

Circuito Interlaboratorio per: Prove di identificazione molecolare di micobatteri con particolare riferimento a MTBC e *Mycobacterium bovis* (Tubercolosi bovina)

Descrizione

Il Centro di Riferenza per La TB ha distribuito i metodi d'identificazione molecolare dei micobatteri agli IIZZSS che comprendono:

- Identificazione del genere *Mycobacterium*, del gruppo *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) e di *M. avium* mediante le reazioni PCR descritte da Kulski et al. (1995);
- Differenziazione dei micobatteri del gruppo MTBC (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*) mediante identificazione dei polimorfismi del gene *gyrB*. (Abass et al. 2010; Papetti et al. 2014).

Obiettivo

- Verificare l'efficienza e il mantenimento dei metodi d'identificazione descritti da Kulski et al. (1995) o eventuali metodi alternativi;
- Verificare l'efficienza e il mantenimento del metodo PCR/RFLP del gene *gyrB* o di eventuali metodi alternativi per l'identificazione delle specie del gruppo MtbC.

Matrici

Pannello di n° 10 campioni costituiti da DNA estratto da colture di ceppi batterici mediante trattamento termico a 95°C per 15 min. (vedi Tabella 1). I campioni di DNA sono identificati con un codice numerico.

Tabella 1. Identificazione dei campioni.

ID PROVETTA	ID M.O.	Esito Atteso PCR Kulski			Esito atteso PCR/RFLP <i>gyrB</i>
		PCR Genere <i>Mycobacterium</i>	PCR MTBC	PCR <i>M. avium</i>	
1	<i>M. bovis</i>	POS	POS	NEG	POS (frammenti di PM 480 bp, 105 bp, 100 bp, 80 bp)
2	<i>M. bovis</i> dil 1/5	POS	POS	NEG	POS (frammenti di PM 480 bp, 105 bp, 100 bp, 80 bp)

3	<i>M. avium</i>	POS	NEG	POS	NA
4	<i>M. avium</i> dil 1/5	POS	NEG	POS	NA
5	<i>M. fortuitum</i>	POS	NEG	NEG	NA
6	<i>M. fortuitum</i> dil 1/5	POS	NEG	NEG	NA
7	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG	NA
8	<i>R. equi</i>	NEG	NEG	NEG	NA
9	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG	NA
10	TE pH 8.0	NEG	NEG	NEG	NA

NA: non applicabile

Analiti

Per le prove molecolari:

- Genoma dei micobatteri mediante PCR end point.

Luogo e periodo di svolgimento

Luogo: Italia, nove laboratori (vedi dettaglio punto successivo)

Periodo: Dicembre 2017- Marzo 2018

Numero e tipo di laboratori partecipanti

Partecipanti

I laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali che hanno aderito al circuito sono stati:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Catanzaro)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Torino)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (Sassari)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Barcellona P/G)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (Perugia)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (Roma)

Anche l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna, che ha organizzato il circuito, vi ha preso parte in qualità di partecipante.

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Nella tabella 2 è presentato il quadro riassuntivo della identificazione dei campioni per ogni laboratorio. In ogni cella è riportata la valutazione effettuata dal laboratorio su ogni campione. Le ultime due righe finali riportano per ogni laboratorio il numero di valutazioni corrette e l'accuratezza

espressa in percentuale calcolata come numero di valutazione corrette effettuata sul totale dei campioni esaminati. In rosso le classificazioni non corrette.

Tabella 2. Per ogni campione sono riportati i valori di classificazione indicati dai laboratori e la corretta classificazione. In rosso le classificazioni erranee. Le ultime due righe per ogni laboratorio riportano il numero di classificazioni corrette e la % di accuratezza.

id campione	risultato atteso	lab10	lab17	lab46	lab53	lab57	lab224	lab270	lab280	lab282
1	<i>M. bovis</i> /MTC	<i>M. bovis</i>	MTC	MTC	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
2	<i>M. bovis</i> /MTC	<i>M. bovis</i>	MTC	MTC	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
3	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	M. spp.	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
4	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	M. spp.	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
5	Myc. spp./ <i>M. fortuitum</i>	M. spp.	M. spp.	M. spp.	M. spp.	M. spp.	M. spp.	M. spp.	NEG	M. spp.
6	Myc. spp./ <i>M. fortuitum</i>	NEG	NEG	NEG	M. spp.	NEG	NEG	M. spp.	NEG	M. spp.
7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
n corretti/totale		9/10	7/10	9/10	10/10	9/10	9/10	10/10	8/10	10/10
(% accuratezza)		90%	70%	90%	100%	90%	90%	100%	80%	100%

Sono 3 i laboratori che hanno correttamente classificato tutti e 10 i ceppi, facendo registrare un'accuratezza del 100% (IC95% 69-100%). Sono 4, i laboratori che hanno classificato correttamente 9 ceppi su 10, facendo registrare un'accuratezza del 90% (IC95% 55-99%). Infine 2 laboratori hanno fatto registrare valori di accuratezza del 80% (IC95% 44.97%) e del 70% (IC95% 35-93%), classificando erroneamente 2 e 3 ceppi. Nel complesso, le performance dei laboratori sono risultate abbastanza omogenee ($\chi^2 = 58.727$, p-value = 0.41) e nel complesso soddisfacenti. In tabella 3, sono riportati i valori di accuratezza e del Kappa di Cohen a livello globale, oltre che per laboratorio.

Tabella 3. Per ogni laboratorio sono riportati i valori della Kappa di Cohen quale indice di accordo per ciascun laboratorio con i risultati attesi.

Id Laboratorio	N° campioni Classificati correttamente	Accuratezza (IC95%)	K di Cohen	K di Cohen IC95%
Lab 10	9/10	90% (55-99%)	0.86	0.60-1

Lab 17	7/10	70% (35-93%)	0.57	0.17-0.98
Lab 46	9/10	90% (55-99%)	0.86	0.60-1
Lab 53	10/10	100% (69-100%)	1	0.63-1
Lab 57	9/10	90% (55-99%)	0.86	0.60-1
Lab 224	9/10	90% (55-99%)	0.86	0.60-1
Lab 270	10/10	100% (69-100%)	1	0.63-1
Lab 280	8/10	80% (44-97%)	0.71	0.34-1
Lab 282	10/10	100% (69-100%)	1	0.63-1
globale	81/90	90% (82-100%)	0.86	0.77-0.95

Tutti i laboratori hanno riconosciuto correttamente i campioni di *M. bovis* (positivi) ed i campioni non appartenenti al genere *Mycobacterium* (negativi). Tutti i laboratori, tranne uno, hanno riconosciuto correttamente i campioni di *M. avium*. Il laboratorio che non ha riconosciuto *M. avium* ha classificato i due campioni come *Mycobacterium spp.* Per quanto riguarda il campione 5 solo un laboratorio ha evidenziato problemi di classificazione, non riconoscendo il genere *Mycobacterium*. Infine, il campione 6 (*M. fortuitum*) è stato quello che ha creato maggiori problemi di identificazione, in quanto è stato correttamente classificato solo da 3 laboratori.

In generale da un punto di vista diagnostico i risultati sono decisamente positivi, in quanto non è stato commesso nessun errore sulla corretta identificazione dei campioni positivi (*M. bovis*) e dei campioni negativi (non appartenenti al genere *Mycobacterium*). Le stime di accuratezza a livello di singoli laboratori, sono comunque, accettabili con un range di valori compreso tra 70% e 100% ed a livello globale l'accuratezza è decisamente soddisfacente (90%, IC95% 81.9-99.7%). Questi risultati sono confermati anche dai valori del kappa di Cohen che per singolo laboratorio presentano livelli di accordo con il risultato atteso soddisfacenti. La concordanza tra tutti i laboratori rispetto all'atteso è risultata molto alta; difatti il valore di K pari a 0.86 secondo la tabella proposta da Landis & Koch, è interpretabile come accordo quasi perfetto. Tutti i valori ottenuti sono interpretabili come un alto grado di riproducibilità. Anche la concordanza tra laboratori, valutata attraverso il di Kappa di Fleiss è risultato elevata (0.83) secondo la tabella proposta da Landis & Koch, interpretabile come accordo quasi perfetto, indica una elevata concordanza.

Dall'analisi qualitativa è stato possibile saggiare una effettiva e soddisfacente concordanza tra i diversi laboratori nell'identificare correttamente i campioni, come esplicitato dalla Kappa di Cohen. Lo scopo del circuito è quello di verificare i livelli di competenza tecnica dei laboratori che eseguono l'esame PCR per l'identificazione di *M. bovis* da ceppo isolato. Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato soddisfacente e piuttosto omogeneo tra i partecipanti. Tutti i laboratori sono in grado di identificare *M. bovis*.

Bibliografia

- Abass NA**, Suleiman KM, El Jalii IM. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their GyrB polymorphism. Indian J. Med. Microbiol. 2010; 28:26-29.
- Cohen, J. (1960). *A coefficient of agreement for nominal scales. Educational and Psychological Measurement*, 20, 37-46.
- Fleiss, J. L.** (1971) "Measuring nominal scale agreement among many raters." Psychological Bulletin, Vol. 76, No. 5 pp. 378–382
- Fleiss, J. L. (1981) Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. (New York: John Wiley) pp. 38–46
- Landis J, Koch G (1977) *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics
- Agresti, A.** (2007) *An Introduction to Categorical Data Analysis, 2nd ed.*, N
- Core Team (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Kulski KJ**, Khinsoe C, Pryce T, Christiansen K. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:668-674.
- Papetti A**, Loda D, Pacciarini ML, Boniotti MB. 2014. Molecular Identification of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by high resolution melting. 3rd EAVLD Congress, Pisa 12-15 Ottobre.