dott.ssa Soggiu (P.O.A. Ozieri, ATS -Azienda per la Tutela della Salute, SS)-, il Comitato Etico della Regione Marche e le Autorità nazionali di controllo.

I dati, trattati mediante strumenti anche elettronici, potranno essere diffusi in forma rigorosamente anonima attraverso riunioni, convegni e pubblicazioni scientifiche; in ogni caso il Suo nome o qualsiasi altro dettaglio idoneo a identificarLa, non saranno divulgati in quanto i dati potranno essere presentati esclusivamente in forma aggregata ovvero secondo modalità che non rendano identificabili i soggetti partecipanti allo studio.

I dati non verranno esportati al di fuori dell'UE

### Specifici diritti dell'interessato riguardo ai dati personali e sensibili

Ai sensi degli articoli 13, comma 2, lettere (b) e (d), e degli artt. 15, 16, 17, 18, e 21 del GDPR 2016/679, la informiamo che:

- ha il diritto di chiedere al Titolare del trattamento l'accesso ai dati personali, la rettifica o la cancellazione degli stessi o la limitazione del trattamento dei dati che la riguardano o di opporsi al trattamento degli stessi;
- ha il diritto di proporre un reclamo al Garante per la protezione dei dati personali, seguendo le procedure e le indicazioni pubblicate sul sito web ufficiale dell'Autorità su [www.garanteprivacy.it](http://www.garanteprivacy.it).

---

<sup>1</sup> *Laddove applicabili*: Linee Guida per i trattamenti dei dati personali nell'ambito delle sperimentazioni cliniche dei medicinali (Deliberazione n. 52 del 24.07.2008) e Autorizzazione generale n. 8/2016 sul trattamento dei dati genetici.

Nel caso in cui Lei si ritiri dallo studio, non saranno più raccolti ulteriori dati che La riguardano, fermo restando l'utilizzo di quelli eventualmente già acquisiti per determinare, senza alterarli, i risultati dello studio.

Il Protocollo dello Studio a cui Le viene proposto di partecipare, è stato approvato – unitamente al presente documento - dal Comitato Etico.

***Per ulteriori informazioni, chiarimenti e comunicazioni***

- Prof.ssa Maria Rita Rippo: Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università politecnica delle Marche. [m.r.rippo@univpm.it](mailto:m.r.rippo@univpm.it)
- Prof. Antonio Domenico Procopio: Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università politecnica delle Marche. [a.d.procopio@univpm.it](mailto:a.d.procopio@univpm.it)
- Dott.ssa Daniela Corsi: Direttore dell'AV3 Asur Marche. [direzioneav3@sanita.it](mailto:direzioneav3@sanita.it)
- Dott.ssa Francesca Soggiu: dirigente medico presso P.O.A. Segni di Ozieri, ATS ASSL Sassari (SS). [francescamariar.soggiu@atssardegna.it](mailto:francescamariar.soggiu@atssardegna.it).

***La ringraziamo per la Sua disponibilità e la Sua collaborazione***

**MODULO DI CONSENSO INFORMATO per la partecipazione allo studio:**

**Titolo: UTILIZZO DI CANI ADDESTRATI PER LO SCREENING DEL COVID-19: real time- COVIDOG**

Io sottoscritto/a:

\_\_\_\_\_ *Cognome e Nome in stampatello del soggetto adulto partecipante.*

nato/a a, il:

\_\_\_\_\_ *Luogo e data di nascita del soggetto adulto partecipante.*

Numero di telefono \_\_\_\_\_ Indirizzo e-mail \_\_\_\_\_

**DICHIARO QUANTO SEGUE:**

1. ho letto e compreso il foglio informativo di cui questo modulo è parte integrante;
2. ho avuto la possibilità di porre domande e di chiedere spiegazioni al/alla Dr./D.ssa \_\_\_\_\_ dal/dalla quale ho ricevuto risposte soddisfacenti;
3. mi sono state illustrate la natura, lo scopo e la durata dello studio, le procedure che saranno seguite, il trattamento previsto per i partecipanti e il tipo di collaborazione che ad essi sarà richiesta;
4. ho compreso che la mia partecipazione allo studio è libera e volontaria e che in qualsiasi momento posso decidere di ritirarmi dallo studio senza essere in alcun modo privato/a delle cure e dell'assistenza di cui ho bisogno e dell'eventuale accesso a nuove prospettive diagnostiche e/o terapeutiche e senza che siano compromessi i miei diritti e il mio rapporto con il medico e con gli operatori sanitari.

Luogo e data: \_\_\_\_\_

Firma:

Nome per esteso del rappresentante legale

Firma \_\_\_\_\_

Sottoscrivendo questo modulo ai sensi del Decreto Legislativo n.196/2003 e legge sulla privacy 679/2016 e successive modificazioni, acconsento alla raccolta e al trattamento dei miei dati personali e sensibili per lo scopo della ricerca nei limiti e con le modalità indicate nell'informativa fornitami con il presente documento

Nome per esteso del paziente	
Luogo e data: _____	Firma: _____
Nome per esteso del rappresentante legale _____	
Firma _____	

-----  
----

**PARTE RISERVATA ALL'OPERATORE CHE HA PRESENTATO L'INFORMATIVA**

Io sottoscritto/a Dr./D.ssa \_\_\_\_\_ (*Cognome e Nome in stampatello*)

**DICHIARO:**

- a. di avere spiegato alla persona sopraindicata la natura e lo scopo dello studio, nonché le procedure che saranno adottate e il tipo di collaborazione che sarà richiesta;
- b. di non avere cercato di influenzare o di costringere in alcun modo la persona sopra indicata per indurla a manifestare il suo consenso alla partecipazione allo studio;
- c. di rilasciare o di inviare informato elettronico alla persona sopraindicata una copia firmata e datata del presente documento qualora ne facesse espressamente richiesta

Luogo e data: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

[Allegato 2]

## SCHEDA ANAMNESTICA

Data e luogo \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_  
Cognome \_\_\_\_\_

Data di nascita \_\_\_\_\_ SESSO M  F

Indirizzo \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Recapito telefonico \_\_\_\_\_ EMAIL  
\_\_\_\_\_

PATOLOGIE PREGRESSE O IN ATTO SI  NO  Se SI,  
quali? \_\_\_\_\_

ALLERGIE SI  NO  Se SI, quali?  
\_\_\_\_\_

TERAPIE IN ATTO SI  NO  Se SI, quali?  
\_\_\_\_\_

### NEGLI ULTIMI 3 MESI:

IL SOGGETTO È MAI STATO POSITIVO AL COVID-19? SI  NO   
Se SI, data del primo tampone positivo \_\_\_\_\_

E' venuto a contatto con casi accertati di positività al covid-19 pur risultando negativo al  
tampone o non essere stato testato?

SI  NO

Ha avuto sintomi riconducibili ad infezioni simil influenzali? SI  NO

E' stato messo in quarantena preventiva per sospetto contatto con soggetti positivi a covid-19?  
SI  NO

Si è sottoposto alla vaccinazione COVID-19?

SI  NO

Se sì, quando? \_\_\_\_\_  
(J&J)

I dose

II dose

Dose unica

---

**A cura dei referenti del progetto**

Esito del tampone: NEG  POS  DATA: \_\_\_\_\_

Tipologia: Antigenico  Molecolare  Nr cicli PCR  
(Molecolare) \_\_\_\_\_

Esito sierologico SI  NO   
DATA: \_\_\_\_\_

**Segnalazione DEL CANE** SI  NO  dubbia

Eventuali provvedimenti e  
commenti \_\_\_\_\_

## **Ringraziamenti**

In questa sezione volevo dedicare qualche riga a chi è stato fondamentale per il raggiungimento di tale traguardo. Ringrazio in primis la mia famiglia, per essermi stata sempre vicino e avermi permesso di poter fare l'università sostenendomi economicamente, ringrazio i miei amici: Alessandro B., Michele, Federico, Elia, Cristian, Matteo, Tommaso (Mix), Leonardo, Alessandro L., Elena, Giulia, Caterina, Irene, Maria Vittoria, Niko, Cristian D'A., Mattia e Agghi che mi hanno sempre supportato durante il percorso, ringrazio Nicholas Giacchè senza il quale probabilmente non avrei mai preso la decisione di iscrivermi al corso di laurea in Scienze Infermieristiche, ringrazio i miei compagni di classe, in particolar modo Anna, Giorgia, Momy e Dani per esserci stati sempre in qualsiasi occasione o momento di difficoltà, ringrazio la Dott.ssa Liberati per avermi aiutato, e supportato durante la stesura di tale elaborato e la Dott.ssa Rippono per avermi permesso di farmi partecipare al progetto c19 screendog Cani anti covid, infine ringrazio l'Ospedale di Macerata e tutti i futuri colleghi che mi hanno fatto crescere professionalmente ma soprattutto umanamente durante il tirocinio dei tre anni.