

*Anno 2013*

## **XIII Circuito interlaboratorio di sierotipizzazione Salmonella spp.**

## **1. Introduzione**

Il presente report descrive i risultati relativi all'identificazione di *Salmonella* spp. organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS).

L'obiettivo principale del presente circuito interlaboratorio è quello di valutare la capacità di identificazione del sierotipo in isolati di *Salmonella* spp indipendentemente dalla loro fonte di origine.

## **2. Partecipanti**

Nel mese di dicembre 2013 il Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS) ha organizzato il tredicesimo ring trial di sierotipizzazione di *Salmonella* spp. a cui hanno preso parte 2 laboratori privati e 10 laboratori afferenti ad Istituti Zooprofilattici, di seguito elencati:

- Laboratorio privato GESCO
- Laboratorio privato TRE VALLI
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (Roma)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici-Napoli)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (Torino)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (Perugia)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (sezione di Macerata)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna (Brescia)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (Foggia)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (Sassari)

## **2. Ceppi di *Salmonella* spp. utilizzati**

Ai singoli partecipanti sono stati inviati 20 ceppi di *Salmonella* spp. da sottoporre a sierotipizzazione. I ceppi utilizzati per il ring trial provengono dalla collezione di ceppi che il Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS) riceve annualmente dal Laboratorio Comunitario di Riferimento di Bilthoven (NL) in occasione di ring-trial interlaboratorio.

La selezione dei ceppi da includere nel circuito è stata condotta considerando prevalentemente i sierotipi d'interesse epidemiologico, per i quali si è registrato un incremento nelle prevalenze ed i sierotipi risultati particolarmente problematici alla sierotipizzazione nel corso delle precedenti edizioni del circuito.

In Tabella 1 sono riportate le formule antigeniche dei ceppi testati.

**Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi**

A ciascun laboratorio partecipante è stato assegnato un codice a garanzia dell'anonimato.

Inoltre, due settimane prima dell'inizio della prova, il protocollo e il test report sono stati inviati tramite e-mail a ciascun laboratorio.

Ceppo N.	Sierotipo	Antigene O	Antigene H
1	Variante Monofasica di <i>S. Typhimurium</i>	1,4[5],12	i:-
2	<i>S. Orion</i>	3,{10}{15}{15,34}	y:1,5
3	<i>S. Virchow</i>	6,7, <u>14</u>	r:1,2
4	<i>S. Saintpaul</i>	<u>1</u> ,4[5],12	e,h:1,2
5	<i>S. Stourbridge</i>	6,8	b:1,6
6	<i>S. Baildon</i>	9,46	a:e,n,x
7	<i>S. Thompson</i>	6,7, <u>14</u>	k:1,5
8	<i>S. Hadar</i> / <i>S. Istanbul</i> *	6,8 / 8	z <sub>10</sub> :enx
9	<i>S. Mbandaka</i>	6,7, <u>14</u>	z <sub>10</sub> :e,n,z <sub>15</sub>
10	<i>S. Infantis</i>	6,7, <u>14</u>	r:1,5
11	<i>S. Poona</i>	<u>1</u> ,13,22	z:1,6
12	<i>S. Abaetetuba</i>	11	k:1,5
13	<i>S. Kottbus</i> / <i>S. Ferruch</i> *	6,8 / 8	e,h:1,5
14	<i>S. Enteritidis</i>	1,9,12	g,m:-
15	<i>S. Stanley</i>	<u>1</u> ,4,[5],12, <u>27</u>	d:1,2
16	<i>S. Amsterdam</i>	3,{10}{15}{15,34}	g,m,s:-
17	<i>S. Saarbruecken</i>	<u>1</u> ,9,12	a:1,7
18	<i>S. Carno</i>	1,3,19	z:l,w
19	<i>S. Typhimurium</i>	1,4, [5],12	i:1,2
20	<i>S. Llandoff</i>	1,3,19	z <sub>29</sub> : [z <sub>6</sub> ]

**Tabella 1: Formule antigeniche dei ceppi di *Salmonella spp.* utilizzati (schema di Kauffmann-White 2007)**

\*Entrambi risultati possono essere considerati corretti in quanto è stato dimostrato che colonie prelevate dalla stessa coltura batterica possono manifestare una variabilità nell'espressione degli antigeni minori.

Tale fenomeno è stato verificato per l'antigene O : 6 e per alcuni sierotipi del gruppo C2 (Hendriksen *et al.*, 2009).

### 3. Risultati

La presente sezione del report si articola nelle seguenti parti:

- risultati ottenuti dai singoli Istituti partecipanti;
- risultati ottenuti per ciascun ceppo;

**Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi**

- confronto tra i risultati ottenuti dai partecipanti nei ring trial organizzati dal 2009 al 2013;
- valutazione statistica delle “performance” dei singoli laboratori partecipanti.

### 3.1 Risultati ottenuti dai singoli istituti partecipanti

In tabella 2 sono riportati i risultati della sierotipizzazione ripartiti per laboratorio partecipante.

Tre laboratori (codici 4, 5, 7) hanno tipizzato correttamente 19 ceppi su 20, un laboratorio (codice 9) 18 su 20, due laboratori (codice 8, 11) 17 ceppi su 20, un laboratorio (codice 1) 16 ceppi su 20, due laboratori (codice 2, 6) 15 su 20 ceppi, mentre i rimanenti tre (codice 3, 10, 12) hanno tipizzato correttamente tutti i ceppi.

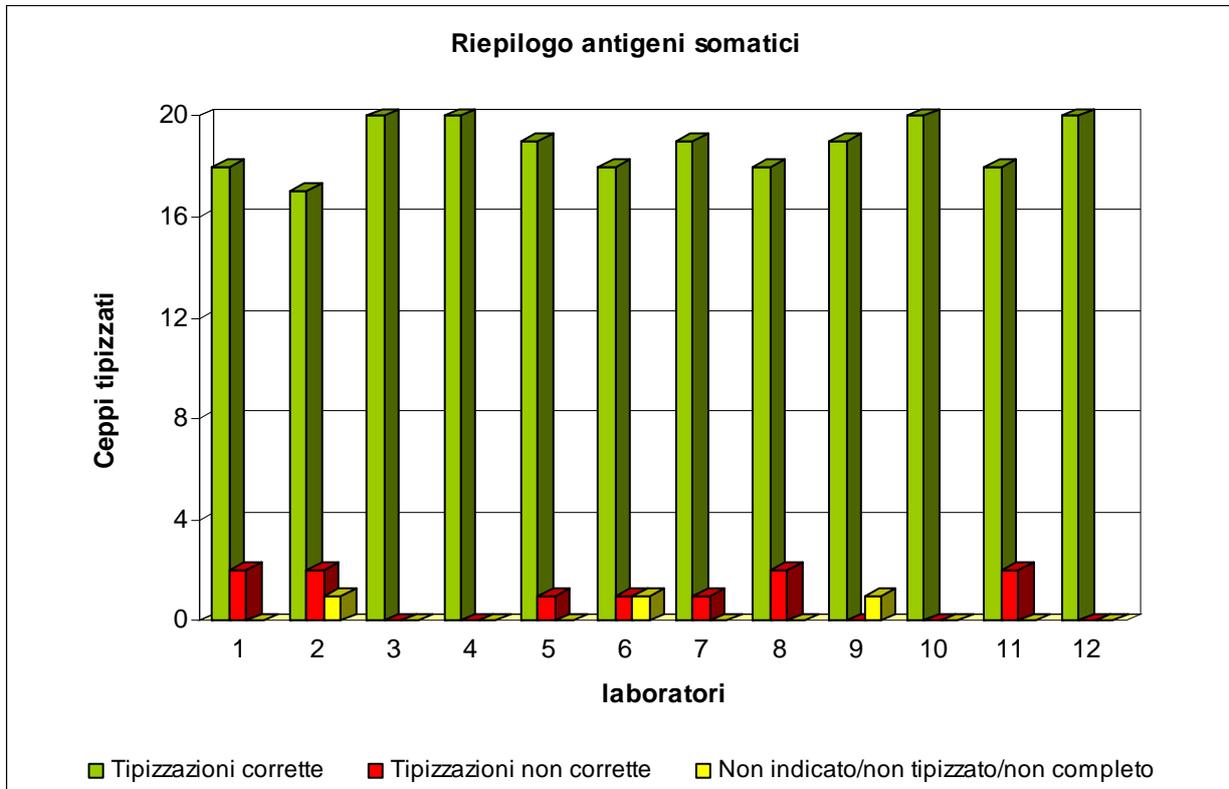
Nel complesso, per quanto riguarda gli antigeni somatici i laboratori partecipanti hanno commesso 14 errori (11 identificazioni non corrette e 3 tipizzazioni incomplete), mentre nella tipizzazione degli antigeni ciliari sono stati commessi 17 errori (12 identificazioni non corrette e 5 tipizzazioni incomplete). Il 94.17% degli antigeni somatici, il 92.92% degli antigeni ciliari e il 89.58% dei sierotipi sono stati tipizzati correttamente.

I grafici 1, 2 e 3 riassumono i risultati ottenuti dai singoli laboratori per quanto riguarda rispettivamente la tipizzazione degli antigeni somatici, ciliari e l'identificazione dei sierotipi.

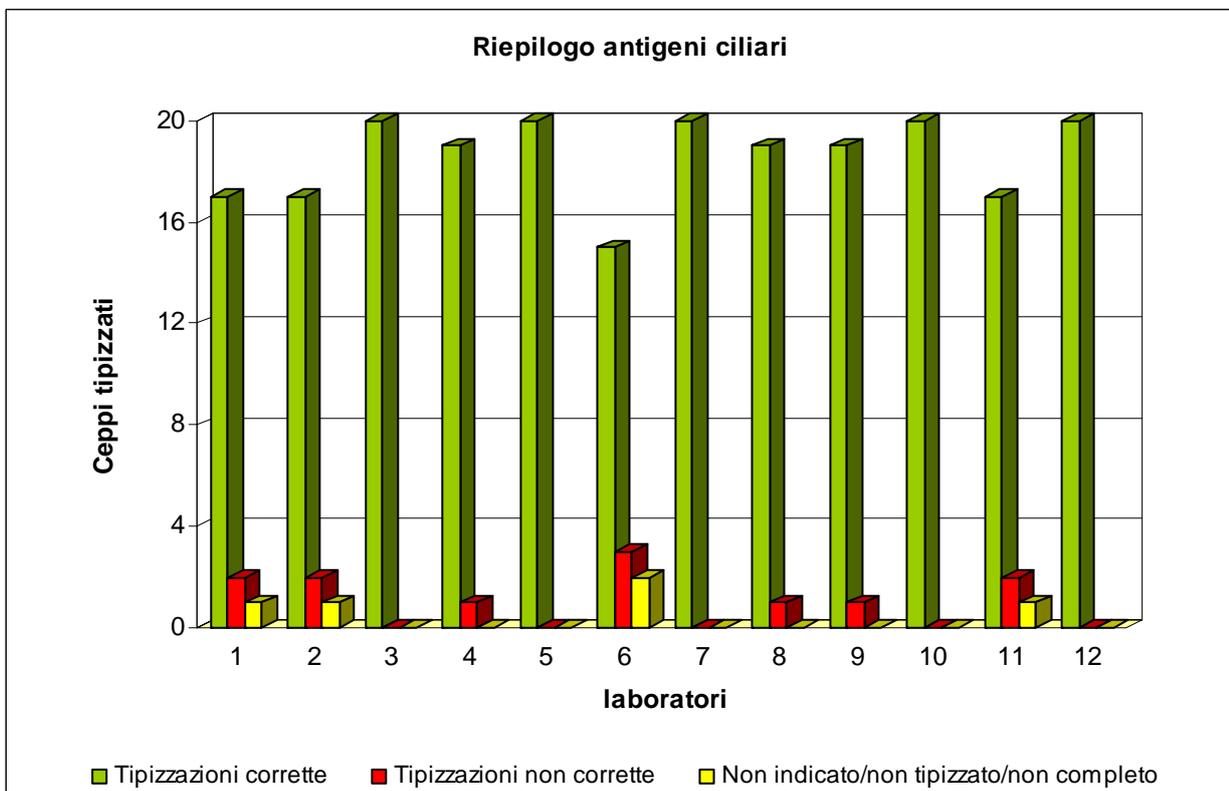
Codice del laboratorio	Antigeni O			Antigeni H			Sierotipo		
	+	-	n.i./t.	+	-	n.i./t.	+	-	n.i./t.
1	18	2	0	17	2	1	16	3	1
2	17	2	1	17	2	1	15	3	2
3	20	0	0	20	0	0	20	0	0
4	20	0	0	19	1	0	19	1	0
5	19	1	0	20	0	0	19	1	0
6	18	1	1	15	3	2	15	3	2
7	19	1	0	20	0	0	19	1	0
8	18	2	0	19	1	0	17	3	0
9	19	0	1	19	1	0	18	1	1
10	20	0	0	20	0	0	20	0	0
11	18	2	0	17	2	1	17	2	1
12	20	0	0	20	0	0	20	0	0

**Tabella 2: Risultati della sierotipizzazione per laboratorio**

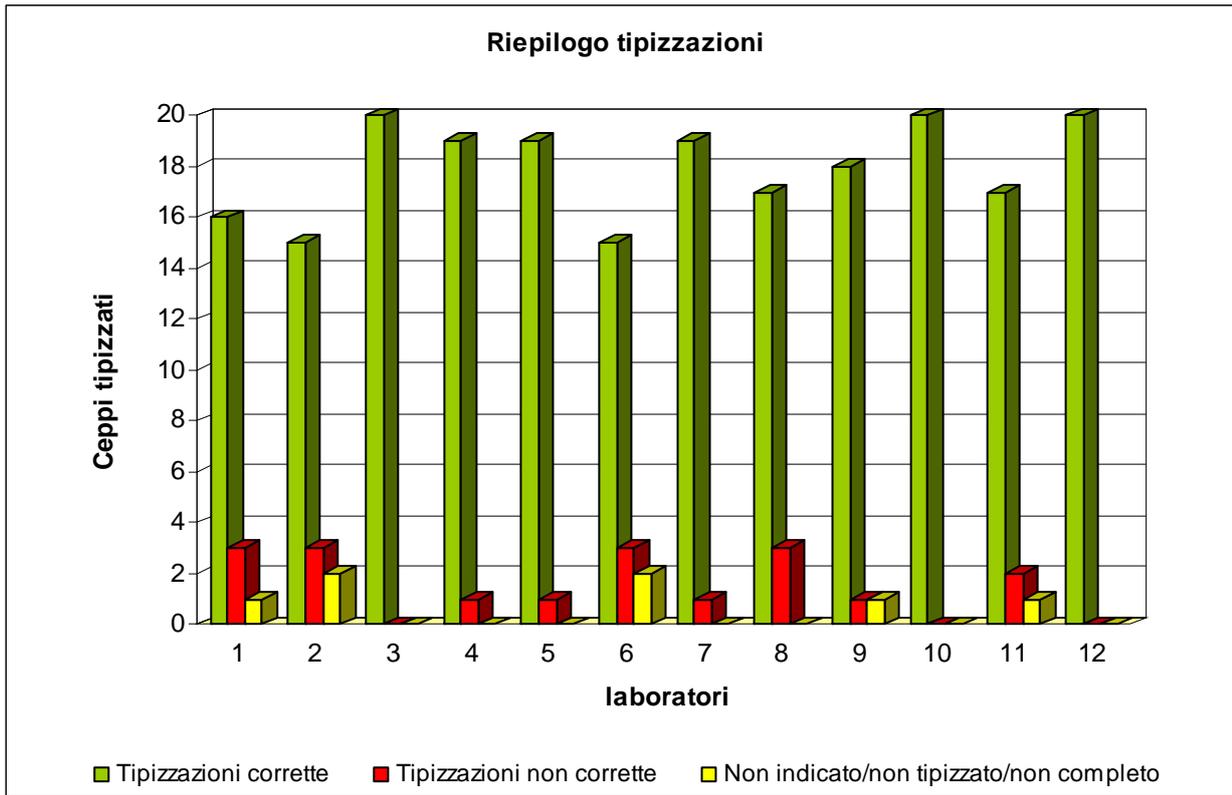
+ = tipizzazione corretta; - = tipizzazione errata; n.i./t. = risultato non indicato, tipizzazione non effettuata, tipizzazione generica, non completa; esito dubbio



**Grafico I: Risultati della tipizzazione degli antigeni somatici**



**Grafico 2: Risultati della tipizzazione degli antigeni ciliari**



**Grafico 3: Risultati identificazione dei sierotipi**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
Viale dell'Università, 10 35020 Legnaro (PD)  
**Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi**

### 3.2 Risultati per ceppo

I risultati della sierotipizzazione espressi per ceppo sono riportati in Tabella 3.

Undici dei venti ceppi testati sono stati tipizzati in modo corretto da tutti i dodici laboratori partecipanti.

N ceppo	Sierotipo	Antigene O		Antigene H		Sierotipo	
		+	-	+	-	+	-
1	Variante Monofasica di <i>S. Typhimurium</i>	12	0	12	0	12	0
2	<i>S. Orion</i>	12	0	12	0	12	0
3	<i>S. Virchow</i>	10	2	8	4	8	4
4	<i>S. Saintpaul</i>	12	0	12	0	12	0
5	<i>S. Stourbridge</i>	12	0	12	0	12	0
6	<i>S. Baildon</i>	11	1	12	0	11	1
7	<i>S. Thompson</i>	12	0	10	2	10	2
8	<i>S. Hadar/ S. Istanbul*</i>	12	0	12	0	12	0
9	<i>S. MBandaka</i>	12	0	12	0	12	0
10	<i>S. Infantis</i>	12	0	12	0	12	0
11	<i>S. Poona</i>	12	0	11	1	11	1
12	<i>S. Abaetetuba</i>	12	0	11	1	11	1
13	<i>S. Kottbus/ S. Ferruch*</i>	12	0	12	0	12	0
14	<i>S. Enteritidis</i>	12	0	12	0	12	0
15	<i>S. Stanley</i>	7	5	9	3	7	5
16	<i>S. Amsterdam</i>	12	0	12	0	12	0
17	<i>S. Saarbruecken</i>	12	0	11	1	11	1
18	<i>S. Carno</i>	6	6	11	1	6	6
19	<i>S. Typhimurium</i>	12	0	12	0	12	0
20	<i>S. Llandoff</i>	12	0	8	4	8	4

**Tabella 3: Risultati della sierotipizzazione per ceppo**

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie**  
**Viale dell'Università, 10 35020 Legnaro (PD)**  
**Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi**

I sierotipi per i quali sono emersi problemi d'identificazione sono stati: *S. Virchow* (ceppo n. 3), *S. Baidon* (ceppo n. 6), *S. Thompson* (ceppo n. 7), *S. Poona* (ceppo n. 11), *S. Abaetetuba* (ceppo n. 12), *S. Stanley* (ceppo n. 15), *S. Saarbruecken* (ceppo n.17), *S. Carno* (ceppo 18) e *S. Llandoff* (ceppo n.20),

Nella tabella 4 vengono riportati gli errori associati ai sierotipi per i quali si sono verificati problemi d'identificazione.

N. ceppo	Sierotipo	Antigeni O	Antigeni H	Codice laboratorio
<b>3</b>	<i>S. Virchow</i>	6,7, <u>14</u>	r :1,2	CRNS
	<i>S. Othmarschen</i>	6,7	g,m:-	1
	<i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Thompson</i>	?	?	2
	<i>S. Thompson</i>	6,7	k:1,5	6
	<i>S. Anatum</i>	3,10	e,h:1,2	11
<b>6</b>	<i>S. Baidon</i>	9,46	a: e,n,x	CRNS
	<i>S. Lomalinda</i>	1,9,12	a: e,n,x	8
<b>7</b>	<i>S. Thompson</i>	6,7, <u>14</u>	k:1,5	CRNS
	<i>S. Lomita</i>	6,7	e,h:1,5	4
	<i>S. Alamo</i>	6,7	g:z51:1,5	6
<b>11</b>	<i>S. Poona</i>	1,13,22	z:1,6	CRNS
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	13,22	z:-	9
<b>12</b>	<i>S. Abaetetuba</i>	11	k: 1,5	CRNS
	<i>S. Pretoria</i>	11	k: 1,2	8
<b>15</b>	<i>S. Stanley</i>	1,4,[5],12, <u>27</u>	d :1,2	CRNS
	<i>III</i> subspecie <i>diarizonae</i>	61	c:1,5	1
	<i>S. Stormont</i>	3,15,34	d:1,2	2
	-----	61	-	6
	-----	OGM	d:1,2	9
<b>17</b>	<i>S. Saarbruecken</i>	1,9,12	a:1,7	CRNS
	<i>S. Jamaica</i>	9,12	r:1,5	2
<b>18</b>	<i>S. Carno</i>	1,3,19	z:l,w	CRNS
	<i>S. Clerkenwell</i>	3,10	z:l,w	1
	<i>S. Clerkenwell</i>	3,10	z:l,w	2
	<i>S. Clerkenwell</i>	3,10	z:l,w	5
	<i>Ceppo autoagglutinante</i>	-----	-----	6
	<i>S. Clerkenwell</i>	3,10	z:l,w	7
	<i>S. Clerkenwell</i>	3,10	z:l,w	8
<b>20</b>	<i>S. Llandoff</i>	1,3,19	z29:[z6]	CRNS
	-----	1,3,19	HME + (flg. Mono. non disponibile)	1
	<i>S. enterica</i> sub. <i>enterica</i>	1,3,19	r:1,5	2
	<i>S. Cannastat</i>	1,3,19	m,t	6
	-----	1,3,19	Non eseguita	11

**Tabella 4: Ceppi che hanno presentato problemi di sierotipizzazione**

Il ceppo n.3, sierotipo *S. Virchow* ha dato diversi problemi di identificazione degli antigeni somatici e degli antigeni ciliari.

Per il sierotipo *Baildon* non è stata identificata in modo corretto la componente somatica da parte di un laboratorio.

Per il sierotipo *S. Thompson* due laboratori non hanno eseguito correttamente la tipizzazione: gli antigeni somatici sono stati identificati correttamente, mentre relativamente alla componente ciliare un antigene non è stato identificato correttamente.

Per i ceppi *S. Poona* e *S. Abaetetuba* un laboratorio ha avuto problemi nell'identificazione di un antigene ciliare.

Diversi problemi si sono verificati con il sierotipo *S. Stanley*, lo stesso Laboratorio Comunitario di Riferimento di Bilthoven (NL) ha considerato il ceppo in esame problematico attribuendo le criticità riscontrate a reazioni non specifiche dei sieri utilizzati.

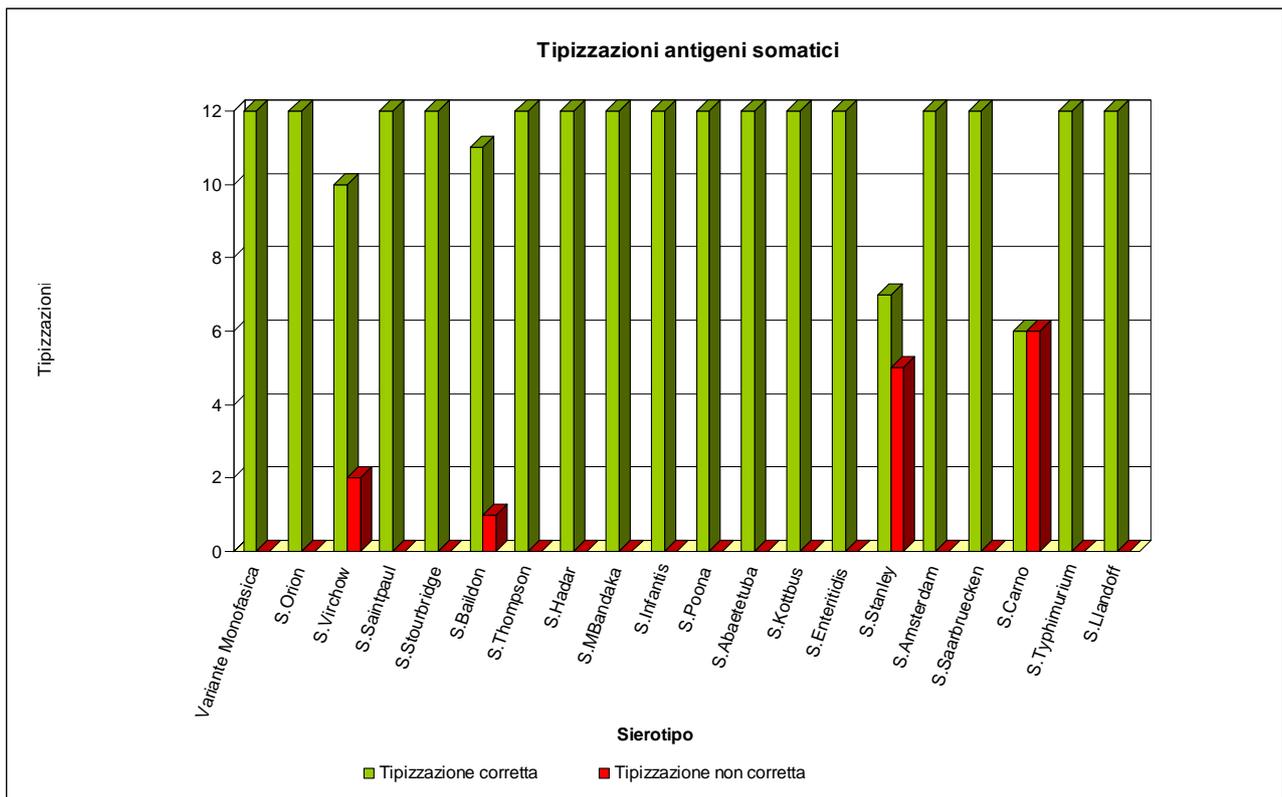
Per il ceppo *S. Saarbruecken* non sono stati identificati correttamente gli antigeni ciliari da parte di un laboratorio.

Anche per il sierotipo *S. Carno*, si sono avuti diversi problemi, 6 laboratori infatti non hanno eseguito la tipizzazione correttamente identificando erroneamente la componente somatica.

Per il sierotipo *S. Llandoff* non è stata eseguita correttamente l'identificazione degli antigeni ciliari da parte di 4 laboratori partecipanti.

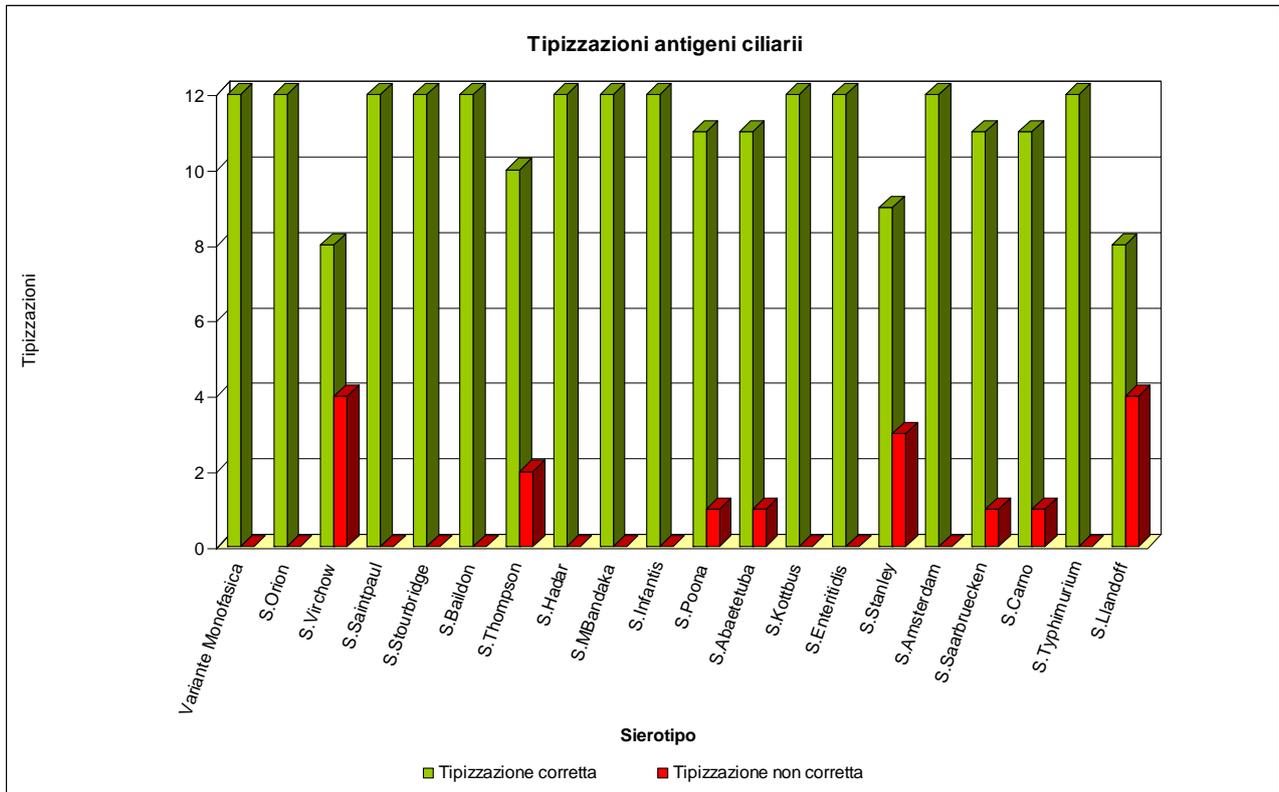
Non si sono invece evidenziati problemi di tipizzazione per gli altri sierotipi considerati "rilevanti" *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Hadar* nell'ambito del piano nazionale di controllo di *Salmonella* nella popolazione avicola di riproduttori *Gallus gallus*.

I grafici IV, V e VI riassumono i risultati della tipizzazione degli antigeni somatici, ciliari e l'identificazione dei sierotipi dei singoli ceppi.

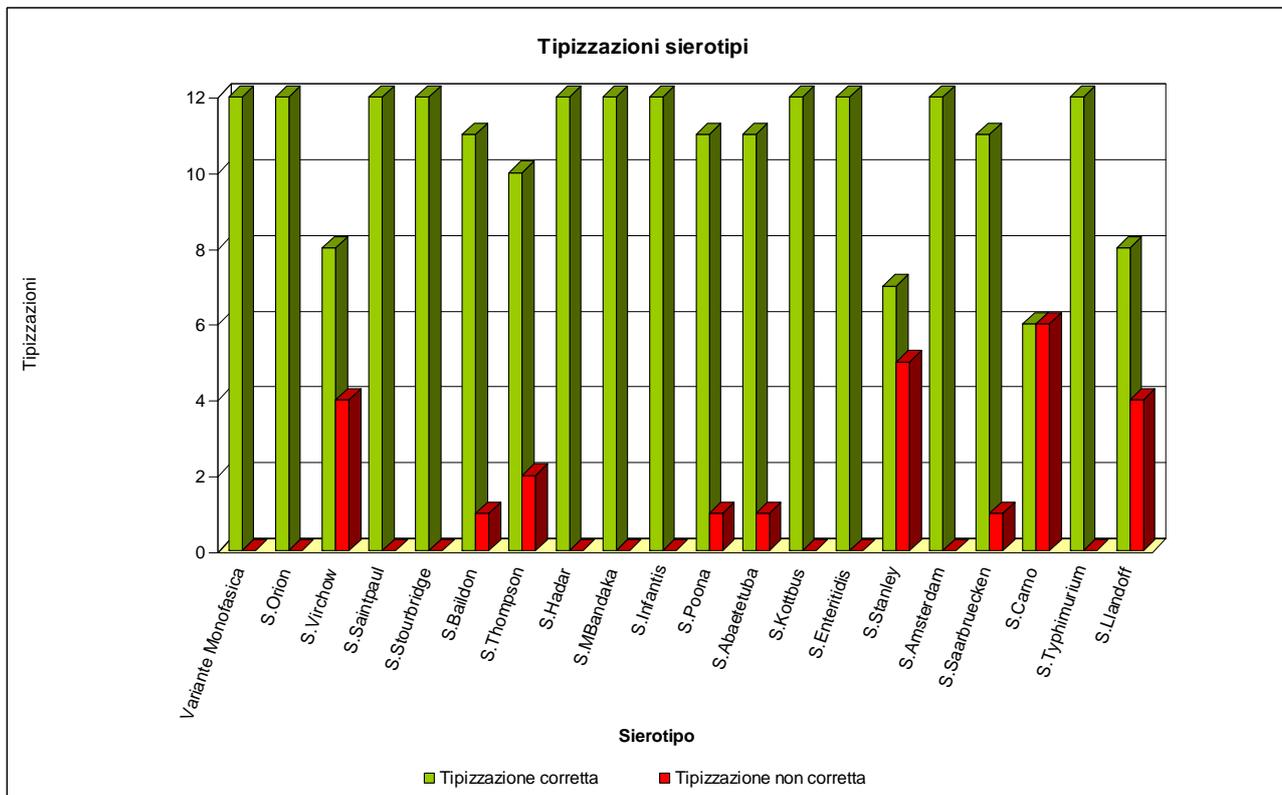


**Grafico IV: Risultati della tipizzazione degli antigeni somatici**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
 Viale dell'Università, 10 35020 Legnaro (PD)  
**Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi**



**Grafico V: Risultati della tipizzazione degli antigeni ciliari**



**Grafico VI: Risultati identificazione dei sierotipi**

#### 4. Analisi dei risultati dei Ring Trial effettuati dal 2010 al 2013

Al fine di osservare come si è evoluta nel tempo la capacità dei singoli laboratori partecipanti di sierotipizzare i ceppi di *Salmonella* spp., si sono confrontati i risultati ottenuti nell'ambito dei ring trial di sierotipizzazione effettuati nell'ultimo triennio dal 2011 fino al 2013 ( XI RT 2011; XII 2012; XIII 2013).

I dati si riferiscono ai laboratori afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

I grafici 7, 8 e 9 mostrano i risultati suddivisi rispettivamente per sierotipizzazioni complete corrette, sierotipizzazioni antigeni O e sierotipizzazione antigeni H.

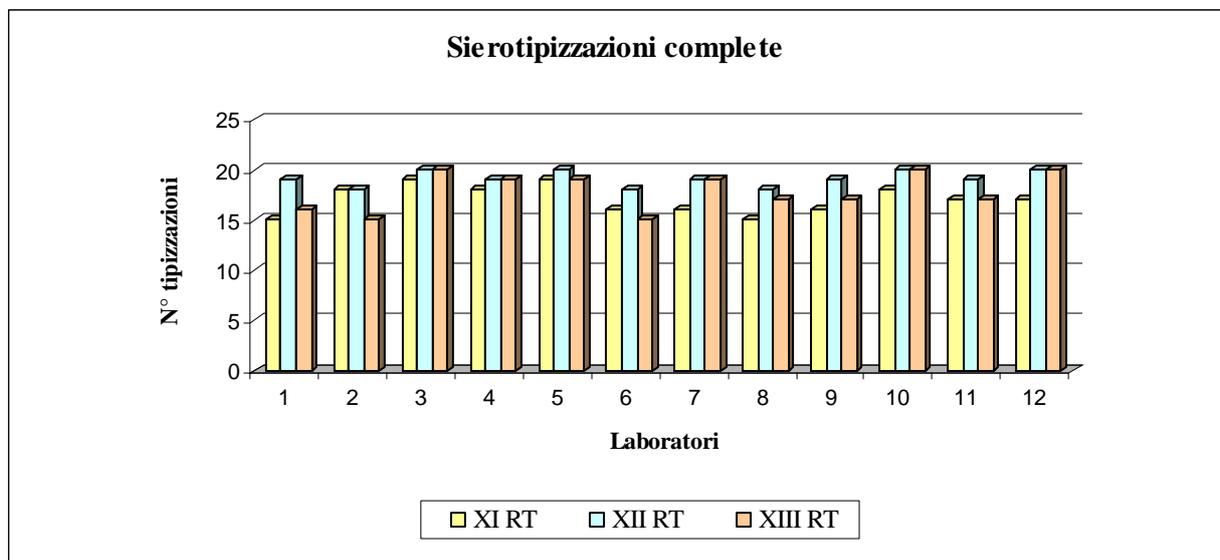


Grafico VII: Identificazione corretta dei sierotipi per laboratorio e per ring trial

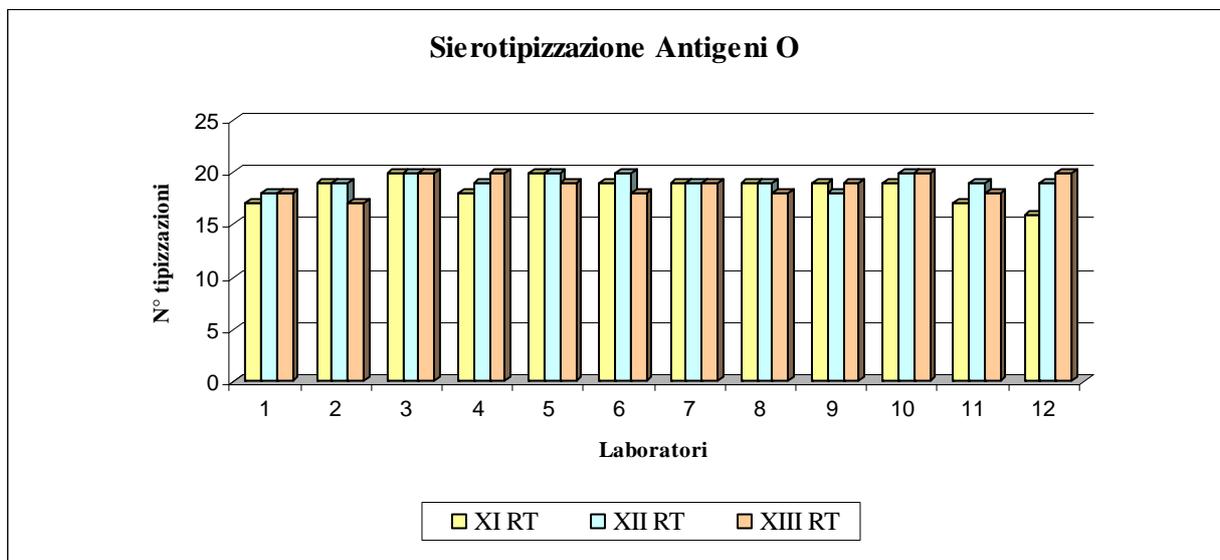
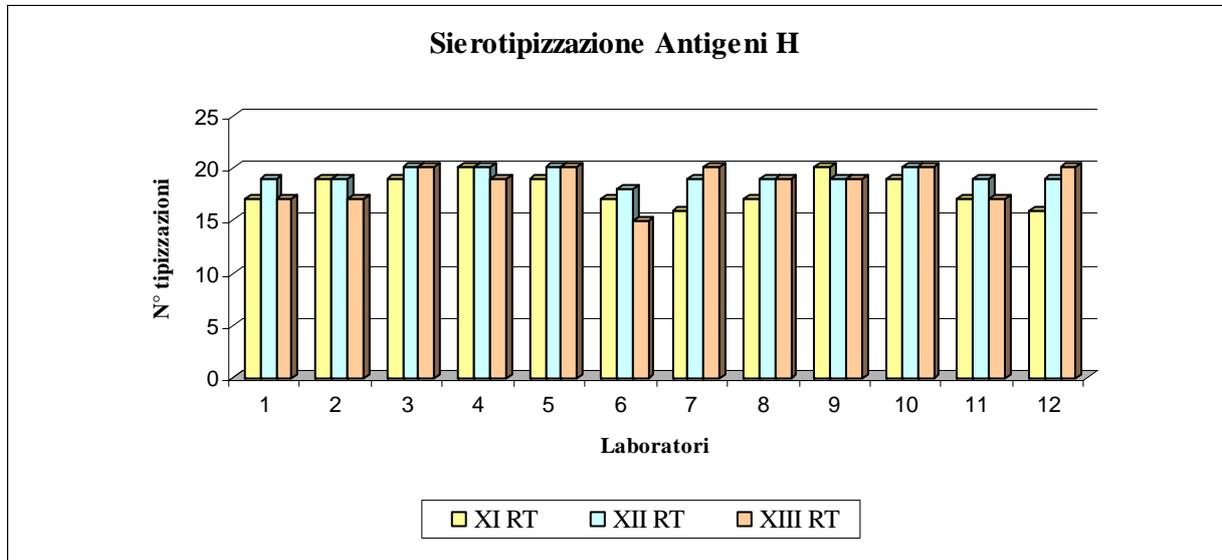


Grafico VIII: Identificazione corretta degli antigeni O per laboratorio e per ring trial



**Grafico IX: Identificazione corretta degli antigeni H per laboratorio e per ring trial**

Sulla base dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti la maggior parte degli errori sono dovuti ad una non corretta identificazione degli antigeni ciliari, tuttavia si evidenziano criticità che possono essere attribuite sia a caratteristiche intrinseche del ceppo e sia a reazioni non specifiche dei sieri presenti in commercio.

A fronte di tali considerazioni, nell'elaborazione statistica, si è considerata comunque corretta la risposta al ceppo 18 per i laboratori che hanno identificato il sierotipo *S. Clerkenwell* invece di *S. Carno* in quanto l'errore può essere attribuibile a reazioni aspecifiche dei sieri impiegati nell'identificazione.

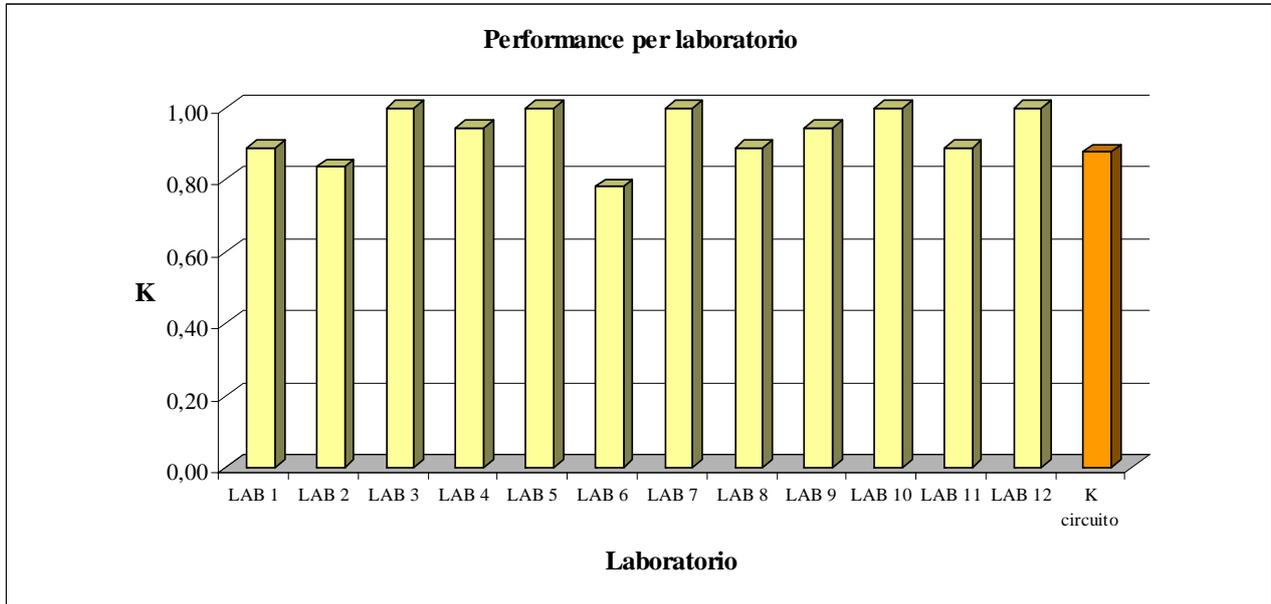
Inoltre non è stato incluso, nella valutazione finale delle performance dei laboratori, il ceppo 15, sierotipo *S. Stanley* poiché ritenuto un ceppo problematico di difficile identificazione sierologica a causa di agglutinazione aspecifiche.

**Analisi della concordanza**

Per ogni laboratorio partecipante si è calcolata la statistica K di Cohen che indica il grado di accordo tra i risultati forniti dal laboratorio in esame e gli esiti corretti del laboratorio Gold Standard, rappresentato dall'ente organizzatore del circuito. Il valore di K ottenuto per ciascun laboratorio e l'interpretazione della statistica con il relativo livello di significatività p-value è riportato in tabella 5.

	<b>LAB 1</b>	<b>LAB 2</b>	<b>LAB 3</b>	<b>LAB 4</b>	<b>LAB 5</b>	<b>LAB 6</b>
K	0,8895	0,8348	1	0,9446	1	0,7797
p-value	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	<b>LAB 7</b>	<b>LAB 8</b>	<b>LAB 9</b>	<b>LAB 10</b>	<b>LAB 11</b>	<b>LAB 12</b>
K	1	0,8895	0,9446	1	0,8895	1
p-value	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

**Tabella 5: valore di concordanza k e significatività (p-value) di ciascun laboratorio partecipante**



**Grafico X: Performance di ciascun laboratorio partecipante**

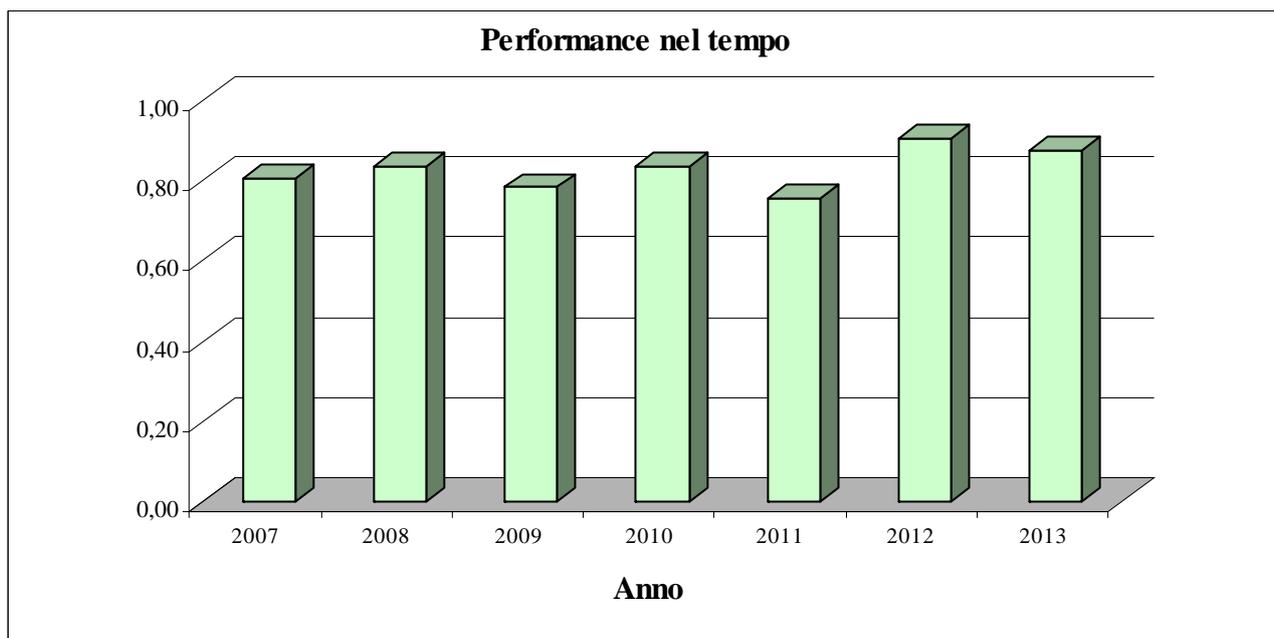
**Tabella 6** Scala di *Landis & Koch*

K	Livello di concordanza
$\leq 0$	Scarsissima
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Discreta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Buona
0.81-1.00	Ottima

Confrontando i risultati ottenuti dai singoli laboratori con scala di Landis & Koch (tabella 6) che fornisce un'indicazione per interpretare le performance di un laboratorio sulla base del valore K ottenuto, si può concludere che tutti i laboratori partecipanti hanno ottenuto un'"ottima" performance" ad eccezione dei laboratorio 6 che presenta una" buona" performance.

Valutando i dati complessivi la concordanza dell'intero circuito è risultata pari a 0.8767 (IC[0.767-0.95]; p=0.000) e quindi è stata giudicata come "ottima".

Analizzando i dati complessivi della concordanza (K) del Circuito dal 2007 al 2013, si può notare che il livello di performance si è sempre mantenuto buono.



**Grafico XI: Performance del circuito di sierotipizzazione nel tempo**