

Circuito Interlaboratorio per: Prove di identificazione di ceppi isolati del genere *Mycobacterium* mediante tecniche microbiologiche/biochimiche (Tubercolosi bovina)

Descrizione

Il presente report descrive i risultati del circuito di prove interlaboratorio, organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi Bovina (CRNTB), inerente l'identificazione di micobatteri con metodi microbiologici con particolare riferimento all'identificazione di *Mycobacterium bovis*/*M. caprae*.

La maggior parte dei laboratori IIZZSS non utilizza metodi microbiologici/biochimici per l'identificazione dei ceppi micobatterici previsti dall'allegato 2 del Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1995, n° 592 (DM592), ma metodi molecolari previsti dal manuale OIE (Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018, Chapter 3.4.6) e dal Regolamento (CE) n° 1226/2002.

Pertanto la partecipazione al circuito era riservata ai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) che tuttora eseguono le prove microbiologiche/biochimiche e ai quali è stato richiesto di identificare le specie micobatteriche di appartenenza da un gruppo di campioni di prova. L'obiettivo generale del circuito era quello di fornire ai partecipanti informazioni sullo standard di qualità di esecuzione delle prove nell'ottica di un miglioramento delle proprie prestazioni, attraverso la valutazione dell'efficienza delle metodiche microbiologiche/biochimiche utilizzate per l'identificazione di micobatteri.

Matrici

Pannello di 5 ceppi micobatterici isolati dal campo risospesi in terreno liquido Middlebrook 7H9 così costituiti:

2.1. Preparazione e tipologia dei campioni

Ai laboratori che hanno partecipato, sono stati inviati 5 ceppi micobatterici isolati dal campo risospesi in terreno liquido Middlebrook 7H9.

PROVE MICROBIOLOGICHE: ESITI ATTESI

Ceppo	Caratteristiche colturali					Caratteristiche biochimiche			
	Velocità crescita	Crescita a 25 °C	Crescita a 37 °C	Crescita a 42 °C	Foto-reattività	Ureasi	Tellurito	Nitrati	Niacina
1) <i>M. bovis</i>	L	N	N	N	N	P	N	N	N
2) <i>M. avium</i>	L	V	P	N	N	N	P	N	N
3) <i>M. fortuitum</i>	R	P	P	N	N	P	V	P	N
4) <i>M. nonchromogenicum</i>	L	P	V	N	N	N	N	N	N
5) <i>M. marinum</i>	I,L	P	N	N	F	P	V	N	V

Ceppo	Caratteristiche biochimiche					Test di crescita		
	Aril-solfatasi	Pirazin-amidasi	Tween idrolisi	Catalasi t.s.	Ferro utilizzo	T2H	NaCl 5%	McConkey senza cv
1) <i>M. bovis</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
2) <i>M. avium</i>	N	P	N	I	N	P	N	V
3) <i>M. fortuitum</i>	P	P	N	P	P	P	P	P
4) <i>M. nonchromogenicum</i>	N	P	P	P	N	P	N	N
5) <i>M. marinum</i>	P	P	P	P	N	P	V	N

LEGENDA ESITI

- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 – 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Fotoreattività (produzione pigmento): N (non cromogeno); F (fotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche: P (positivo), I (intermedio/dubbio), N (negativo), V (variabile)

Analiti

Per le prove microbiologiche/biochimiche:

Ceppi batterici

Luogo e periodo di svolgimento

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

Periodo: Marzo-Settembre 2018

Partecipanti

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

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Torino)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Barcellona P/G)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo)
- 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, ha preso parte in qualità di partecipante.

Follow up, Conclusioni e Raccomandazioni

Dei 5 laboratori partecipanti solo tre hanno eseguito le prove di identificazione con metodi microbiologici/biochimici. Un laboratorio non ha eseguito le prove, mentre un laboratorio ha identificato correttamente tutti i ceppi senza ricorrere alle prove microbiologiche ma utilizzando metodi molecolari. I risultati delle prove microbiologiche, dei tre laboratori che le hanno eseguite, sono riportati nella tabella sottostante.

Id campione	Risultato atteso	lab 100	lab 90	lab 270
1	<i>M. bovis/M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	MTBC	<i>M. bovis</i>
2	<i>M. avium</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i>
3	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. fortuitum</i>
4	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. nonchromogenicum</i>
5	<i>M. marinum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. marinum</i>

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 laboratorio 90 ha utilizzato i test sulle caratteristiche colturali (velocità e temperatura di crescita) e alcuni test biochimici (ureasi, tellurito, pirazinamidasi, T2H) che hanno portato all'identificazione di micobatteri del gruppo MTBC, del gruppo *M. avium* complex e *Mycobacterium other than tuberculosis* (MOTT).

Il laboratorio 100 ha utilizzato oltre ai test colturali/morfologici (velocità e temperatura di crescita, pigmentazione) anche alcuni test biochimici (ureasi, tellurito, riduzione dei nitrati, niacina) ma non è stato in grado di identificare correttamente 2 ceppi MOTT ed *M.avium*.

Il laboratorio 270 ha identificato correttamente tutti i ceppi.

Da precisare che il laboratorio 90 utilizza tutte le tecniche molecolari indicate dal CRN-TB per identificare *M. bovis*, *M. caprae* (agenti eziologici della TB) e differenziarli dagli altri componenti dal gruppo MTBC così come dai micobatteri MOTT.

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).

Bibliografia

Roberts, G.D.; Koneman, E.W.; Kim, Y.K. *Mycobacterium*, in: Balows, A.; Hausler, W.J. Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shadomy H.J. (eds.) *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.: 304 – 339; 1991

Lutz, B. Identification tests for mycobacteria, in: Isenberg, H.D. (ed.) *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington D.C.: 3.12.1 – 3.12.29; 1992