

Confronto tra PCR ed isolamento MTBC in campioni di tessuto

M. Zanoni

Centro Referenza Nazionale Tubercolosi Bovina

Laboratorio Nazionale di Riferimento della Tubercolosi Bovina

Workshop CRN-TB, 21 Giugno 2022.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

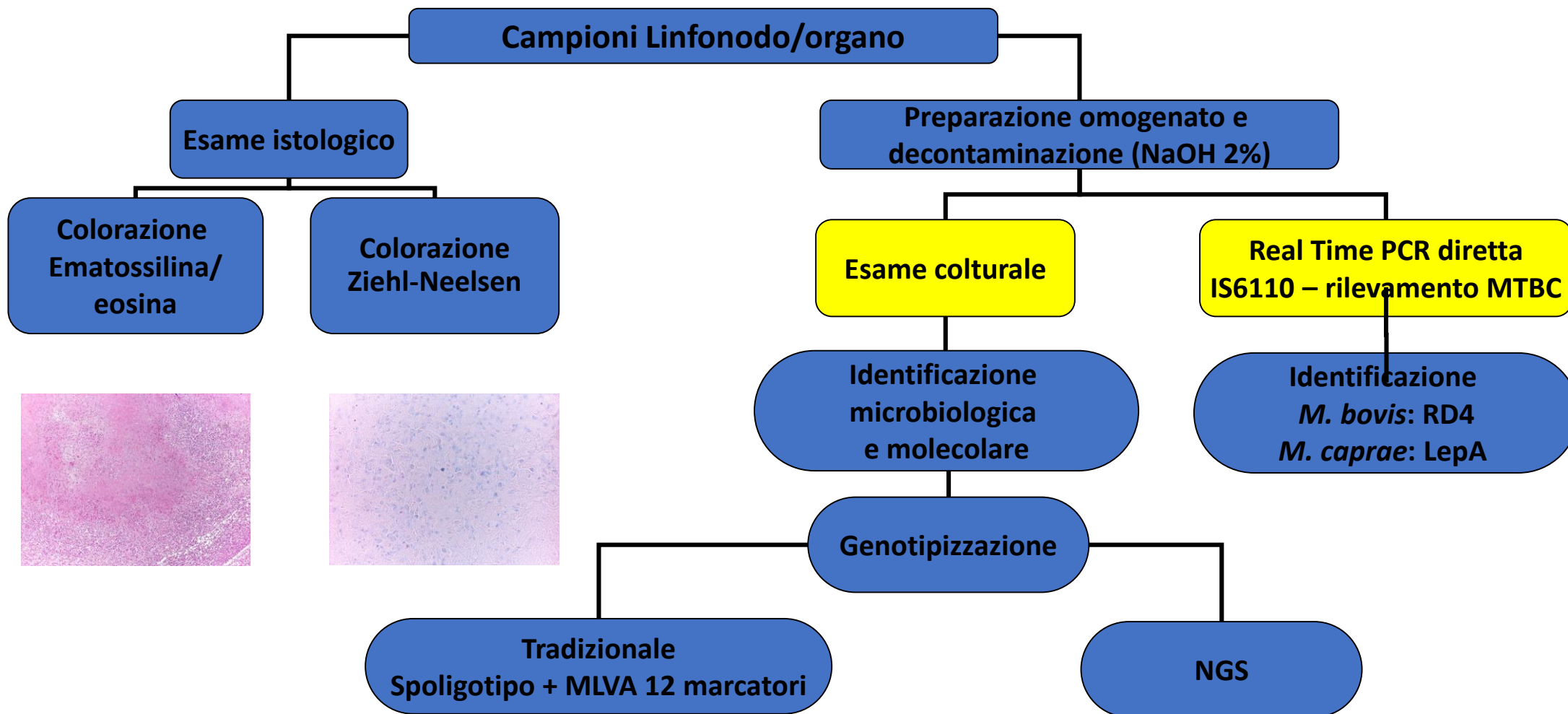
Obiettivi



Percorso diagnostico: considerazioni

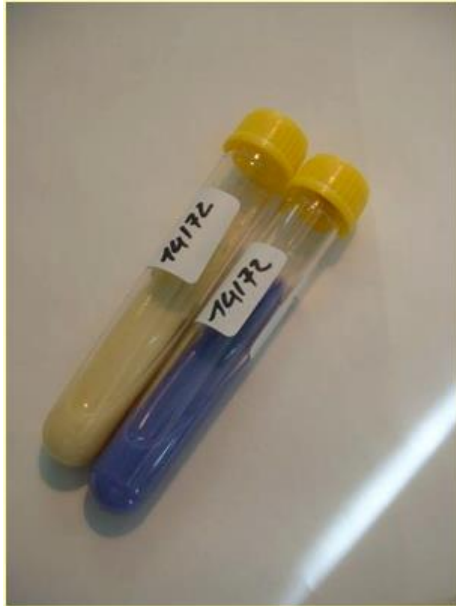
1. Valutare la concordanza sviluppo MTBC in terreni solidi e liquidi.
2. Valutare i giorni di crescita MTBC nei diversi terreni colturali.
3. Confronto Esame Colturale e PCR diretta su tessuto.

Percorso diagnostico

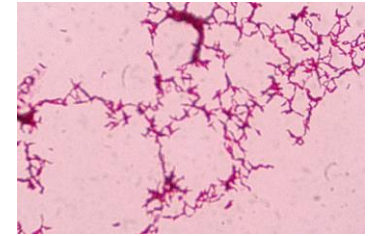


considerazioni:

- **Isolamento MTBC con tecniche tradizionali**



1. allo sviluppo su terreni solidi segue uno studio della morfologia batterica e colorazione di ZN (valutando anche la presenza o l'assenza del fattore cordale).
2. Per studi retrospettivi o approfondimenti viene effettuata la caratterizzazione colturale (tempo, temperatura, aspetto crescita) e test biochimici.

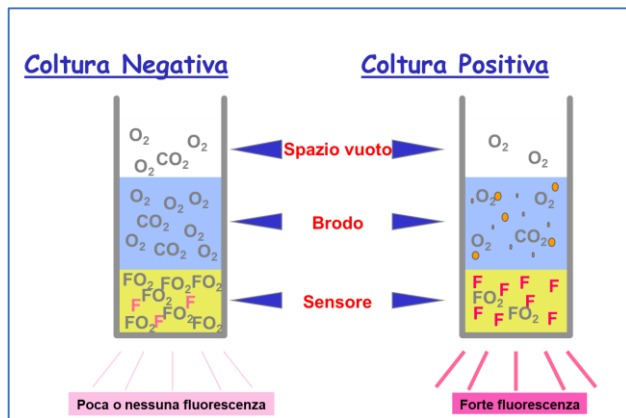


STONEBRINK-LÖWENSTEIN-JENSEN: terreni a base d'uovo con diversa selettività addizionati o meno con piruvato e glicerolo

Micobatteri	Crescita		Ureasi	Riduzione tellurito	Riduzione nitriti	Niacina
	37°C	43°C				
<i>M. bovis</i>	L	-	+/-	+/-	-	-
<i>MAI complex</i>	L	L	-	+	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	L	-	+/-	+/-	+	+

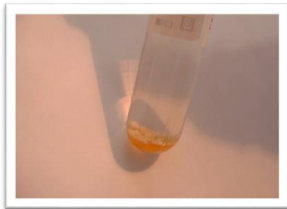
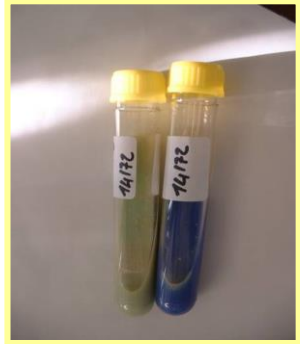
considerazioni:

- **Isolamento con il sistema automatizzato e terreno liquido**



	2003-2021	% isolamento con MGIT	% isolamento con LJ-ST
M. bovis	1121	99,5	78,6
M. avium	125	93,6	78,4
M. fortuitum	58	87,9	94,8
M. marinum	34	61,8	100,0
M. nonchromogenicum	60	76,7	78,3
M. chelonae	31	93,5	93,5
"M. terrae complex"	19	78,9	84,2
M. kansasii	8	100,0	87,5
M. microti	15	53,3	66,7
M. gordonae	4	100,0	100,0
M. bovis + M. avium (2) M. bovis + M. kansasii M. bovis + M. nonchromogenicum	4	100,0	100,0
M. tuberculosis	2	100,0	100,0
M. chimerae	2	100,0	0,0

1. CONCORDANZA SVILUPPO MTBC IN TERRENI SOLIDI E LIQUIDI



		Terreno solido			K di Cohen (p-value)
		Negativo	Positivo	Totale	
Terreno liquido	Negativo	0	2	2	0.02 (p=0.10)
	Positivo	186	274	460	
	Totale	186	276	462	

La concordanza tra terreni è scarsa e il p-value maggiore del 5% lo conferma (p=0.10).



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

considerazioni:

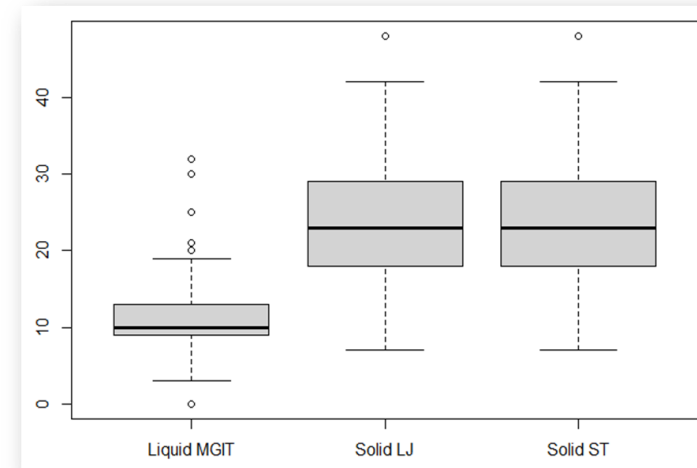
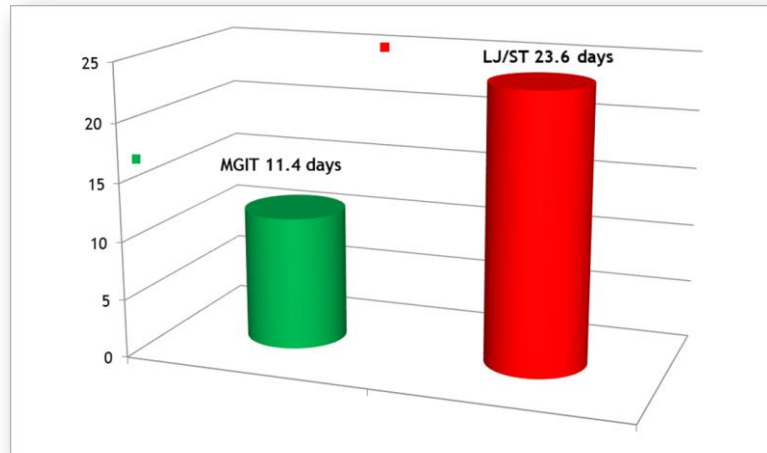
- *Stato di conservazione del campione*
- *Processazione del campione da parte del laboratorio*

Provenienza del campione	campioni/anno	% contaminazioni	
		MGIT 960	LJ + ST
Bovino	806/2003-04-05	6,8 /2003-04-05	0,6 /2003-04-05
	820/2006-08	0,7 /2006-08	1 /2006-08
Animali selvatici	205/2003-04-05	3.4 /2003-04-05	1.9 /2003-04-05
	173/2006-08	0	0
Cervi	598/2011	1,8 /2011	0,7 /2011
Cinghiali	409/2011	2,6 /2011	0,3 /2011
Pesce	197/2003-04-05	3.5 /2003-04-05	0
	114/2006	0	0
Suino	119/2003-04-05	0	1.7 /2003-04-05
	530/2006-08	0	0.2 /2006-08

Anno	Liquido	Solido	p-value
2016	13.9 [9.5;20.4]	34.8 [25.6;47.2]	<0.0001
2017	13.8 [12.1;15.7]	24.4 [21.9;27.2]	<0.0001
2018	10.0 [8.8;11.2]	20.4 [18.5;22.5]	<0.0001
2019	11.0 [9.9;12.2]	22.6 [20.8;24.7]	<0.0001
2020	11.2 [9.8;12.8]	24.4 [22.0;27.1]	<0.0001
2021	11.4 [10,1;12.8]	23,5 [21.4;25,9]	<0.0001



2. Giorni di crescita MTBC in terreni solidi e liquidi



La media dei giorni di crescita è statisticamente diversa tra MGIT (media=**11.4**, 95%CI[10.1;12.8]) e terreni solidi (media=**23.6**, 95%CI[21.4;25.9]), confermando le migliori performance, di sensibilità e rapidità di crescita, del M. Bovis nel terreno liquido.



3. Confronto Esame Colturale e PCR diretta su tessuto (aa 2014-2021)

		Esame colturale (MP)		Totale	K di Cohen (p-value)
		Negativo	Positivo		
PCR-RT	Negativo	526	54*	580	0.86 (p<0.0001)
	Positivo	31**	583	614	
Totale		557	637	1194	
<i>Esiti concordi (526+583)/1194= 92.9%</i>					
<i>Esiti discordi (31+54)/1194 = 7.1%</i>					

PCR diretta su tessuto
Sensibilità 95,0%
Specificità 90,7%

Indice Cohen
K=0,86
(p<0,0001)

*n°21 campioni NVL di animali non infetti/infetti provenienti da allevamenti infetti;

**n°6 campioni colture miste; n°15 campioni NVL di animali infetti provenienti da allevamenti infetti; n°10 campioni NVL di animali non infetti provenienti da allevamenti infetti.

GRAZIE PER LA
VOSTRA
ATTENZIONE

**ISTITUTO ZOOPIROFILATICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDA E DELL'EMILIA ROMAGNA**
Secondo settore

M. bovis

PAPER NUMBER: 192 – THEME: 6. Diagnostics development and strategies

High concordance of culture isolation with Real-Time PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) in tissue samples

Background
Bacteriological isolation of *M. bovis*/M. caprae is still considered the reference method for diagnostic confirmation of Bovine Tuberculosis (TB) [1]. However, the growth of microorganism requires long incubation time and the recovery rate can be affected by decontamination step and low bacteriological loads. In order to strengthen the Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) detection ability, we evaluate the performance of isolation systems (solid and liquid) and molecular test [1].

Material and Methods
During the Italian eradication campaign over the period 2013-2021, 1377 tissue samples were collected from TB suspected animals. Samples were analyzed by Liquid MGIT, Solid Growth (ST) and Lowenstein-Jensen (LJ) media, and RT-PCR (IS6110 trapson).
Analysis: To compare the groups Cohen's K_v concordance index was calculated; the result obtained was finally interpreted following the method proposed by Landis and Koch [2]. The average of days of growth was calculated through "Generalized linear mixed model", Poisson distribution, considering time and culture medium as independent variables and the number of a random effect of the model.

Results
Differences in the growing days in among cultures
The average of growing days was statistically different between MGIT (mean=11.4, 95%CI[10.1;12.8]) and solid media (mean=23.5, 95%CI[21.4;25.6]), confirming the reliability and sensitivity of liquid culture isolation. $p < 0.0001$

278 samples = both solid and liquid isolation
198 samples = only liquid isolation
2 samples = only solid media

Cohen K_v index=0.02
p=0.30
LACK OF CONCORDANCE

RT-PCR and culture outcome comparison
Cohen K_v index=0.96 (p<0.0001)
Sensitivity and Specificity of RT-PCR test, evaluated in comparison to culture isolation, was 92% and 90.7%, respectively.
However, most of the RT-PCR positive and culture isolation negative samples were collected from TB suspected animals and Specificity need to be recalculated with the use of Latent Class Analysis (LCA).

	+	-
+	583	31
-	54	526

Conclusion
This study confirms the high performance of liquid culture isolation for MTBC isolation in a veterinary laboratory. According to international guidelines, the best recovery rate was obtained with the combination of solid and liquid media. In addition these results underline the importance of RT-PCR test to reduce the time of TB diagnostic confirmation and to detect additional positive samples with no microbiological viability or low bacterial loads.

Reference
[1] OIE (World Organisation for Animal Health). 2018. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Bovine Tuberculosis. Chapter 3.6.6. pp. 1039-75.
[2] Landis JR, Koch GG. The kappa statistic. Biometrics. 1977;33:159-77.
[3] World Health Organization. 2010. Guidelines for the control of tuberculosis. Geneva: WHO; 2010.
[4] World Health Organization. 2010. Guidelines for the control of tuberculosis. Geneva: WHO; 2010.
[5] Cohen J. 1988. Cohen's kappa coefficient for nominal scales. Biometrical and Psychological Measurement 20:37-46.
[6] Fleiss J, Cohen J. 1973. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 29: 359-71.

Contact: Dr. Mariagrazia Diaboli - mariagrazia.diaboli@izs.it

Si ringraziano i colleghi del Centro di referenza nazionale per la tubercolosi da *M. bovis* (CRN-TB)