

## La diagnostica olfattiva del cane applicata alla specie umana: stato dell'arte e prospettive cliniche

B. Palmieri<sup>1,2</sup>, B. Nardo<sup>3</sup>, G. Lippi<sup>4</sup>, L. Palmieri<sup>1</sup>, M. Vadalà<sup>1,2</sup>, C. Laurino<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena; <sup>2</sup>Associazione Italiana per la Ricerca sulle Malattie Oncologiche (AIRMO), Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Bologna, Bologna; <sup>4</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

### Riassunto

Le capacità olfattive dei cani sono circa 10.000 – 100.000 più sviluppate rispetto a quelle dell'uomo. È noto che il fiuto dei cani viene utilizzato in medicina forense, per la ricerca di persone scomparse o nel rintracciare materiali e sostanze sulla base di caratteristiche sensoriali specifiche. In ambito clinico sussiste la possibilità di poter sfruttare le capacità olfattive di cani, opportunamente allenati, per lo screening di patologie tumorali e non, caratterizzate dalla presenza di molecole biomarcatori specifici nei materiali biologici. In ambito oncologico sussistono evidenze scientifiche di tale opportunità per il melanoma, il carcinoma del polmone, della mammella, e per le neoplasie di retto, ovaio, prostata e vescica. In ambito non oncologico, invece, esistono diverse condizioni patologiche accomunate dalla presenza di composti organici volatili in materiali biologici che potrebbero essere campo di indagine ed approfondimento da parte del fiuto canino. Con questo articolo vogliamo fornire uno stato dell'arte riguardo le attuali capacità olfatto-diagnostiche dei cani, spiegandone le basi scientifiche delle loro capacità, i vantaggi e gli svantaggi del metodo, e scandagliare ambiti patologici non del tutto approfonditi, che potrebbero essere invece passibili di tale applicazione. *Clin Ter 2016; 167(4):e78-84. doi: 10.7417/CT.2016.1943*

**Parole chiave:** cani, cancro, composti organici volatili, diagnosi, olfatto, patologie

### I cani ed il fiuto del cancro

È noto che la sensibilità olfattiva dei cani raggiunge livelli di selettività in talune razze da poter essere utilizzata in medicina forense, per la ricerca di persone scomparse o nel rintracciare materiali e sostanze sulla base di caratteristiche sensoriali specifiche. In ambito medico-clinico è stata prospettata la possibilità che questa specie domestica possa utilmente fungere da sentinella per lo screening di malattie tumorali, indirizzando successivi approfondimenti emato-chimici e strumentali al fine di intraprendere adeguate contromisure terapeutiche in tempo utile.

### Abstract

#### Dogs' olfactory diagnostics applied on human species: state of the art and clinical perspectives

Dogs' smell ability is about 10000-100000 more developed than humans' one. Dogs smell is usually exploited in forensic medicine, to find missing people and specific substances showing peculiar sensorial features. In clinic, there is the possibility to take advantage of dogs smell, which are conveniently trained, for the screening of cancers and other diseases. The common feature is the presence of molecules in organic samples that may be considered as biomarkers of a specific pathology. In cancer, scientific evidences exist about screening of melanoma, lung, breast, rectum, ovarian, prostate and bladder cancer. Instead, other pathologies manifest the presence of organic volatile compounds in biologic materials, such as spit, faeces and urine that may be studied by dogs smell in order to identify the presence of a specific disease. This review shows the state of the art of actual dogs' olfactory ability based on scientific principles and the advantages and the disadvantages of this method. The authors also reveal some potential pathologies joined by the presence of organic volatile compounds, which may be investigated by dogs smell.

**Key words:** cancer, diagnosis, diseases, dogs, organic volatile compounds, smell

Analogamente, in letteratura è stato riportato l'utilizzo del "naso elettronico" (E-nose) per la diagnosi di alcune patologie neoplastiche (1-5) e non (6-9), caratterizzate dalla presenza di composti organici volatili, facilmente identificabili. Si tratta di un sensore elettronico in grado di riprodurre il senso umano dell'olfatto sulla base di alcuni sistemi di riproduzione programmati (2, 10).

Inoltre, la continua scoperta di biomarcatori proteici di tumore in campioni biologici offre la possibilità di effettuare diagnosi precoce e prognosi di diversi tipi di cancro, tra cui tumori del cavo orale (11, 12), carcinoma della mammella

*Corrispondenza:* Carmen Laurino. Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Largo del Pozzo 71, Modena, Italia. Telefono: +39 059 4222483. E-mail: carmen.laurino@hotmail.it

(13), linfomi (14), carcinoma polmonare (15, 16), tumori ovarici (17, 18), e carcinoma prostatico (19).

Le capacità olfattive dei cani sono di fatto circa 10.000 – 100.000 più sviluppate rispetto all'uomo, atte ad individuare concentrazioni di molecole odoranti fino a 1 – 2 parti per trilione (20).

Il nostro gruppo di lavoro Associazione Italiana per la Ricerca sulle Malattie Oncologiche (AIRMO), costituito da una intersezione collaborativa tra ricercatori clinici umani e medici/istituzioni veterinarie allo scopo di trarre opportune utili informazioni sia sulle specie domestiche che per quella umana in ordine alla prevenzione e diagnosi precoce di gravi malattie tra cui il cancro, ha fin da subito impostato uno studio di fattibilità, rivolto ad inserire la presenza di “cani da fiuto” addestrati alla identificazione di malattie in fase pre-clinica soprattutto in comunità di anziani istituzionalizzati (ricoveri, case protette, centri di accoglienza).

Lo studio delle malattie oncologiche intrapreso dal nostro gruppo di ricerca, inoltre, tiene conto di quanto dichiarato nel Decreto Legislativo n.26 del 4 Marzo 2014 in merito all'impatto della sperimentazione animale.

#### Obiettivi e Criteri di Ricerca

Questo articolo è una rassegna dello stato dell'arte sull'applicazione dell'olfatto dei cani come mezzo di diagnosi per alcune patologie, neoplastiche e non. Per la sua

stesura sono stati consultati studi pubblicati tra il 1976 ed il 2016 consultando la banca dati PubMed/Medline, ed utilizzando i seguenti termini di ricerca “dogs smell cancer”, “volatile compounds”, “diagnosis/detection”, “disease”, “biochemical markers” and “cancer biomarkers”, da soli od in combinazione tra di loro. Sono stati considerati studi clinici e studi sperimentali con chiaro riferimento all'impiego di cani opportunamente addestrati a fiutare la presenza di composti caratteristici di una specifica patologia neoplastica e non in fluidi biologici, per la relativa diagnosi.

#### Risultati

In premessa descriviamo una serie di indicazioni già segnalate in letteratura in tale direzione, con opportune verifiche analitiche vitro (Tab. 1).

Yoel e collaboratori (2015) (21) hanno condotto una ricerca su cani educati a riconoscere cellule maligne di melanoma e carcinoma polmonare in colture in vitro confrontate con colture di cellule normali. Due pastori belgi furono educati in primo luogo a percepire cellule neoplastiche della mammella in coltura, e successivamente ulteriori ceppi tumorali. La sensibilità discriminativa di questi animali raggiungeva nell'esperimento livelli di sensibilità diagnostica pari al 100%. Lane (2009) (22) ha riportato il caso aneddótico di un Labrador che aveva fiutato una lesione

Tabella 1. Descrizione degli studi di identificazione di patologie neoplastiche mediante l'aiuto del fiuto di cani allenati

Neoplasia	Descrizione dello studio	Bibliografia
<b>Melanoma e carcinoma polmonare (in vitro)</b>	Due pastori belgi furono educati dapprima a percepire cellule neoplastiche della mammella in coltura, e successivamente ulteriori ceppi tumorali. La sensibilità discriminativa di questi animali raggiungeva nell'esperimento livelli di sensibilità diagnostica pari al 100%.	(21)
<b>Carcinoma baso-cellulare</b>	Caso aneddótico di un Labrador che ha riconosciuto un carcinoma baso-cellulare del suo padrone	(22)
<b>Carcinoma della mammella e del polmone</b>	5 cani sono stati educati per 3-5 settimane a distinguere l'odore del respiro di pazienti neoplastici, convogliando vapore all'interno di cilindri utilizzati per lo studio. Nel gruppo di pazienti con cancro del polmone la sensibilità diagnostica raggiunse il 99%, mentre fu lievemente inferiore per il cancro della mammella (88%).	(23)
<b>Neoplasie dell'intestino retto e dell'ovaio</b>	Composti organici volatili sono stati caratterizzati analiticamente in campioni biologici e poi riconosciuti dai cani con sensibilità, specificità ed accuratezza significativa.	(26)
<b>Neoplasie dell'ovaio in fase di remissione dopo chemioterapia</b>	Sono stati confrontati campioni di plasma ottenuti da donne con cancro ovarico in fase di remissione dopo chemioterapia con il plasma di 210 campioni di donne di controllo. Due animali allenati furono in grado di identificare la presenza di tumore con sensibilità del 97% ed specificità del 99%. Questa capacità fu confermata anche nei medesimi pazienti a distanza di 3 e 6 mesi.	(27)
<b>Neoplasie della prostata</b>	E' stata valutata la capacità di un cane addestrato per 24 mesi nel discernere composti organici volatili, dopo aver annusato campioni di urine di 33 pazienti affetti da tumore maligno prostatico e di 33 pazienti sani di controllo. I risultati hanno evidenziato una sensibilità ed una specificità per l'identificazione del tumore pari al 91%.	(29)
<b>Neoplasie della vescica</b>	Sensibilità del 73% e specificità del 64% nell'identificare il cancro della vescica da parte di un gruppo di cani addestrati a fiutare le urine, rispetto ad una specificità tra il 92% ed il 56% nel fiutare le urine di soggetti sani giovani ed anziani.	(30)

cutanea definita come eczema del suo padrone veterinario. Successivamente, l'analisi istologica della lesione aveva rivelato la presenza di un carcinoma baso-cellulare.

Ricerche di McCullen e collaboratori (2006) (23) hanno confermato la possibilità che il cancro del seno e quello del polmone possano essere identificati da cani in grado di fiutare il respiro del paziente. Lo studio prevedeva l'educazione di un gruppo di 5 animali a distinguere l'odore del respiro di pazienti neoplastici, convogliando vapore all'interno di cilindri utilizzati per lo studio. L'addestramento ha avuto una durata compresa tra 3 e 5 settimane. In pazienti con cancro del polmone la sensibilità diagnostica raggiunse il 99%, mentre fu lievemente inferiore per il cancro della mammella (88%). Di tutto rilievo è il riscontro che non sono state osservate differenze significative nelle performance olfattive dei vari animali. In questo caso furono utilizzati come controlli dei soggetti sani e fumatori; non è quindi definibile a priori se la capacità diagnostica dei cani possa estendersi anche a situazioni di diagnosi differenziale più raffinate.

Uno studio recente è stato in grado di correlare positivamente la presenza nel fiato di 2-pentanone ed etil-acetato ( $p=0,97$  e  $p=0,85$ , rispettivamente) e negativamente la presenza nel fiato di 1-propanolo e propanale ( $p=-0,98$  e  $p=-0,97$ , rispettivamente) con il cancro nel polmone (24).

Schroeder (2015) (25) ha ipotizzato, nel tentativo di approfondire il meccanismo di condizionamento degli animali, che la presenza di cellule tumorali proliferanti possa essere riflessa dalla generazione di molecole chimiche definite s-nitrosotiolici (SNOs), composti volatili presenti nei tessuti tumorali con emivita variabile, sintetizzabili anche chimicamente. Nel suo studio, l'autore ha osservato che l'addestramento degli animali con composti volatili sintetici conferiva una capacità di identificazione degli stessi anche in prossimità dei pazienti. Si ipotizzò quindi che la capacità percettiva degli animali potesse logicamente estendersi alla percezione di composti emessi naturalmente dal corpo umano.

Secondo de Boer e collaboratori (2014) (26) anche neoplasie rettali ovariche potrebbero essere facilmente identificate da animali addestrati.

Horvath e collaboratori (2013) (27) hanno confrontato plasma ottenuto da donne con cancro ovarico in fase di remissione dopo chemioterapia con il plasma di 210 campioni di donne di controllo. Due animali debitamente allenati furono in grado di identificare la presenza di tumore con sensibilità del 97% ed specificità del 99%. Questa capacità fu confermata anche nei medesimi pazienti a distanza di 3 e 6 mesi. È verosimile supporre che sangue e urine, oltre al respiro, potrebbero essere target di screening oncologico, in particolar modo per neoplasie polmonari.

Un interessante contributo di Melichar e Plebani (2012) (28) suggerisce l'ipotesi che l'identificazione di aberrazioni geniche del DNA dei tessuti tumorali umani ottenibili da prelievi di cellule possa essere oggetto di captazione di marcatori volatili di tumore attraverso da parte di cani ben allenati.

Cornu e collaboratori (2011) (29) hanno evidenziato la possibilità di utilizzare composti organici volatili presenti nelle urine per l'identificazione del tumore della prostata. Gli autori hanno valutato la capacità di un cane addestrato per 24 mesi nel discernere tali composti, dopo aver annusato

campioni di urine di 33 pazienti affetti da tumore maligno prostatico e di 33 pazienti sani di controllo. I risultati hanno evidenziato una sensibilità ed una specificità per l'identificazione del tumore pari al 91%.

Sono state prodotte recentemente evidenze scientifiche anche in merito all'identificazione del cancro della vescica, mediata dalla presenza di composti organici volatili. Nel 2010, Willis e collaboratori (30) hanno dimostrato una sensibilità del 73% ed una specificità del 64% nell'identificare il cancro della vescica da parte di un gruppo di cani addestrati a fiutare le urine, rispetto ad una specificità tra il 92% ed il 56% nel fiutare le urine di soggetti sani giovani ed anziani, con una maggiore specificità per i giovani. Analisi approfondite hanno poi rivelato che alcuni fattori, tra cui fumo, sesso, età e presenza di emazie, proteine e leucociti nelle urine, non alteravano significativamente sensibilità e specificità diagnostiche.

I risultati di questi studi riassumono le capacità olfattive dei cani nella diagnosi di tumore del polmone, dell'ovaio, della mammella, del retto e della vescica, caratterizzati dalla presenza di composti organici volatili, previo addestramento degli stessi a riconoscerne le molecole marcatrici. Tale metodo, infatti, implica la determinazione a priori di un composto marcatore che viene successivamente confermato ed identificato dall'olfatto canino, offrendo una elevata percentuale di riproducibilità del metodo.

### **Perché i cani sono in grado di fiutare il cancro?**

La biochimica e l'istologia dei diversi tipi di tumore è stata già riportata in letteratura (Lippi G e coll. (2011), evidenziando un diverso assetto molecolare, chimico e cellulare nell'ambito dei differenti tipi di cancro. I composti organici, dopo essere stati rilasciati nel sangue e nelle urine, vengono dispersi nell'aria attraverso respiro e sudore. Queste sostanze comprendono molecole specifiche del tumore ed altri composti organici volatili, tra cui alcali, alcali metilati, composti aromatici e derivati del benzene (31). La conferma scientifica della presenza di tali composti nei campioni oncologici è stata ottenuta mediante analisi di gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), e dal rilevamento di nanoparticelle polimeriche in matrici biologiche diverse, quali urine, sangue ed aria espirata. La trasformazione neoplastica si associa sovente alla espressione di molecole HLA di classe I, tra cui HLA - A, HLA - B e HLA - C, le quali potrebbero rappresentare una vera "impronta" ("fingerprint") che può essere fiutata dai cani, soprattutto quando l'espressione è alterata in corso di patologia (31).

È stato ipotizzato che l'abilità di alcuni cani nell'identificare biomarcatori tumorali sia imputabile alla presenza di specifici polimorfismi genici per i recettori delle molecole olfattive, non presenti in tutte le specie animali (32). Si tratta di recettori appartenenti alla famiglia delle proteine associate alla proteina G con l'espressione: "dei recettori associati a proteina G, codificate da circa 1300 geni differenti nella specie canina e costituite da domini transmembrana, intercellulari ed extracellulari. Probabilmente la eterogeneità strutturale a livello dei recettori, secondaria alla presenza di

polimorfismi del gene che li codifica, renderebbe un recettore “più specifico” a rilevare determinati biomarcatori tumorali. L’animale diverrebbe pertanto più incline ad identificare la presenza di cancro. Lesniak e collaboratori (2008) (32) hanno sequenziati 5 geni codificanti per i recettori di molecole olfattive da 35 cani, caratterizzandone le varianti alleliche (SNPs) e correlandole con le abilità olfattive degli animali. I risultati hanno evidenziato che probabilmente l’eterogeneità è riferibile all’allele G nel locus 592 del gene cOR9S13, responsabile di una maggiore sensibilità e specificità discriminativa.

La combinazione di tutti questi fattori rende il sistema olfattivo di alcuni cani più sensibile a rilevare sostanze specifiche, e questa dote può quindi essere utilizzata non solo nell’ambito della sfera oncologica, ma anche in altre patologie umane, la cui precoce identificazione può consentire interventi più tempestivi ed efficaci.

Esistono infatti alcuni cani che appaiono particolarmente inclini a fiutare le variazioni di glucosio nel sangue, e rilevare quindi eventuali condizioni di ipoglicemia, diabete, e l’iperglicemia. Questi animali sono stati denominati “diabetes alert dogs” (DADs). Hardin e collaboratori (2015) (33) hanno addestrato 6 cani di età compresa tra 1 e 10 anni per 6 mesi, facendo loro fiutare campioni di sangue di pazienti in condizioni di ipoglicemia (valori di glucosio: 46-65 mg/dL) e normoglicemia (valori di glucosio: 85-136 mg/dL). La sensibilità nell’identificare i diversi campioni è stata compresa tra 50 ed 88%, con specificità compresa tra 90% e 98%.

Alcune rare malattie metaboliche associate alla produzione di odori caratteristici nel respiro, urine, saliva e secrezioni vaginali, per lo più si tratta di composti azotati e solfurei (ammine tra cui la trimetilaminuria, dovuta ad una eccessiva escrezione di trimetilammine), possono essere identificate da cani allenati. La malattia delle urine a sciroppo d’acero (MSUD), causata dalla deficienza dell’enzima alfa-chetoacido deidrogenasi a catena ramificata, genera un accumulo nel sangue e nelle urine di aminoacidi a catena ramificata (leucina, isoleucina e valina), e dei chetoacidi prodotti dal loro metabolismo, conferendo alle urine l’odore dello sciroppo d’acero (14) che può pertanto essere identificata già in fase perinatale all’olfatto canino.

È stato anche descritta la capacità di alcuni cani di identificare condizioni di insufficienza epatica e cirrosi epatica attraverso il fiuto dell’odore caratteristico emanato dai questi pazienti, per lo più attribuibile ad elevata concentrazione di composti solfurei (34). In uno studio condotto su 102 pazienti, la sensibilità e specificità degli animali nell’identificare la presenza di queste patologie sono state del 100% e 70%, rispettivamente (35).

È importante sottolineare che i cani sono in grado di fiutare anche gas prodotti da agenti patogeni infettivi, tra cui il *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, ed *Enterococcus spp.* in campioni fecali, ed il *Mycobacterium tuberculosis* in campioni di sputo, con specificità e sensibilità che superano il 90% (36).

### Correlazione tra composti organici volatili e patologie: nuovi campi ancora da “fiutare”

Molte patologie umane sono caratterizzate da produzione di composti organici volatili specifici, identificabili e quantificabili con strumentazioni di laboratorio sofisticate come la spettrofotometria, la cromatografia in fase liquida e gassosa. Il che farebbe quindi supporre che le stesse molecole potrebbero essere identificate dall’olfatto del cane (Tab. 2).

Nella steatosi e nella steatoepatite non alcolica è stato possibile identificare composti organici volatili nel respiro, nelle urine e nelle feci. Queste sostanze sono il prodotto di disfunzioni del metabolismo epatico, e si associano alla presenza di malattia con specificità del 79% ed sensibilità del 73% (37).

Anche il morbo celiaco si associa a disordini del sistema immunitario e del microbiota intestinale, con eccesso di specie patogene ed opportunistiche ad elevata attività fermentativa e putrefattiva. Questi batteri sono in grado di rilasciare composti organici volatili come prodotti finali del loro metabolismo, che sono poi identificabili nelle feci, nelle urine e nel respiro. I composti sono altamente specifici per la celiachia e facilmente distinguibili dalle molecole prodotte in altre condizioni quali la sindrome del colon irritabile, con sensibilità del 91% e specificità dell’85%. Uno dei composti che più frequentemente è presente nei pazienti celiaci è il 1,3,5,7 – cicloottatrene, assente nei pazienti affetti da sindrome del colon irritabile (38). Alcuni acidi grassi a catena breve, come ad esempio l’acido cicloesano-carbossilico ed i suoi esteri, sono associati a sindrome del colon irritabile, mentre le aldeidi sono più specifiche per le malattie infiammatorie croniche intestinali, tra cui il Morbo di Chron. La loro determinazione consente di discriminare le malattie croniche intestinali con sensibilità compresa tra 90-96% e specificità compresa tra l’80-82% (39).

L’acido solfidrico (H<sub>2</sub>S), terzo trasmettitore gassoso dopo l’ossido nitrico e l’anidride carbonica, è una molecola essenziale coinvolta nella patogenesi del danno renale. Esso è infatti coinvolto nella regolazione di molteplici meccanismi omeostatici tra i quali il controllo della pressione sanguigna, il bilancio elettrolitico, lo stress ossidativo e partecipa anche nella patogenesi dei danni da patologie infiammatorie. L’H<sub>2</sub>S è anche considerato un biomarcatore di carenza di ossigeno a livello renale, e per questo motivo potrebbe essere utilizzato come parametro di funzionalità renale (40).

Nelle urine sono stati identificati altri composti organici volatili che permetterebbero di discriminare la glomerulonefrite proliferativa mesangiale (MsPGN) da nefropatie da IgA (IgAN). Uno studio condotto su 15 pazienti affetti da MsPGN, 21 pazienti affetti da IgAN e 15 soggetti sani, ha consentito di identificare 5 metaboliti (acido carbammico, sali di monoammonio, disolfuro di carbonio, silanediolo, dimetile – 2H – 1,4 – benzodiazepina – 2-1, 7- cloro – 1,3 – diidro – 5 – fenil – 1 – (trimetilisilil) ed idrossitoluene butilato), le cui concentrazioni urinarie apparivano significativamente più elevate ( $p < 0.05$ ) nel gruppo di pazienti affetti da MsPGN rispetto agli altri gruppi, e 3 metaboliti (2-pentanone, pirrolo e 4 – eptanone), le cui concentrazioni urinarie erano significativamente più elevate ( $p < 0.050$ ) nel gruppo di pazienti affetti da IgAN rispetto agli altri gruppi

Tabella 2. Descrizione di patologie caratterizzate dalla presenza di composti organici volatili in diverse tipologie di materiale biologico, che potrebbero essere identificati dal fiuto dei cani, opportunamente allenati.

Patologia	Materiale biologico	Markers	Sensibilità e specificità	Bibliografia
Steatosi e steatoepatite non alcolica	Aria espirata, urine, feci	Composti organici volatili	Specificità del 79% e sensibilità del 73%	(37)
<b>Celiachia</b>	Feci, urine, aria espirata	1,3,5,7 – cicloottatrene	Sensibilità del 91% e specificità dell'85%	(38)
<b>Sindrome del colon irritabile</b>	Feci, urine, aria espirata	Acido cicloesancarbossilico ed i suoi esteri	Sensibilità compresa tra 90-96% e specificità compresa tra l'80-82%	(39)
<b>Malattie infiammatorie croniche intestinali</b>	Feci, urine, aria espirata	Aldeidi	Sensibilità compresa tra 90-96% e specificità compresa tra l'80-82%	(39)
<b>Patologie renali</b>	Urine, aria espirata	Acido solfidrico (H <sub>2</sub> S)	Non disponibile	(40)
<b>Glomerulonefrite proliferativa mesangiale (MsPGN)</b>	Urine	Acido carbammico, sali di monoammonio, disolfuro di carbonio, silanedio- lo, dimetile – 2H – 1,4 – benzodiazepinaa – 2-1, 7- cloro – 1,3 – diidro – 5 – fenil – 1 – (trimetilisilil) ed idrossitoluene butilato	Non disponibile	(41)
<b>Nefropatie da IgA (IgAN)</b>	Urine	2-pentanone, pirrolo e 4 – eptanone	Non disponibile	(41)
<b>Patologie renale</b>	Aria espirata	Acetone, 2-pentanone ed etanolo	Sensibilità del 96%	(42)

(41). Anche nell'aria espirata è possibile rilevare la variazione di composti organici volatili quali indicatori di danno renale, tra cui acetone, 2-pentanone ed etanolo, con sensibilità diagnostica pari a 96% già dopo un'ora di induzione sperimentale del danno renale in modello murino (42).

Alterazioni del microbioma intestinale caratterizzate da una prevalenza di batteri anaerobi patogeni ed opportunisti ad elevata attività fermentativa e putrefattiva sono state identificate nella nefropatia da IgA, e correlate con uno specifico profilo di composti organici volatili rilevabili sia a livello delle feci e sia dell'aria espirata (43).

La conoscenza degli aspetti patogenetici di patologie ancora inesplorate dall'olfatto canino, ma caratterizzate dal punto di vista strumentale, potrebbe aprire un nuovo scenario per l'addestramento di cani al riconoscimento di composti organici volatili quali biomarcatori di patologia.

Inoltre, in ambito chemioterapico alcuni trattamenti sono spesso associati a tossicità per alcuni organi e tessuti. Ad esempio, la terapia con trastuzumab nelle pazienti affette da carcinoma della mammella positivo ad human epidermal growth factor receptor (HER2+) frequentemente determina cardiotoxicità, spesso non identificata, non essendoci delle metodiche valide (44). L'addestramento di cani in grado di fiutare precocemente la presenza di alcuni marcatori di danno cardiaco, tra cui il b-type natriuretic peptide (BNP) e la troponina I, nel plasma di pazienti sottoposte a chemioterapia con trastuzumab, potrebbe rappresentare una valida metodica di prevenzione di danno cardiaco durante il trattamento.

#### **Vantaggi e svantaggi della diagnosi olfattiva rispetto ai test di laboratorio**

Il fiuto dei cani per l'identificazione di campioni patologici presenta molteplici vantaggi, tra i quali (i) tempo (i test di laboratorio con tecniche separative richiedono generalmente oltre 2-4 ore), (ii) sensibilità ai composti (l'olfatto dei cani l'identificazione di sostanze nell'ordine delle parti per milione, traguardo ancora irraggiungibile da alcune tecniche separative), versatilità (iii) (l'animale può essere facilmente accompagnato ove ve ne sia necessità, mentre è improponibile lo spostamento di complesse strumentazioni di laboratorio), (iv) capacità di riconoscere un "fingerprint" (la maggior parte delle tecniche di laboratorio consente di identificare poche molecole per volta) (v) aspetti affettivi (il cane, a differenze degli strumenti di laboratorio, condivide e partecipa alle esperienze del paziente), (vi) capacità accessorie (il cane non solo è in grado di riconoscere il variare di alcuni odori, ma anche le variazioni di umore e di stato fisico del paziente). Inoltre, non sono necessari intensi allenamenti e preparazioni per poter allenare un cane a riconoscere campioni patologici. Il principale svantaggio sembra invece rappresentato dal dover costantemente controllare la salute e le capacità dell'animale, intervenendo ogni qual volta gli stimoli vengono meno o si modificano. Inoltre, quando non sono noti specifici biomarcatori di patologia, le capacità di fiutare la malattia da parte del cane diventano limitate, non esistendo un substrato su cui potersi allenare (45). Ulteriori limiti sono rappresentati dalla presenza di alcuni fattori

confondenti, ad esempio il tabagismo da parte del paziente affetto, che spesso possono falsare il limite di rilevazione da parte dell'animale domestico, l'ambiente in cui viene effettuato il rilevamento, poiché in ambienti aperti possono esserci altri composti volatili che possono modificare le capacità olfattive dei cani. Tutti questi fattori dovrebbero essere presi in considerazione e valutati attentamente durante la pratica clinica. Infine, la presenza di patologie concomitanti potrebbe costituire altro fattore confondente alla diagnosi: ulteriori studi dovrebbero essere condotti per approfondire questi argomenti (24).

## Conclusioni

Con questo contributo abbiamo inteso evidenziare le attuali capacità olfattive di alcune razze canine nell'identificazione di tumori, ma anche esplorare il complesso delle conoscenze sulla generazione di composti volatili in patologia umana. Si tratta di molecole, codeste chimicamente intercettabili dal fiuto degli animali. Ne emerge quindi una ampia potenzialità di utilizzo di questa risorsa diagnostica, utile non solo per lo screening di comunità o per il monitoraggio di soggetti a rischio, ma può anche essere utilizzata nella vita quotidiana di persone anziane, socialmente disagiate e/o portatrici di deficit fisici e motori, al fine di instaurare una sorveglianza più stretta del loro stato di salute. La sfida dei prossimi anni potrebbe esser quella di selezionare ed allenare dei "doctors dogs" con una library olfattiva complessa in grado di interagire efficacemente sulla patologia.

## Bibliografia

- Bomers MK, Smulders YM. [An odour of disease and decay: the nose as a diagnostic instrument]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2015;159:A9434
- van Hooren MR, Leunis N, Brandsma DS, et al. Differentiating head and neck carcinoma from lung carcinoma with an electronic nose: a proof of concept study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Apr 16
- Gasparri R, Santonico M, Valentini C, et al. Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer. *J Breath Res*. 2016 Mar;10(1):016007
- Krilaviciute A, Heiss JA, Leja M, et al. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. *Oncotarget*. 2015 Nov 17;6(36):38643-57
- Brooks SW, Moore DR, Marzouk EB, Glenn FR, Hallock RM. Canine olfaction and electronic nose detection of volatile organic compounds in the detection of cancer: a review. *Cancer Invest*. 2015;33(9):411-9.
- Scadding GK, Scadding GW. Diagnosing Allergic Rhinitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2016; 36(2):249-60
- Brekelmans MP, Fens N, Brinkman P, et al. Smelling the Diagnosis: The Electronic Nose as Diagnostic Tool in Inflammatory Arthritis. A Case-Reference Study. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151715
- de Vries R, Brinkman P, van der Schee MP, et al. Integration of electronic nose technology with spirometry: validation of a new approach for exhaled breath analysis. *J Breath Res* 2015 Dec;9(4):046001
- Schnabel RM, Boumans ML, Smolinska A, et al. Electronic nose analysis of exhaled breath to diagnose ventilator-associated pneumonia. *Respir Med*. 2015 Nov;109(11):1454-9
- Leopold JH, Bos LD, Sterk PJ, et al. Comparison of classification methods in breath analysis by electronic nose. *J Breath Res* 2015 Dec;9(4):046002
- Berta GN, Di Carlo F, Bosio A, et al. Effect of the single major proteic fractions of the liver perchloric extract UK101 on the development of oral tumours in Syrian hamsters. *J Oral Pathol Med*. 2001 Oct;30(9):532-6
- Valverde LF, de Freitas RD, Pereira TA, et al. MCM3: A Novel Proliferation Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016 Jun 2
- Goncalves A, Bertucci F, Birnbaum D, et al. [Proteic profiling SELDI-TOF and breast cancer: clinical potential applications]. *Med Sci (Paris)*. 2007 Mar;23 Spec No 1:23-6
- Lavabre-Bertrand T, Henry L, Guiraud I, et al. [The proteasome and malignant hemopathies]. *Morphologie* 2000 Jun;84(265):39-43
- Wu S, Liu L, Li G, et al. Multiplexed detection of lung cancer biomarkers based on quantum dots and microbeads. *Talanta*. 2016 Aug 15;156-7:48-54
- Sun Z, Chen X, Wang G, et al. Identification of functional metabolic biomarkers from lung cancer patient serum using PEP technology. *Biomark Res* 2016; 4:11
- Trachana SP, Pilalis E, Gavalas NG, et al. The Development of an Angiogenic Protein "Signature" in Ovarian Cancer Ascites as a Tool for Biologic and Prognostic Profiling. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156403
- Sosulski A, Horn H, Zhang L, et al. CD44 Splice Variant v8-10 as a Marker of Serous Ovarian Cancer Prognosis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156595.
- Beltran H, Antonarakis ES, Morris MJ, et al. Emerging Molecular Biomarkers in Advanced Prostate Cancer: Translation to the Clinic. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016; 35:131-41.
- Craven BA, Paterson EG, Settles GS. The fluid dynamics of canine olfaction: unique nasal airflow patterns as an explanation of macrosmia. *J R Soc Interface* 2010; 7(47):933-43
- Yoel U, Gopas J, Ozer J, et al. Canine Scent Detection of Volatile Elements, Characteristic of Malignant Cells, in Cell Cultures. *Isr Med Assoc J* 2015 Sep;17(9):567-70
- Lane R. A protocol for labrador retrievers? *Lancet* 2009 Dec 19; 374(9707):2038-9
- McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, et al. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integr Cancer Ther* 2006 Mar; 5(1):30-9
- Jezierski T, Walczak M, Ligor T, et al. Study of the art: canine olfaction used for cancer detection on the basis of breath odour. Perspectives and limitations. *J Breath Res* 2015; 9(2):027001
- Schroeder W. Volatile S-nitrosothiols and the typical smell of cancer. *J Breath Res* 2015; 9(1):016010
- de Boer NK, de Meij TG, Oort FA, et al. The scent of colorectal cancer: detection by volatile organic compound analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12(7):1085-9
- Horvath G, Andersson H, Nemes S. Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. *BMC Cancer* 2013; 13:396
- Melichar B, Plebani M. Cancer diagnosis: from dogs to DNA or from DNA to dogs? *Clin Chem Lab Med* 2012 Mar; 50(3):415-8

29. Cornu JN, Cancel-Tassin G, Ondet V, et al. Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis. *Eur Urol* 2011; 59(2):197-201
30. Willis CM, Britton LE, Harris R, et al. Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs. *Cancer Biomark* 2010; 8(3):145-53
31. Lippi G, Cervellin G. Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity? *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(3):435-9
32. Lesniak A, Walczak M, Jezierski T, et al. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. *J Hered* 2008 Sep-Oct; 99(5):518-27
33. Hardin DS, Anderson W, Cattet J. Dogs Can Be Successfully Trained to Alert to Hypoglycemia Samples from Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Ther* 2015 Dec;6(4):509-17
34. Chen S, Mahadevan V, Zieve L. Volatile fatty acids in the breath of patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 1970 Apr;75(4):622-7
35. Van den Velde S, Nevens F, Van Hee P, van Steenberghe D, Quiryne M. GC-MS analysis of breath odor compounds in liver patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Nov 15;875(2):344-8.
36. Bijland LR, Bomers MK, Smulders YM. Smelling the diagnosis: a review on the use of scent in diagnosing disease. *Neth J Med* 2013 Jul-Aug;71(6):300-7
37. Arasaradnam RP, McFarlane M, Daulton E, Westenbrink E, O'Connell N, Wurie S, et al. Non-invasive distinction of non-alcoholic fatty liver disease using urinary volatile organic compound analysis: early results. *J Gastrointestin Liver Dis* 2015 Jun;24(2):197-201
38. Arasaradnam RP, Westenbrink E, McFarlane MJ, et al. Differentiating coeliac disease from irritable bowel syndrome by urinary volatile organic compound analysis--a pilot study. *PLoS one* 2014; 9(10):e107312
39. Ahmed I, Greenwood R, Costello Bde L, et al. An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS one* 2013;8(3):e58204
40. Koning AM, Frenay AR, Leuvenink HG, et al. Hydrogen sulfide in renal physiology, disease and transplantation--the smell of renal protection. *Nitric Oxide* 2015; 46:37-49
41. Wang C, Feng Y, Wang M, et al. Volatile Organic Metabolites Identify Patients with Mesangial Proliferative Glomerulonephritis, IgA Nephropathy and Normal Controls. *Sci Rep* 2015; 5:14744
42. Nakhleh MK, Amal H, Awad H, et al. Sensor arrays based on nanoparticles for early detection of kidney injury by breath samples. *Nanomedicine* 2014 Nov;10(8):1767-76
43. De Angelis M, Montemurro E, Piccolo M, et al. Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN). *PLoS One* 2014; 9(6):e99006
44. Pistillucci G, Ciorra AA, Sciacca V, et al. [Troponin I and B-type Natriuretic Peptide (BNP) as biomarkers for the prediction of cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with adjuvant anthracyclines and trastuzumab]. *Clin Ter* 2015;166(1):e67-71
45. Teodoro-Morrison T, Diamandis EP, Rifai N, et al. Animal olfactory detection of disease: promises and pitfalls. *Clin Chem* 2014; 60(12):1473-9