

Anno 2010

X Circuito interlaboratorio di sierotipizzazione Salmonella spp.

1. Partecipanti

Nel mese di dicembre 2010 il Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi ha organizzato il decimo ring trial di sierotipizzazione di *Salmonella* spp. a cui hanno partecipato i seguenti istituti:

- 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 campioni di *Salmonella* spp. da sottoporre a sierotipizzazione.

I ceppi utilizzati per il ring trial derivano dalla ceppoteca del Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi e in parte provengono dal Laboratorio Comunitario di Riferimento di Bilthoven (NL) in occasione di ring-trial a cui ha partecipato precedentemente il Centro di Referenza Nazionale. La selezione è stata condotta considerando prevalentemente i sierotipi che rivestono un particolare interesse epidemiologico, i ceppi per cui si è registrato un incremento nelle prevalenze e gli isolati per cui sono state riscontrate particolari problematiche nella sierotipizzazione nel corso delle precedenti edizioni del circuito.

In Tabella 1 sono riportate le formule antigeniche dei ceppi inclusi nel presente circuito.

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

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

Ceppo N.	Sierotipo	Antigene O	Antigene H
1	<i>S. Llandoff</i>	1,3,19	$z_{29} : [z_6]$
2	<i>S. London</i>	3, {10}{ <u>15</u> }	1,v : 1,6
3	<i>S. Bardo</i>	8	e,h : 1,2
4	<i>S. Enteritidis</i>	<u>1</u> , 9, 12	g,m : -
5	<i>S. Derby</i>	1,4,[5],12	f,g : [1,2]
6	<i>S. Infantis</i>	6,7, <u>14</u>	r : 1,5
7	<i>S. Agona</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	f,g,s : [1,2]
8	<i>S. Typhimurium</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	i : 1,2
9	<i>S. Kapemba</i>	9,12	1,v : 1,7
10	<i>S. Missisipi</i>	<u>1</u> ,13,23	b : 1,5
11	<i>S. Ohio</i>	6,7, <u>14</u>	b : 1,w
12	<i>S. Lagos</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	i : 1,5
13	<i>S. Senftenberg</i>	1,3,19	g,[s],t : - :
14	Variante Monofasica di <i>S. Typhimurium</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	i : -
15	<i>S. Oranienburg</i>	6,7, <u>14</u>	m,t : [z ₅₇]
16	<i>S. Colindale</i>	6,7	r : 1,7
17	<i>S. Plymouth</i>	9,46	d : z ₆
18	<i>S. Agama</i>	4,12	i : 1,6
19	<i>S. Hadar</i>	6,8	$z_{10} : e,n,x$
20	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	40	$z_4,z_{23} : - :$

3. Risultati

Il presente report si articola nelle seguenti parti:

- risultati ottenuti dai singoli istituti partecipanti;
- risultati ottenuti per ciascun ceppo;
- confronto tra i risultati ottenuti dai partecipanti nei ring trial organizzati fino ad oggi;
- 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.

Due laboratori (2 e 7) hanno tipizzato correttamente sia gli antigeni somatici (O) che gli antigeni ciliari (H) dei venti ceppi inviati. Cinque laboratori (3, 4, 5, 6 e 8) hanno tipizzato correttamente 19 ceppi su 20, mentre due laboratori hanno tipizzato correttamente 18 ceppi su 20 (1 e 9). Il laboratorio 10 ha tipizzato correttamente 15 ceppi su 20.

Nel complesso, per quanto riguarda gli antigeni somatici i laboratori partecipanti hanno commesso 2 errori (in tutti i casi si trattava di identificazioni non corrette), mentre nella tipizzazione degli antigeni ciliari sono stati commessi 10 errori (5 identificazioni non corrette e 5 tipizzazioni incomplete)

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.

Tabella 2: Risultati della sierotipizzazione per laboratorio

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

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

Grafico 1: Risultati della tipizzazione degli antigeni somatici

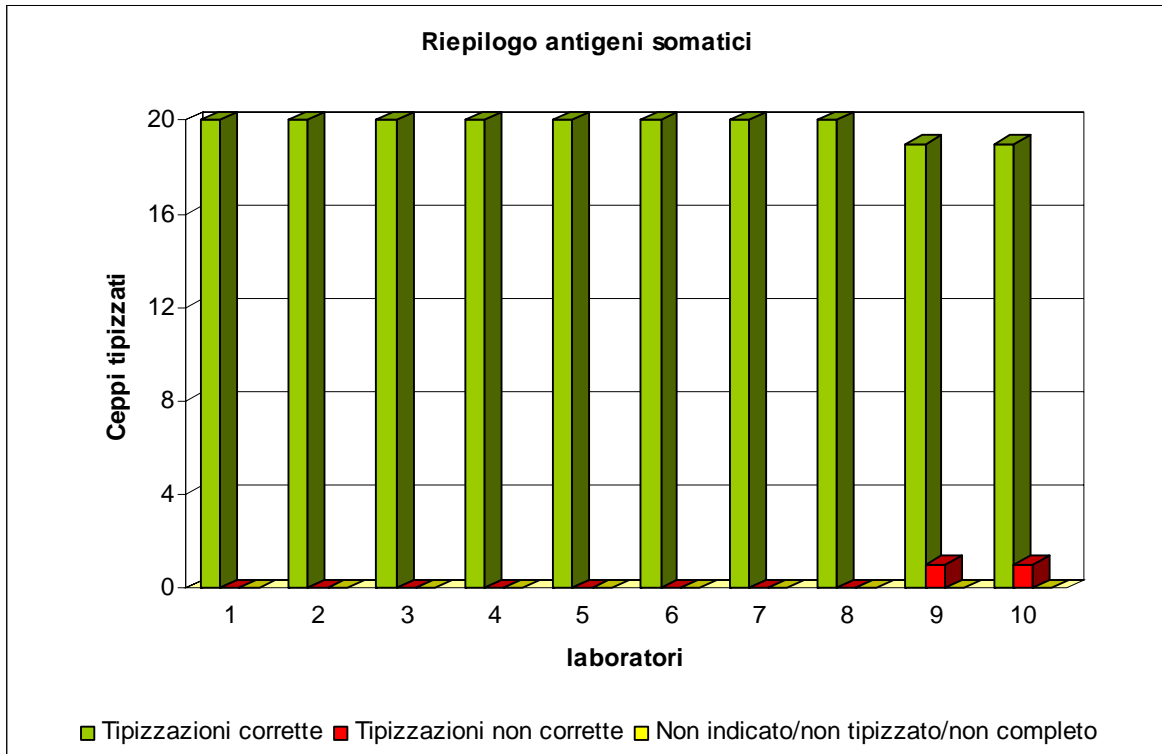


Grafico 2: Risultati della tipizzazione degli antigeni ciliari

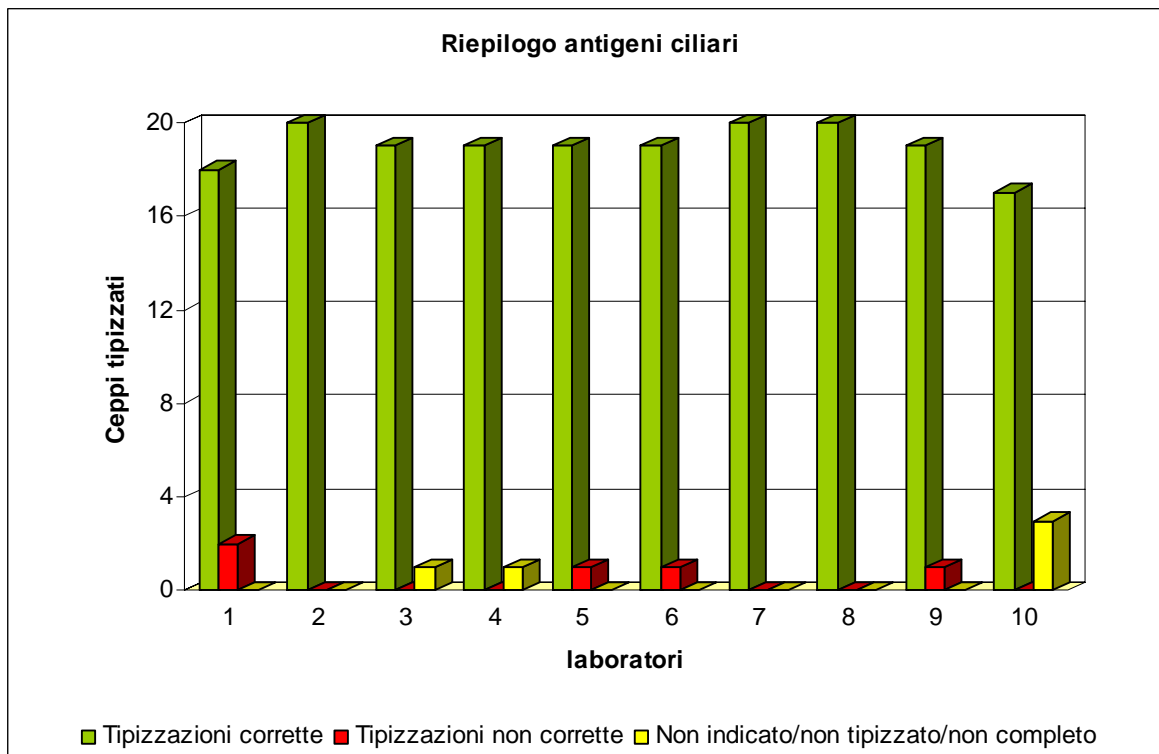
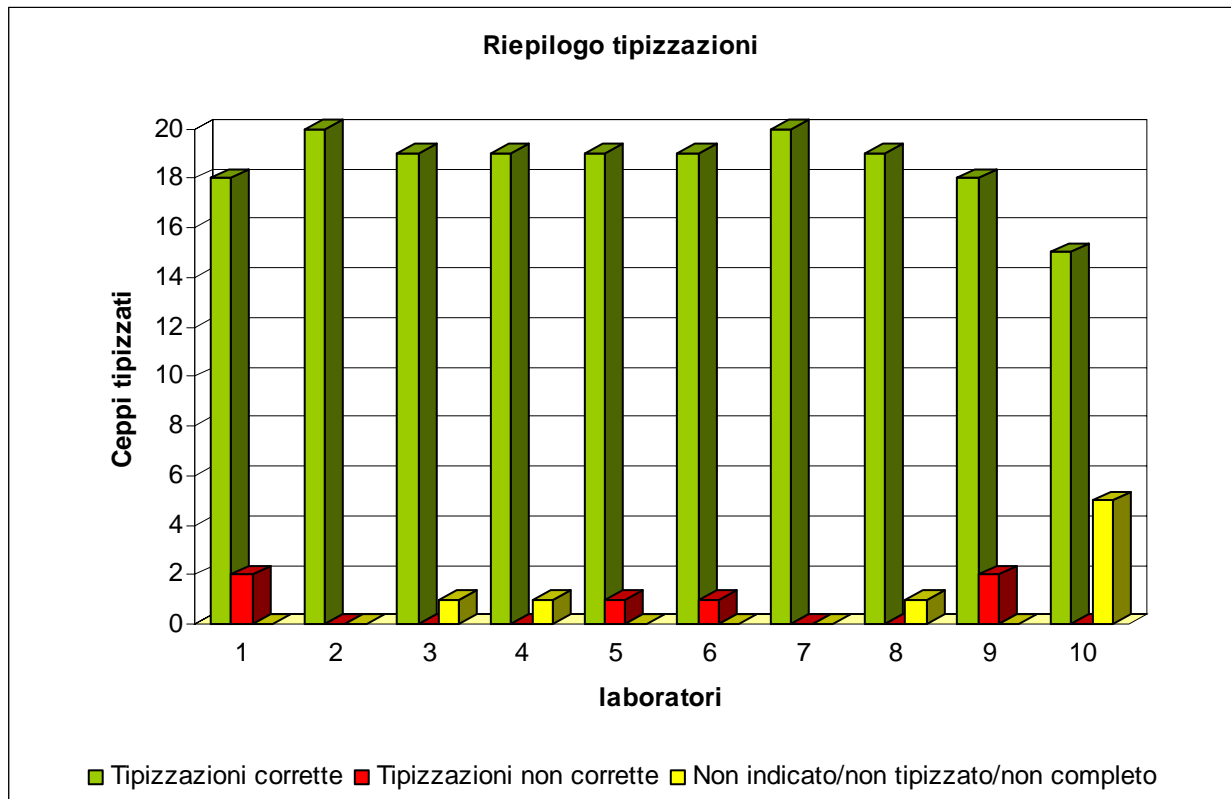


Grafico 3: Risultati identificazione dei sierotipi



3.2 Risultati per ceppo

I risultati della sierotipizzazione espressi per ceppo sono riportati in Tabella 3. 11 dei 20 ceppi inviati sono stati tipizzati in modo corretto da tutti i laboratori. I ceppi per i quali sono emersi maggiori problemi sono stati il n 1 (*S. Llandloff*), seguito dal ceppo n 15 (*S. Oranienburg*).

Per quanto riguarda *S. Llandloff*, sei laboratori hanno tipizzato correttamente sia gli antigeni somatici che i ciliari, un solo laboratorio non ha identificato correttamente gli antigeni somatici, mentre 3 laboratori non hanno identificato correttamente gli antigeni ciliari. Nel caso del sierotipo *S. Oranienburg* sette laboratori hanno individuato il sierotipo, un laboratorio non ha identificato correttamente gli antigeni ciliari, mentre due laboratori hanno identificato correttamente sia gli antigeni somatici che quelli ciliari, ma non hanno identificato il sierotipo di appartenenza. Per i rimanenti 8 ceppi, gli errori riscontrati risultano più sporadici.

Un discorso particolare deve essere fatto per i seguenti ceppi: *S. Bardo* e *S. Hadar*. Due laboratori hanno identificato tali ceppi rispettivamente come *S. Newport* e *S. Istanbul*. In prima istanza, quando ad ogni laboratorio sono stati inviati i propri risultati, tali tipizzazioni sono state considerate non corrette. Tuttavia, successivamente ci si è confrontati con il centro di Referenza comunitario di Bilthoven, che ha suggerito di considerare tali tipizzazione come corrette. E' stato infatti dimostrato che singole colonie prelevate da una stessa coltura batterica possono manifestare espressione variabile di antigeni minori. Tale fenomeno è stato verificato con l'espressione dell'antigene O:6₁ per alcuni sierotipi del sierogruppo C₂. Quindi, sebbene la versione attuale del manuale Kauffman-White consideri come separati sierotipi che presentano rispettivamente 6,8 e 8 quali antigeni somatici (ad esempio quindi *S. Newport* - 6,8,20:e,h:1,2 e *S. Bardo* - 8:e,h:1,2, come pure *S. Hadar* 6,8:z₁₀:e,n,x- e *S. Istanbul* - 8:z₁₀:e,n,x) tenendo conto di quanto sopra detto non è possibile distinguere in maniera assoluta queste coppie di sierotipi. Pertanto, nell'ambito del presente circuito si è stabilito di considerare corrette entrambe le possibilità per i due sierotipi.

Si intende adottare lo stesso approccio per i campioni di routine prelevati nell'ambito del piano nazionale di controllo di riproduttori *Gallus gallus*. Nello specifico il problema può essere rappresentato da isolati che alla sierotipizzazione risultano ascrivibili al sierotipo *S. Istanbul* e che potenzialmente potrebbero rappresentare delle varianti di *S. Hadar*, che rientra tra i sierotipi rilevanti nell'ambito del suddetto piano. Secondo quanto detto sopra, si è quindi stabilito di refertare come *S. Hadar* sia ceppi O:6+ che quelli O:6-.

A tal proposito tuttavia deve essere sottolineato che l'isolamento di ceppi di *S. Istanbul* risulta molto raro. Un'analisi dei dati Enter-vet relativi al periodo 2008-2010 ha permesso di evidenziare che in totale sono stati isolati dai laboratori afferenti alla rete 3 isolati ascrivibili a tale sierotipo (1 ceppo

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

isolato nel 2009 da un allevamento di galline ovaiole, e 2 ceppi isolati da cute di pollo prelevati al macello e un campione alimentare prelevato in un laboratorio di sezionamento nel 2009).

I grafici 4, 5 e 6 raccogliendo gli esiti di tutti i laboratori partecipanti al circuito riassumono i risultati della tipizzazione degli antigeni somatici, ciliari e l'identificazione dei sierotipi dei singoli ceppi.

Tabella 3: Risultati della sierotipizzazione per ceppo

N ceppo	Sierotipo	Antigene O		Antigene H		Sierotipo	
		+	-	+	-	+	-
1	S. Llandoff	9	1	7	3	6	4
2	S. London	10	0	10	0	10	0
3	S. Bardo	10	0	10	0	10	0
4	S. Enteritidis	10	0	10	0	10	0
5	S. Derby	10	0	9	1	9	1
6	S. Infantis	10	0	10	0	10	0
7	S. Agona	10	0	10	0	10	0
8	S. Typhimurium	10	0	10	0	10	0
9	S. Kapemba	10	0	9	1	9	1
10	S. Mississippi	10	0	10	0	9	1
11	S. Ohio	10	0	9	1	9	1
12	S. Lagos	10	0	10	0	10	0
13	S. Senftenberg	10	0	10	0	10	0
14	Variante Monofasica di S.Typhimurium	10	0	10	0	10	0
15	S. Oranienburg	10	0	9	1	7	3
16	S. Colindale	10	0	9	1	9	1
17	S. Plymouth	10	0	9	1	9	1
18	S. Agama	10	0	10	0	10	0
19	S. Hadar	10	0	10	0	10	0
20	S. enterica subspecie houtenae	9	1	9	1	9	1

Grafico 4: Risultati della tipizzazione degli antigeni somatici

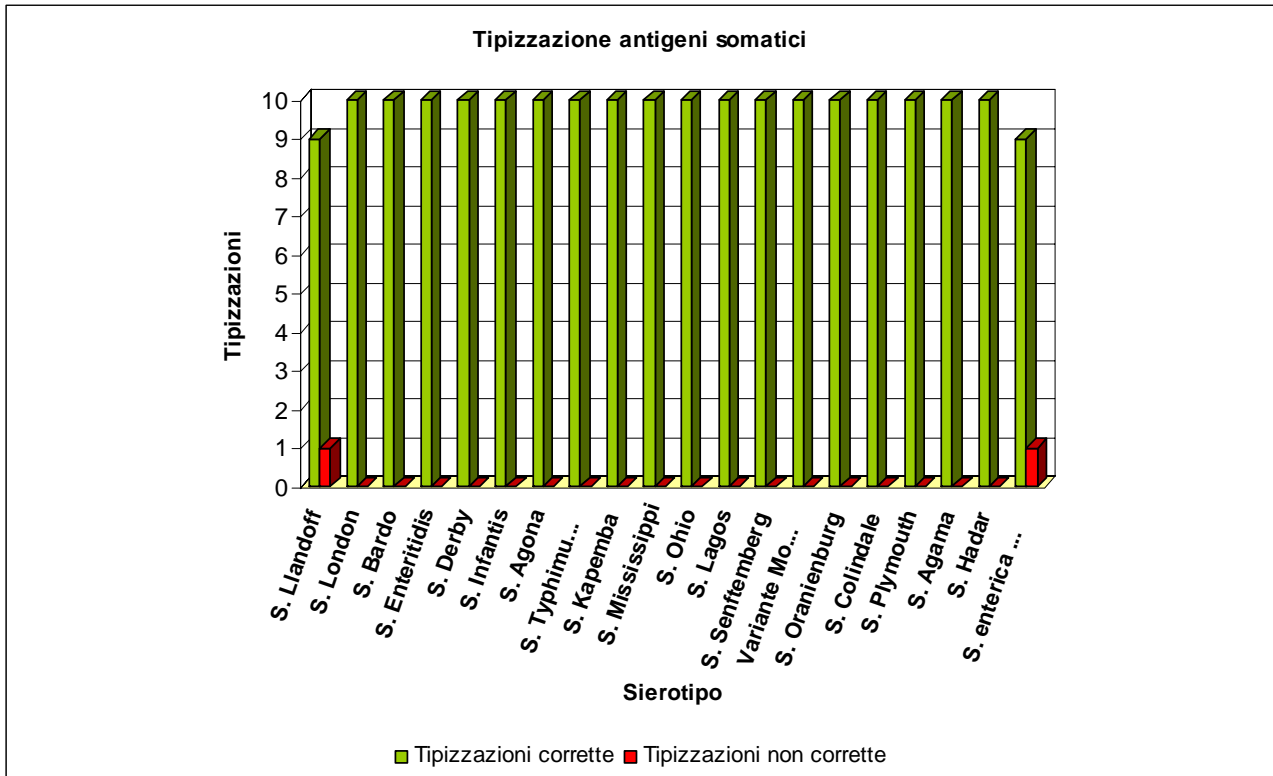


Grafico 5: Risultati della tipizzazione degli antigeni ciliari

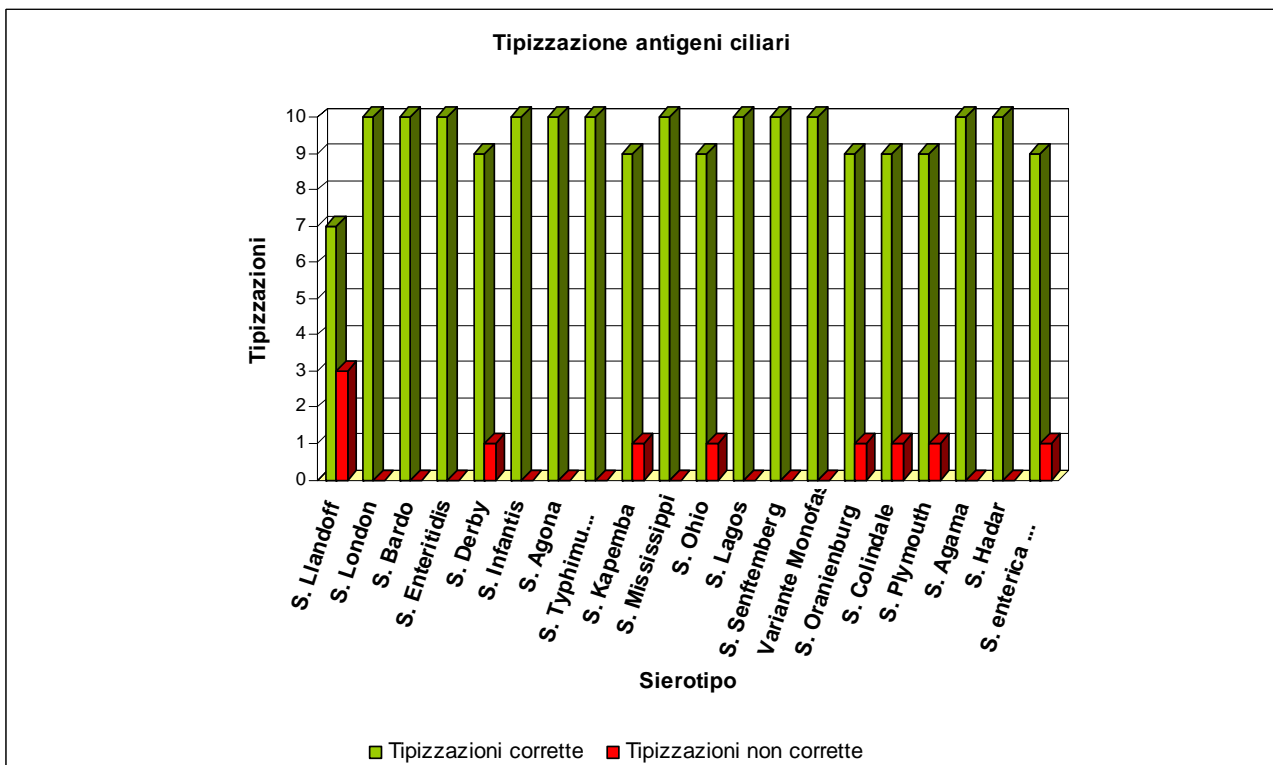
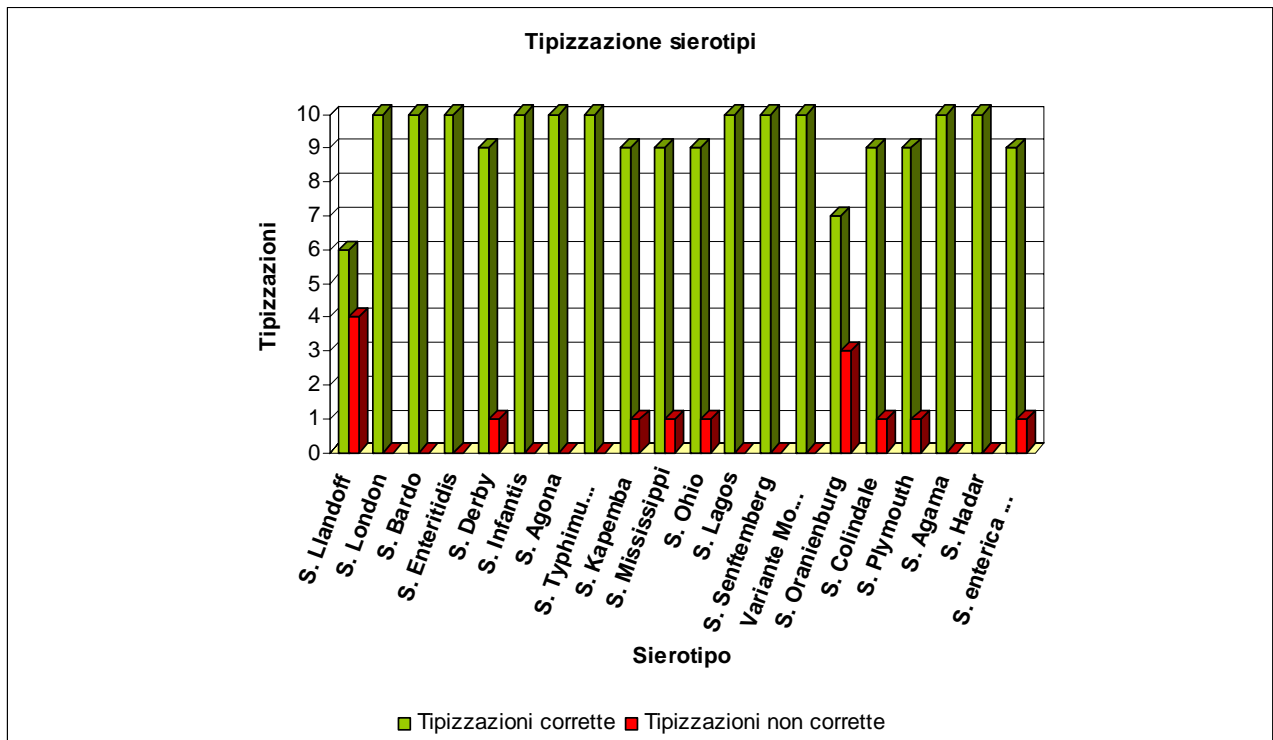


Grafico 6: Risultati identificazione dei sierotipi



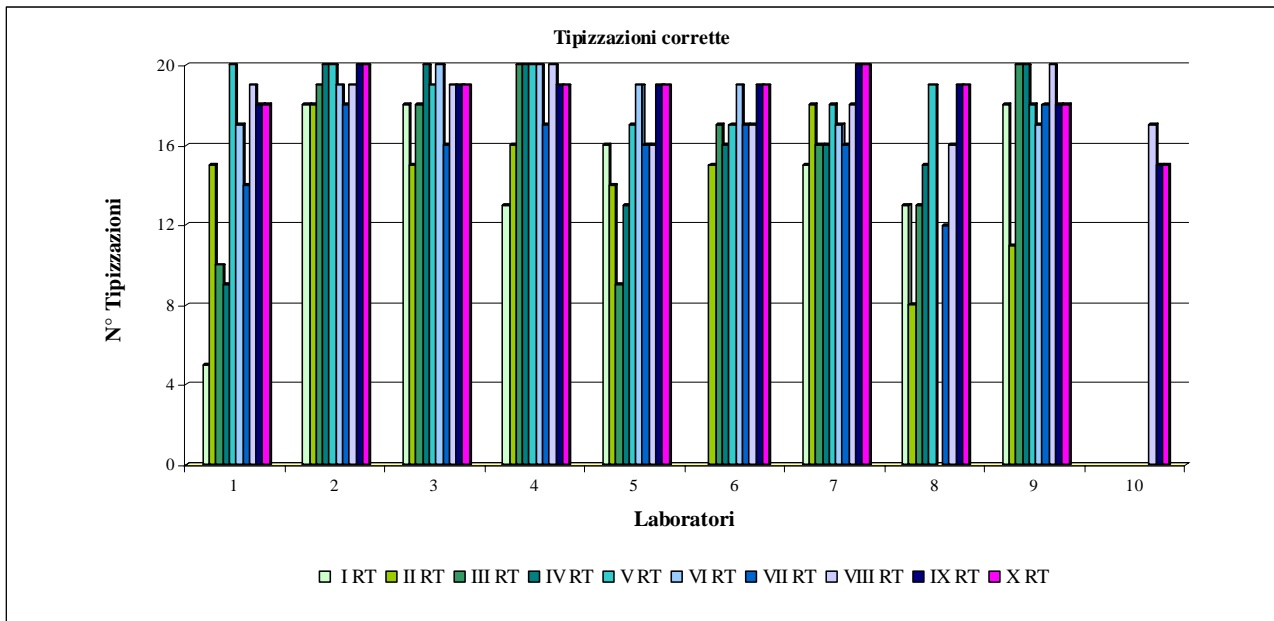
4 Analisi dei risultati dei Ring Trial effettuati ad oggi

Al fine di valutare com'è evoluta nel tempo la capacità dei singoli laboratori partecipanti di sierotipizzare i ceppi di *Salmonella* spp., sono stati confrontati i risultati ottenuti nell'ambito dei ring trial di sierotipizzazione effettuati dal 2001 al 2010.

Nel grafico 7 sono rappresentati rispettivamente i risultati corretti riportati dai singoli laboratori partecipanti nelle 10 edizioni del circuito.

I risultati ottenuti nel corso del presente circuito, se confrontati con quelli dell'anno precedente, sono risultati tendenzialmente migliori.

Grafico 7: Identificazione corretta dei sierotipi per laboratorio per ring trial



Analisi della concordanza

Per ogni laboratorio partecipante è stata 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 4.

Tabella 4 Valore di concordanza k e significatività (p-value) di ciascun laboratorio partecipante

	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
K	0.8953	1.0000	0.9475	0.9475	0.9475	0.9475	1.0000	0.9475	0.8953	0.7403
p	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Tabella 5 Scala di Landis & Koch

K	Livello di concordanza
≤ 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

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

Confrontando i risultati ottenuti dai singoli laboratori con scala di Landis & Koch (tabella 5) che fornisce un'indicazione per interpretare le performance di un laboratorio sulla base del valore K ottenuto, si può concludere che i partecipanti hanno dato una buona o ottima risposta al circuito.

La concordanza dell'intero circuito è pari a (0.8372 $p=0.000$) e quindi ottima.