

PARTECIPAZIONE DEL LNR-TB A PROVE INTERLABORATORIO ORGANIZZATE DA ALTRI ENTI

1 Proficiency testing for the interferon gamma release assay (2019)

Purpose

The main objectives of this proficiency testing are:

- To assess the ability of NRLs to provide accurate results for the laboratory detection of the interferon gamma as a supplementary testing to enable detection of the maximum number of infected and diseased animals bovine tuberculosis by culture (64/432/CE).
- To assess the implementation of the IFN- γ release assay as a potential official test for the confirmation of the OTF herds and/or the intracommunity trade of animals.
- To provide an official inter-laboratory evaluation scheme that can be useful to those laboratories which need to provide evidence of their proficiency to perform the Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA) for accreditation purposes.

Matrici

- 8 campioni di plasma bovino liofilizzato in triplicato proveniente da sangue stimolato in vitro di animali naturalmente infetti o non infetti con *M. bovis* distribuito in una piastra da 96 campioni.

Analiti

- Citochina (γ -interferon)

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.

Periodo: Novembre 2018- Marzo 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i campioni sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

2 Proficiency testing for the molecular characterization of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (2018-2019)

Purpose

The main objectives of this proficiency testing are:

- To assess the ability of NRLs to provide accurate results for the laboratory assignment of the spoligotyping international code (SB code) and the VNTR profile.
- To provide an official inter-laboratory evaluation scheme that can be useful to those laboratories which need to provide evidence of their proficiency to perform molecular characterization techniques for the classification of the strains according to the international nomenclature for accreditation purposes.
- To compare the performance of molecular techniques based on the detection of genetic variability on the DR locus and VNTR loci in order to use them for epidemiology purposes.

Matrici

Pannello di 20 campioni di DNA (150 µl ciascuno) ottenuti da isolati appartenenti al gruppo *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Analiti

Acido nucleico.

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.

Periodo: Novembre 2018- Giugno 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i ceppi sono stati identificati correttamente a livello di specie e con la genotipizzazione spoligotyping. La tipizzazione mediante MLVA di 6 loci di riferimento VNTR (ETRA, ETRB, ETRD, QUB 11a, QUB 11b, QUB 3232) ha identificato correttamente il numero di unità ripetitive di 4 loci su 6. Tuttavia il locus ETRD non è stato considerato nel giudizio finale poiché è stato utilizzato un altro criterio d'interpretazione.

Il giudizio complessivo dei risultati d'identificazione e genotipizzazione ottenuti dal LRN-TB è stato favorevole.

3 Proficiency testing for pathological diagnosis of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (2018-2019)

Purpose

The main objectives of this proficiency testing are:

- To assess the ability of NRLs to provide accurate results for the histopathological diagnosis of tuberculosis in animals.
- To provide an official inter-laboratory evaluation scheme that can be useful to those laboratories which need to provide evidence of their proficiency to perform histopathological diagnosis of tuberculosis in animals for accreditation purposes.

Matrici

Pannello di 9 vetrini ottenuti da campioni di tessuto (linfonodi, polmone, fegato) appartenenti a diverse specie animali (bovino, pecora, capra, suino, cavallo, camelidi) infetti o non con micobatteri del gruppo *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Analiti

Morfologia dei tessuti, presenza micobatteri.

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.

Periodo: Dicembre 2018- Settembre 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i campioni sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

TAB: Partecipazione

PARTECIPAZIONE DEL LNR-TB A PROVE INTERLABORATORIO ORGANIZZATE DA ALTRI ENTI

Circuito organizzato da INSTAND e. V. (Society for Promotion of Quality Assurance in Medical Laboratories e. V. Dusseldorf, Germany) in collaborazione con il National Reference Laboratory of Mycobacteria (Borstel) per la valutazione di metodi per:

- **Identificazione di micobatteri mediante metodi microbiologici/biochimici**
- **Identificazione di micobatteri mediante metodi molecolari**

Matrici

Ceppi isolati di micobatteri: *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. tuberculosis*.

Analiti

Reazioni enzimatiche

Acido nucleico

Luogo e periodo di svolgimento

Europa, laboratori nazionali di riferimento e altri laboratori nazionali/internazionali (90 partecipanti).

Gennaio - Aprile 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i campioni sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB sia con i metodi molecolari che microbiologici con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

PARTECIPAZIONE DEL LNR-TB A PROVE INTERLABORATORIO ORGANIZZATE DA ALTRI ENTI

Circuito organizzato da QCMD 2019 *Bacterial 16S Ribosomal RNA* EQA Programme (QMCD Technology Terrace, Todd Campus West of Scotland Park, Glasgow, Scotland) per la valutazione del metodo:

Rilevamento delle specie MOTT di *Mycobacterium* spp. mediante sequenziamento del gene RNAr 16S da ceppo isolato.

Purpose: to assess the proficiency of laboratories in the molecular identification of *Mycobacterium* spp. and other bacterial species.

Matrici

Pannello composto da 8 ceppi batterici di diverso genere.

Analiti

Acido nucleico.

Luogo e periodo di svolgimento

- Luogo: partecipanti 104 laboratori da 25 diversi paesi.
- Periodo: Ottobre – Novembre 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Otto campioni su 9 sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

PARTECIPAZIONE DEL LNR-TB A PROVE INTERLABORATORIO ORGANIZZATE DA ALTRI ENTI

Circuito organizzato da QCMD 2019 *Mycobacterium tuberculosis* DNA EQA Programme (QMCD Technology Terrace, Todd Campus West of Scotland Park, Glasgow, Scotland) per la valutazione del metodo:

Rilevamento del gruppo *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) mediante PCR Real Time da campioni di tessuto/linfonodo.

Purpose: to assess the proficiency of laboratories in the molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG).

Matrici

- Pannello composto da 9 campioni di saliva contaminati con *M. bovis* (BCG) o *M. tuberculosis*.

Analiti

Genoma dei micobatteri.

Luogo e periodo di svolgimento

- Luogo: partecipanti 120 laboratori da 30 diversi paesi.
- Periodo: Ottobre – Novembre 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Otto campioni su 9 sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

PARTECIPAZIONE DEL LNR-TB A PROVE INTERLABORATORIO ORGANIZZATE DA ALTRI ENTI

Circuito organizzato dal Animal Health and Veterinary Agency (AHVLA), UK - Proficiency testing, quality Assurance Unit (Vetqas®).

Gamma interferon (bovine TB) serum, per la valutazione del Metodo per la diagnosi di tubercolosi bovina-prova γ -interferon.

Nel circuito erano compresi 4 esercizi indipendenti per un totale di 16 campioni.

Matrici

- Esercizio composto da 4 campioni di plasma (4 esercizi indipendenti per un totale di 16 campioni) provenienti da sangue stimolato in vitro da animali naturalmente infetti o non infetti con *M. bovis*.

Analiti

Citochina (γ -interferon).

Luogo e periodo di svolgimento

- Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.
- Periodo: Aprile 2019 – Gennaio 2020

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i campioni sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB con giudizio finale favorevole sulle performance di laboratorio.

Valutazione complessiva

Nella presente relazione è descritta l'attività del LNR-TB sia come organizzatore di circuiti interlaboratorio che come partecipante.

Il LNR-TB organizza ogni anno almeno un circuito interlaboratorio per la rete nazionale degli Istituti Zooprofilattici (IIZZSS). Nel 2019 si è concluso un circuito per l'identificazione di micobatteri da ceppo isolato mediante metodi microbiologici/biochimici dei micobatteri.

La prova valutativa per l'identificazione di micobatteri mediante metodi microbiologici/biochimici, ha mostrato che solo 3 dei 5 laboratori partecipanti hanno effettuato le prove microbiologiche complete.

Le prove microbiologiche/biochimiche pur essendo tuttora presenti nella normativa nazionale, sono utilizzate solo dal LNR-TB e da pochi laboratori della rete IIZZSS. Tutti i laboratori che hanno utilizzato metodi microbiologici/biochimici hanno correttamente identificato il ceppo appartenente al gruppo MTBC (*M. bovis*/*M. caprae*).

Il circuito conferma che i laboratori che utilizzano le tecniche microbiologiche/biochimiche, lo fanno solo in modo parziale e, in particolare, con l'obiettivo di identificare la specie *M. bovis* che è quella che riveste la maggiore importanza sotto il profilo sanitario. Per le altre specie l'esito fornito non è sempre definitivo ovvero si limita all'identificazione del genere *Mycobacterium* o di un raggruppamento (*M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex).

Nel 2019 è stato effettuato anche il circuito interlaboratorio per la ricerca di bacilli acido-resistenti in sezioni istologiche a cui ha partecipato tutta la rete nazionale degli IIZZSS.

La finalità del test è stata di verificare l'identificazione dei bacilli acido-resistenti nei preparati istologici colorati con Ziehl-Neelsen.

Il range dei valori della Kappa di Cohen ottenuto per singolo laboratorio è stato tra -0.04 e 1 e la significatività statistica del test, che permette di evidenziare la presenza di un accordo tra lettori e il centro di riferimento, ha evidenziato l'assenza di accordo solo con un laboratorio a causa dell'elevato numero di vetrini non correttamente interpretati, per tutti gli altri lettori, il test è risultato statisticamente significativo.

Nel complesso l'esito del circuito interlaboratorio è da considerarsi favorevole per la maggior parte dei laboratori.

Il LNR-TB ha partecipato a numerosi circuiti interlaboratorio organizzati dall'EURL-TB (diagnosi di tubercolosi bovina mediante prova γ -interferon, caratterizzazione molecolare di micobatteri del

gruppo MTBC, diagnosi istopatologica di tubercolosi bovina) e da altre organizzazioni internazionali quali:

- INSTAND: valutazione dei metodi per l'identificazione molecolare e microbiologica/biochimica dei ceppi isolati di micobatteri.
- QCMD: valutazione del metodo per la ricerca di MTBC mediante PCR Real Time.
- QCMD: valutazione del metodo di sequenziamento del gene RNAr 16S per l'identificazione molecolare di *Mycobacterium* spp. (MOTT) ed altre specie batteriche.
- AHLVA: valutazione del Metodo per la diagnosi di tubercolosi bovina prova γ -interferon.

I report dei circuiti interlaboratorio organizzati dall'EURL-TB tra il 2018-2019 (diagnosi di tubercolosi bovina mediante prova γ -interferon, caratterizzazione molecolare di micobatteri del gruppo MTBC, diagnosi istopatologica di tubercolosi bovina), indicano risultati soddisfacenti o molto soddisfacenti con giudizio finale sulle performance di laboratorio favorevole. L'unico dato discrepante rispetto all'esito atteso ha riguardato la caratterizzazione molecolare del locus ETRD (Proficiency testing for the molecular characterization of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex) che tuttavia nella valutazione finale non è stato considerato visto che il LNR-TB ha utilizzato un criterio interpretativo diverso dall'EURL-TB.

Per quanto riguarda i risultati degli altri circuiti (INSTAND, QCMD, AHLVA), il LNR-TB ha ottenuto esiti conformi in tutte le prove mostrando ottime performance per i metodi in esame. Queste valutazioni positive garantiscono lo standard di qualità di esecuzione dei metodi ufficiali utilizzati presso il LNR-TB per la diagnosi di TB.