

RICERCA DI *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (*Map*) DA FECI BOVINE: CONFRONTO TRA QUATTRO DIFFERENTI METODI PCR

Taddei R.¹, Belletti GL.¹, Beltrami A.³, Tamba M.², Arrigoni N.¹,
¹Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi – IZSLER Sezione di Piacenza
²CEREV – IZSLER Sezione di Bologna
³Libero professionista

Key words: paratuberculosis, PCR, diagnosis

SUMMARY

Four different PCR protocols based on three commercially available assays for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) from fecal samples, were compared. The methods included both traditional PCR and Real Time PCR, coupled with different extraction strategies, based on chemical lysis or mechanical/chemical lysis.

Sensitivity of the assays resulted not related to the amplification protocols tested, while resulted positively affected by the introduction, in DNA extraction procedure, of a mechanical disruption step.

INTRODUZIONE

Nonostante il metodo d'elezione per la diagnosi diretta di Paratubercolosi sia a tutt'oggi la coltura fecale, la PCR rappresenta un metodo alternativo con indubbi vantaggi, legati in particolare ai brevi tempi di risposta (24-48 ore rispetto alle 16 settimane della coltura) ed alla assenza di problemi legati agli inquinamenti da muffe e batteri sporulati, spesso in grado di inficiare i risultati delle colture. Per ovviare al limite principale del test PCR, che consiste nella minor sensibilità rispetto alla coltura fecale, negli ultimi anni sono state proposte soluzioni tecnologiche diverse, sia a livello di estrazione che di amplificazione. Scopo del lavoro è il confronto tra quattro diversi protocolli di analisi PCR per la ricerca di *Map* da feci bovine, che differiscono sia nella fase di estrazione (lisi chimica o meccanico-chimica), che nella fase di amplificazione (PCR tradizionale o Real Time).

MATERIALI E METODI

Composizione panel di campioni

Per la valutazione della sensibilità, è stato selezionato un pannello di 35 campioni di feci bovine, risultate positive all'esame colturale (2). I campioni sono stati classificati in diversi livelli di escrezione (bassa, moderata, alta), secondo i criteri della metodica colturale semiquantitativa (4) (vedi tabella seguente).

N° campioni	Esito esame colturale	N° colonie/provetta
13	+ (escrezione bassa)	≤ 10 colonie
9	++ (escrezione moderata)	11-50 colonie
13	+++ (escrezione alta)	> 50 colonie

Per la valutazione della specificità sono stati raccolti 35 campioni negativi, provenienti da animali appartenenti ad una stalla di bovine di razza Frisona Italiana, presumibilmente indenne da Paratubercolosi, in quanto ripetutamente sieronegativa e senza segnalazioni di casi clinici, né introduzione di animali negli ultimi 5 anni.

Protocolli analitici PCR

I 70 campioni di feci bovine sono stati sottoposti a 4 diversi protocolli di analisi PCR che differiscono tra loro sia per la fase di estrazione, che per la fase di amplificazione, come riassunto nella seguente tabella:

Metodo	Estrazione	Amplificazione
1	Lisi Chimica (kit ADIAVET® ParaTB)	PCR tradizionale (kit ADIAVET® ParaTB)
2	Lisi Meccanica + Chimica (kit ADIAVET® ParaTB)	PCR tradizionale (kit ADIAVET® ParaTB)
3	Lisi Meccanica + Chimica (kit ADIAVET® ParaTB)	PCR Real Time (kit LCSet - TibMolBio)
4	Lisi Meccanica + Chimica (kit Q-PCR - I. Pourquier)	PCR Real Time (kit Q-PCR - I. Pourquier)

a) Estrazione:

Lisi chimica (kit ADIAVET ParaTB – Adiage)

Aliquote di 1 g di feci sono state sottoposte, secondo il protocollo indicato dalla ditta produttrice, ad estrazione mediante lisi chimica con tampone di lisi fornito dal kit e proteinasi k, seguita da purificazione dell'estratto di DNA con colonne di affinità (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen).

Lisi meccanico-chimica (kit ADIAVET ParaTB–Adiage)

Aliquote di 1 g di feci sono state sottoposte, secondo il protocollo indicato dalla ditta produttrice, ad estrazione mediante lisi meccanica con biglie di vetro (omogenizzatore TissueLyzer, Qiagen), seguita da trattamento con proteinasi k e purificazione dell'estratto di DNA con colonne di affinità (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen).

Lisi meccanico-chimica (kit Q-PCR - Institut Pourquier)

Aliquote di 1,5 g di feci sono state sottoposte, secondo il protocollo indicato dalla ditta produttrice, a lisi meccanica mediante biglie di vetro (omogenizzatore TissueLyzer, Qiagen), seguita da trattamento con proteinasi k e purificazione dell'estratto di DNA con colonne di affinità (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen).

b) Amplificazione:

PCR tradizionale (kit ADIAVET® ParaTB - Adiage)

Il kit si basa sull'amplificazione di un frammento della sequenza d'inserzione IS900. La rilevazione viene effettuata su gel di agarosio all'1,3%.

PCR Real Time (kit LCSet - TibMolBio)

Il kit prevede l'utilizzo di una coppia di primer ed una coppia di sonde di tipo FRET, disegnate sulla sequenza IS900. I primer e le sonde sono stati aggiunti alla miscela di reazione LightCycler®FastStart DNA Master^{PLUS} (Roche). L'amplificazione è stata eseguita su apparecchio LightCycler 2.0 (Roche).

PCR Real Time (kit Q-PCR - Institut Pourquier)

Questo kit utilizza uno specifico set di primer e sonde di tipo FRET per l'identificazione di *Map*, disegnate sulla sequenza d'inserzione IS900. L'amplificazione è stata eseguita su apparecchio LightCycler 2.0 (Roche).

Analisi statistica

1. Valutazione dei metodi utilizzati

La capacità di ciascun metodo di classificare correttamente i campioni è stata valutata attraverso il calcolo della sensibilità, della specificità, dell'Indice J di Youden e della accuratezza.

2. Correlazione tra l'esito della PCR e il grado di contaminazione da *Map* del campione

Allo scopo di verificare se il livello di contaminazione del campione influenza la sensibilità dei metodi PCR, per ciascuno dei metodi considerati è stato calcolato il chi-quadro per il trend (3).

3. Influenza del metodo di estrazione sulla sensibilità del metodo

Poiché i metodi 1 e 2 differiscono unicamente per il tipo di estrazione eseguita (lisi chimica o meccanico-chimica), si è voluto verificare, mediante il test del chi-quadro, se i protocolli di estrazione testati influenzano significativamente la sensibilità del metodo.

4. Influenza del metodo di amplificazione sulla sensibilità del metodo

Poiché i metodi 2 e 3 differiscono unicamente per il protocollo di amplificazione eseguito (PCR tradizionale o PCR Real Time), si è voluto verificare mediante il test del chi-quadro, se l'introduzione di un protocollo di PCR Real Time abbia determinato un aumento significativo della sensibilità del metodo.

RISULTATI

I risultati ottenuti con i 4 metodi testati sono riassunti nella seguente tabella:

Esito colturale	N° campioni analizzati	Campioni positivi			
		Met. 1	Met. 2	Met. 3	Met. 4
Neg.	35	0	0	0	0
Pos. (+)	13	0	9	11	10
Pos. (++)	9	4	9	9	9
Pos. (+++)	13	12	13	13	13
Tot. positivi	35	16	31	33	32

Analisi statistica

1. Valutazione dei metodi utilizzati

Nella seguente tabella sono stati riportati i livelli di accuratezza, sensibilità e specificità ed Indice J di Youden calcolati per i 4 metodi.

Met.	SE	L.f 95% della SE		SP	L.f 95% della SP		J	Acc	L.f 95% accurat.	
1	0,46	0,29	0,63	1,0	0,90	1,00	0,46	0,73	0,61	0,83
2	0,89	0,73	0,97	1,0	0,90	1,00	0,89	0,94	0,86	0,98
3	0,94	0,81	0,99	1,0	0,90	1,00	0,94	0,97	0,90	1,00
4	0,91	0,77	0,98	1,0	0,90	1,00	0,92	0,96	0,88	0,99

Mentre tutti i metodi hanno mostrato uguale specificità pari ad 1, i valori medi di sensibilità variano tra 0,46 (Metodo 1) e 0,94 (Metodo 3).

In generale, si evidenzia una maggiore sensibilità nei metodi che prevedono un passaggio di lisi meccanica (Metodi 2, 3, 4 con sensibilità superiori a 0,89) rispetto al metodo con sola lisi chimica (Metodo 1 con sensibilità pari a 0,46).

2. Correlazione tra l'esito della PCR e il grado di contaminazione da *Map* del campione

Per 3 dei 4 metodi utilizzati (metodo 1, 2 e 4) il grado di contaminazione appare correlato alla probabilità di avere un risultato positivo in PCR (vedi tabella seguente).

Metodo	Chi-quadro	P
1	21,68	<0,001**
2	5,91	0,015*
3	2,77	0,096
4	4,29	0,038*

Il dato appare particolarmente consistente per il metodo 1, che non è stato in grado di individuare nessun campione proveniente da animali con bassa escrezione (+), mentre ha mostrato sensibilità intorno al 92% sui campioni provenienti da capi con escrezione alta (+++).

3. Influenza del metodo di estrazione sulla sensibilità del metodo

I valori di sensibilità dei metodi 1 e 2, che differiscono unicamente per il tipo di estrazione eseguita (lisi chimica o meccanico-chimica), hanno mostrato differenze significative (chi-quadro=12,69; p=0,0004).

Le modalità di estrazione del DNA sembrano quindi influenzare la sensibilità del metodo; in particolare, i campioni sottoposti ad estrazione con lisi meccanico-chimica hanno una probabilità 9 volte superiore di dare un esito positivo in PCR rispetto a quelli sottoposti solamente ad estrazione con lisi chimica (OR=9,2; I.f.95%: 2,7-31,7). Le differenze tra i metodi risultano più evidenti eliminando dall'analisi i campioni con elevata contaminazione (+++): sui campioni con contaminazione bassa o moderata (+/++) la probabilità di avere un esito positivo in PCR, se sottoposti ad estrazione con lisi meccanico-chimica, è risultata 20 volte superiore rispetto alla PCR eseguita su campioni sottoposti ad estrazione con sola lisi chimica (OR=20,3; I.f.95%: 4,4-93,8).

4. Influenza del metodo di amplificazione sulla sensibilità del metodo

Confrontando i metodi 2 e 3, che differiscono per il protocollo di amplificazione, risulta che i 2 protocolli di amplificazione testati, uno tradizionale (kit ADIAVET ParaTB, Adiagene) ed uno Real Time (kit LCSet, TibMolBiol), non sembrano influenzare in maniera significativa la sensibilità del metodo (chi-quadro=0,18; p=0,67), anche limitando l'analisi ai soli campioni a basso livello di contaminazione (chi-quadro=0,19; p=0,66).

DISCUSSIONE

Dall'analisi dei risultati ottenuti, possiamo rilevare che, in accordo con quanto indicato da precedenti studi (1), l'introduzione di un passaggio di lisi meccanica nella fase di estrazione, affiancato alla lisi chimica tradizionale, ha permesso di raggiungere livelli di sensibilità del metodo superiori rispetto a quelli ottenuti con la sola lisi chimica e sovrapponibili a quelli delle colture fecali. Viceversa, l'applicazione delle nuove tecnologie di PCR Real Time testate, seppure in grado di garantire livelli di specificità superiori e procedure di analisi più rapide (circa 3 ore, tra estrazione ed amplificazione), non ha determinato un ulteriore aumento di sensibilità del metodo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R. et al. (2003): Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 41, 2915-2923.
2. Taddei S., Robbi C., Cesena C., Rossi I., Schiano E., Arrigoni N., Vicenzoni G., Cavarani S. (2004): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. J. Vet. Diagn. Invest. 16:503-508.
3. Thrusfield M.(1995). Veterinary Epidemiology. 2nd Edition. Blackwell Science Ltd, pp.215-217.
4. Whitlock R.H., Wells S. J., Sweeney R.W., Van Tiem J. (2000). Elisa and fecal culture for paratuberculosis (John's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol. 77:387-398.