

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

Nel corso del 2018 il CRN-TB ha partecipato a tutti ring test organizzati dall'EURL-TB e in particolare:

1 Proficiency testing for the bacteriological culture and direct detection of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine tissues (2017-2018).

Purpose

The main objectives of this proficiency testing are:

- To assess the ability of NRLs to provide accurate results for the laboratory confirmation of bovine tuberculosis by culture (65/432/CE).
- 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 culture for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) for accreditation purposes.
- To assess the performance of DNA isolation and PCR amplification for the direct detection of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in animal tissues.

Matrici

Pannello di 8 campioni di tessuto (2,5 g ciascuno) contenenti:

- Campioni di tessuto di bovino contaminato sperimentalmente con *M. bovis* BCG,
- Campioni di campo (tessuto bovino) risultati positivi alla presenza di *M. bovis* mediante isolamento culturale e PCR.
- Campioni di tessuto contenenti *M. avium* o altri micobatteri non tubercolari.

Analiti

Per le prove batteriologiche e molecolari:

- Micobatteri
- Genoma dei micobatteri, mediante PCR Real Time e/o PCR end point.

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.

Periodo: Novembre 2017- Settembre 2018

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Il laboratorio ha identificato correttamente 7 campioni su 8 con la PCR Real Time: un campione contaminato con il titolo più basso di *M. bovis* (290 CFU) ha dato esito negativo. Per quanto riguarda l'esame colturale, non sono risultati positivi alla prova i campioni contaminati con *M. bovis* (290 CFU). Il Centro di referenza europeo (EURL-TB) ha considerato questi risultati soddisfacenti con esito favorevole.

2 Proficiency testing for the interferon gamma release assay (2017-2018)

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 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: Dicembre 2017- Giugno 2018

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Tutti i campioni sono stati identificati correttamente da parte del LRN-TB. Il laboratorio ha riportato una specificità e sensibilità molto soddisfacente e un eccellente concordanza tra i risultati ottenuti e i risultati attesi (Kappa index). La riproducibilità e il z-score sono risultati soddisfacenti mentre la precisione, inizialmente scarsa, dopo rivalutazione da parte del l'EURL-TB, è stata valutata soddisfacente. Il giudizio finale sulle performance di laboratorio è risultato favorevole.

3 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 assignation 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

Genoma dei micobatteri.

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Europa, laboratori nazionali di riferimento.

Periodo: Novembre 2018- Giugno 2019

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Il report finale del ring test sarà reso disponibile dall'EURL-TB a Giugno 2019.

4 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

Il report finale del ring test sarà reso disponibile dall'EURL-TB a Settembre 2019.

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. simiae*, *M. abscessus*, *M. chimaera*, *M. tuberculosis*, *M. gordonae*.

Analiti

Reazioni enzimatiche

Genoma dei micobatteri mediante reazione PCR end point e sequenziazione del gene RNAr 16S.

Luogo e periodo di svolgimento

Europa, laboratori nazionali di riferimento e altri laboratori nazionali/internazionali (87 partecipanti).

Gennaio 2018- Aprile 2018

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 2018 *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 106 laboratori da 23 diversi paesi.
- Periodo: Ottobre 2018-Novembre 2018

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 2018 – Gennaio 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.

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 2018 si è concluso un circuito per l'identificazione di micobatteri da ceppo isolato mediante metodi molecolari (PCR end point, PCR/RFLP, PCR HRM, sequenziazione Sanger) ed è stato organizzato un nuovo circuito sull'identificazione microbiologica/biochimica dei micobatteri.

La prova valutativa per l'identificazione molecolare dei micobatteri ha mostrato risultati soddisfacenti e piuttosto omogenei tra i partecipanti, in particolare per l'identificazione di *M. bovis* e MTBC. Scopo del circuito era quello di verificare i livelli di competenza tecnica dei laboratori che eseguono l'esame PCR per l'identificazione di *M. bovis* da ceppo isolato. Tutti i laboratori sono stati in grado di identificare *M. bovis*.

Per quanto riguarda il circuito organizzato per l'identificazione di micobatteri mediante metodi microbiologici/biochimici, dei 5 laboratori partecipanti solo tre hanno effettuato le prove microbiologiche.

Le prove microbiologiche/biochimiche pur essendo tuttora presenti nella normativa nazionale, sono utilizzate solo dal CRN-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).

Il LNR ha partecipato a numerosi circuiti interlaboratorio organizzati dall'EURL-TB (verifica dei metodi di isolamento di micobatteri, rilevamento di MTBC mediante PCR Real Time, diagnosi di tubercolosi bovina 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 microbiologia/biochimica dei ceppi isolati di micobatteri,
- QCMD: valutazione del metodo per la ricerca di MTBC mediante PCR Real Time.

- AHLVA: valutazione del Metodo per la diagnosi di tubercolosi bovina prova γ -interferon.

Gli esiti dei circuiti interlaboratorio organizzati dal l'EURL-TB nel 2018 (caratterizzazione molecolare di micobatteri del gruppo MTBC, diagnosi istopatologica di tubercolosi bovina) verranno comunicati nel 2019.

I report dei circuiti organizzati nel 2017 (verifica dei metodi di isolamento di micobatteri, rilevamento di MTBC mediante PCR Real Time, diagnosi di tubercolosi bovina prova γ -interferon) pubblicati nel 2018, indicano risultati soddisfacenti o molto soddisfacenti con giudizio finale sulle performance di laboratorio favorevole.

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.