

CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER GLI ENTEROBATTERI PATOGENI

RAPPORTO REGIONALE SULLA SORVEGLIANZA DELLE RETI ENTER-NET ED
ENTER-VET - ANNO 2017

A CURA DI: RITA TOLLI, GINA DI GIAMPIETRO, MARIA GRAZIA MARROCCO, SILVIA VITA E
STEFANO BILEI

Centro di riferimento regionale per gli enterobatteri patogeni
Rapporto regionale sulla sorveglianza delle reti Enter-Net ed Enter-Vet Anno 2017

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri
via Appia Nuova, 1411 00178 Roma
mail: crep@izslt.it

Stefano Bilei
Dirigente Medico Veterinario -
Responsabile del Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni
E-Mail: stefano.bilei@izslt.it
Tel.06/79099355

Rita Tolli
Dirigente Biologo Sanitario
E-Mail: rita.tolli@izslt.it
Tel.06/79099426

Gina Di Giampietro
Collaboratore professionale sanitario esperto
E-Mail: gina.digiampietro@izslt.it
Tel.06/79099426

Maria Grazia Marrocco
Collaboratore professionale sanitario
E-Mail: mariagrazia.marrocco@izslt.it
Tel.06/79099426

SILVIA VITA
COLLABORATORE PROFESSIONALE SANITARIO
E-MAIL: silvia.vita@izslt.it
TEL.06/79099426

SOMMARIO

La relazione EFSA/EDCD - Tendenze e fonti delle zoonosi, degli agenti zoonotici e focolai di tossinfezione alimentare nel 2017	4
<i>SALMONELLA</i>	6
<i>LISTERIA</i>	9
<i>YERSINIA</i>	11
Le attività del Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni - CREP	12
<i>Salmonella</i> di origine umana	14
<i>Salmonella</i> di origine veterinaria	24
<i>Salmonella</i> negli animali.....	26
<i>Salmonella</i> negli alimenti	31
<i>Salmonella</i> in campioni ambientali	34
<i>LISTERIA</i>	35
<i>YERSINIA</i>	38

LA RELAZIONE EFSA/EDCD - TENDENZE E FONTI DELLE ZONOSI, DEGLI AGENTI ZOOTICI E FOCOLAI DI TOSSINFEZIONE ALIMENTARE NEL 2017¹

La relazione sulle tendenze e le fonti di zoonosi pubblicata dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) si basa sui dati del 2017 raccolti da tutti i 28 Stati membri dell'Unione Europea (UE). Nove altri Paesi del continente europeo hanno riferito dati su alcuni degli agenti zootici (Norvegia, Islanda, Svizzera e Liechtenstein, Albania, Bosnia-Erzegovina, Serbia, Montenegro e Macedonia).

Rispetto al 2016 lo scorso anno nella UE ci sono state piccole fluttuazioni nelle segnalazioni di casi di malattie zootiche. Negli ultimi cinque anni il numero di casi di salmonellosi e campilobatteriosi è infatti rimasto stabile mentre la listeriosi continua ad aumentare.

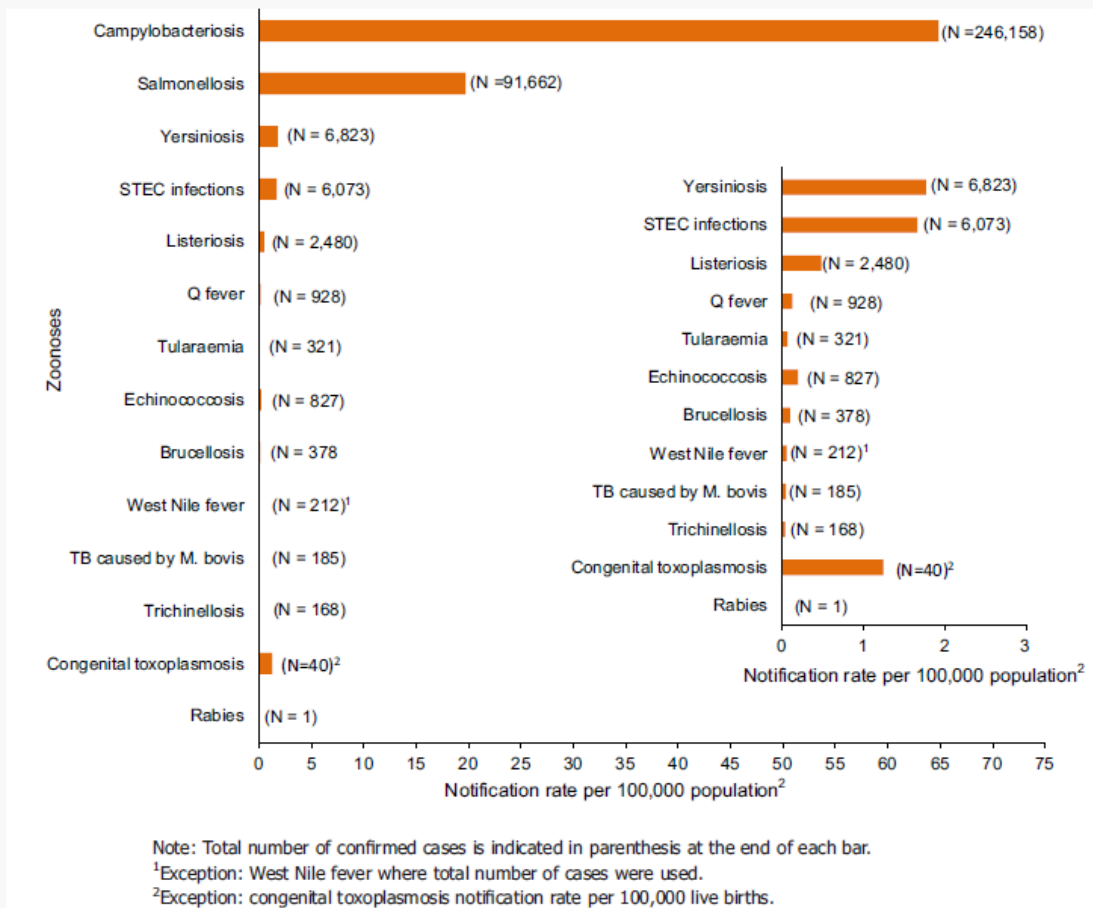
Dopo diversi anni di calo, il numero di casi di salmonellosi nell'UE si è stabilizzato. Nel 2017 il numero è sceso leggermente da 94.425 a 91.662 casi, ma negli ultimi anni la tendenza al ribasso, iniziata nel 2008, si è arrestata.

Basandosi sui dati di gravità della malattia, la listeriosi è stata la più grave zoonosi con il più alto tasso di ospedalizzazione e di mortalità nella UE.

I 5.079 focolai veicolati da alimenti e acqua segnalati nel 2017 rappresentano un calo del 6,8% rispetto al 2016. La causa più comune delle epidemie di origine alimentare è stata attribuita a *Salmonella*, in particolare nei prodotti a base di carne e uova.

¹ The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zootic agents and food-borne outbreaks in 2017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

Figura 1 - Notifiche di casi di zoonosi nella UE nel 2017



La salmonellosi rimane la seconda zoonosi più comune nell'uomo nella UE, nonostante una significativa diminuzione della tendenza nei casi confermati fin dal 2008. Negli ultimi 5 anni (2013-2017), tuttavia, la tendenza si è stabilizzata. Nel 2017, il numero di casi umani confermati segnalati e il tasso di notifica dell'UE sono leggermente diminuiti anche se dopo un aumento di 3 anni.

Nel 2017, 91.662 casi confermati di salmonellosi umana sono stati segnalati nella UE da tutti gli Stati membri. Il tasso di notifica dell'UE è stato di 19,7 casi per 100.000 abitanti, leggermente inferiore (2,9% in meno) al valore del 2016 (20,4 casi per 100.000 abitanti). Una tendenza decrescente statisticamente significativa di casi confermati di salmonellosi è stata osservata nella UE tra il 2008 e il 2017, considerando i 25 paesi che hanno riferito durante questo periodo; tuttavia, negli ultimi 5 anni (2013-2017), la tendenza generale non ha mostrato alcun aumento o diminuzione statisticamente significativa.

I primi cinque sierotipi più comunemente segnalati nei casi umani nella UE durante il 2017 sono stati, in ordine decrescente: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* monofasica, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Newport*.

I casi dovuti a *S. Enteritidis* hanno continuato ad aumentare nel 2017. Ciò è dovuto principalmente alle notifiche di un nuovo Stato membro (Polonia) che ha iniziato a segnalare i dati per questo sierotipo. Nel 2016 si è verificato un focolaio multinazionale dovuto proprio a *S. Enteritidis* confermato in 14 paesi e associato a uova contaminate provenienti dalla Polonia. Nel corso del 2017 i casi associati a questo focolaio sono diminuiti ma hanno ripreso a crescere di nuovo durante la fine dell'anno. Dagli studi è emerso che è probabile che questo focolaio^{2,3,4} appartenga a un'epidemia causata da un clone di *S. Enteritidis* già esistente dal 2012 e ancora in corso nel 2017, con il caso più recente riportato a novembre 2017.

Le proporzioni di casi umani causati da *S. Typhimurium* monofasica, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* sono diminuite rispetto al 2016, mentre è rimasta invariata per *S. Newport*.

Il numero di casi e la proporzione del secondo sierotipo *S. Typhimurium* più comune hanno continuato a diminuire nel 2017. Insieme, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (inclusa la variante monofasica di *S. Typhimurium*) hanno rappresentato quasi l'80% dei casi umani.

S. Infantis è stato costantemente il quarto sierotipo più frequentemente segnalato.

S. Newport ha sostituito *S. Derby* come quinto sierotipo più comune. L'aumento di *S. Newport* è dovuto principalmente al numero elevato di casi che si sono verificati in un singolo Paese (Regno Unito).

Tra i sierotipi segnalati da tutti i casi di salmonellosi e ignorando le informazioni collegate ai viaggi, *S. Agona* ha sostituito *S. Derby* come il sesto sierotipo più comune. Ciò potrebbe essere dovuto a due epidemie multinazionali di *S. Agona* nella UE oggetto di indagine nel corso del 2017.

² ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017a. *Re-emerging multi-country WGS-defined outbreak of Salmonella Enteritidis, MLVA type 2-12-7-3-2 and 2-14-7-3-2, 3 February 2017. 6 pp.*

³ ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017b. *Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis phage types 56 and 62, MLVA profile 2-11-3-3-2 and 2-12-3-3-2 infections 20 July 2017. 7 pp.*

⁴ EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2017a. *Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections linked to Polish eggs.*

Uno dei focolai⁵ era legato al consumo di latte artificiale in Francia da agosto 2017 a gennaio 2018 e l'altro⁶ è stato probabilmente collegato al consumo di alimenti "Ready To Eat", anche se l'evidenza microbiologica disponibile suggerisce che questi prodotti RTE siano un possibile veicolo di infezione, ma non è stato possibile identificare il punto specifico nella catena di produzione in cui si è verificata la contaminazione.

I tassi di notifica della salmonellosi umana variano tra Stati membri, riflettendo variazioni della qualità, della copertura e della gravità dei sistemi di sorveglianza, delle pratiche di campionamento, della prevalenza della malattia nella popolazione animale, del commercio di alimenti e animali tra Stati membri e percentuale di casi associati ai viaggi. La variazione nei sistemi di sorveglianza nazionali si riflette, ad esempio, nel fatto che i paesi che segnalano il tasso di notifica più basso per la salmonellosi hanno le percentuali più elevate di ospedalizzazione, suggerendo che i sistemi di sorveglianza in questi paesi si concentrano sui casi più gravi.

Per quanto riguarda la presenza di *Salmonella* negli alimenti e negli animali *S. Typhimurium* è stata isolata da quasi tutte le fonti di alimenti e animale considerate.

Per la variante monofasica di *S. Typhimurium* è stata confermata una forte associazione con la filiera suina.

S. Infantis è marcatamente associato ai polli da carne e alla carne di pollame. Infine, *S. Newport* è stato associato con tacchino e polli da carne.

I dati scaturiti dal controllo degli alimenti ai sensi del regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici, rispetto agli anni precedenti, sono risultati scarsi e non rappresentativi per descrivere la situazione a livello di UE. Comunque in generale, i livelli più alti di positività per *Salmonella* sono stati segnalati per le categorie di carne destinate ad essere consumate cotte (carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame e carne macinata e preparazioni a base di carne di altre specie diverse dal pollame). Questa osservazione risulta coerente con le notifiche del 2017 nel Sistema di allarme rapido per alimenti e mangimi (RASFF⁷) della UE, dove il numero più elevato di non conformità riguardava carne di pollame e carne di altre specie.

I dati relativi al monitoraggio dei criteri di igiene del processo relativi a *Salmonella* su carcasse di suino sono stati segnalati da otto Stati membri con campioni provenienti sia dal controllo ufficiale che da attività di autocontrollo. Per sette di questi Stati membri, il numero stimato di campioni positivi a *Salmonella* derivanti dall'attività di autocontrollo è stata significativamente inferiore rispetto ai campioni del controllo ufficiale.

Si è osservata una tendenza decrescente per quanto riguarda la prevalenza dei sierotipi target nelle galline da riproduzione, nelle galline ovaiole, nei polli da carne e nei tacchini da ingrasso ma non nei tacchini da riproduzione, dove la tendenza è rimasta costante ma con fluttuazioni nel tempo.

La prevalenza di *Salmonella* spp. ha mostrato una tendenza in crescita in tutte le categorie di pollame ma non nelle galline ovaiole.

⁵ EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018a.

Multi-country outbreak of Salmonella Agona infections linked to infant formula. EFSA supporting publication 2018;15(1):EN-1365, 11 pp.

⁶ EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018c.

Multi-country outbreak of Salmonella Agona infections possibly linked to ready-to-eat food. EFSA supporting publication 2018;15(7):EN-1465, 15 pp.

⁷ https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2017.pdf

Il numero di isolati di *S. Infantis* segnalati è aumentato, il che è stato marcatamente associato alla catena di produzione dei polli da carne, dove era di gran lunga il sierotipo più comune isolato sia dagli animali che dai campioni di carne.

Mentre è ancora relativamente rara, la listeriosi umana è una delle malattie più gravi di origine alimentare sotto controllo della UE, causando elevata ospedalizzazione ed elevata mortalità, in particolare tra gli anziani. La sorveglianza sulla listeriosi umana si concentra su forme gravi e invasive della malattia, che colpisce alcuni gruppi di rischio: anziani, persone immunocompromesse, donne in gravidanza e bambini piccoli.

La listeriosi invasiva ha mostrato un trend in aumento significativo da quando è stata avviata la sorveglianza nella UE a partire dal 2008. Inoltre, ha continuato a mostrare un trend significativamente crescente negli ultimi 5 anni (2013-2017), sebbene il numero di casi non sia aumentato nel 2017. Cinque gli Stati membri che hanno segnalato tendenze in aumento negli ultimi 5 anni. Ciò è in parte attribuibile alla segnalazione più completa e ai miglioramenti nella sorveglianza di questa malattia.

Nel 2017, tutti i 28 Stati membri hanno segnalato 2.480 casi umani di listeriosi invasiva confermati. Il tasso di notifica dell'UE era di 0,48 casi per 100.000 abitanti, comparabile con il 2016.

Dall'inizio della sorveglianza a livello UE, la maggior parte dei casi di listeriosi sono stati segnalati in persone di età superiore ai 64 anni. Il numero e la proporzione di casi segnalati per questa fascia di età è aumentata costantemente dal 2008 e ha continuato ad aumentare nel 2017. I casi umani sono quasi raddoppiati nella fascia di età superiore a 84 anni nello stesso periodo di tempo. Come negli anni precedenti, quasi tutti i casi di listeriosi segnalati (99,8%) sono stati ospedalizzati. Nonostante la lieve diminuzione dei casi fatali, la listeriosi ha causato la più alta percentuale di tali casi rispetto a tutte le altre infezioni zoonotiche. Oltre alla segnalazione e ai miglioramenti più completi nella sorveglianza, l'aumento delle infezioni da *Listeria* può essere parzialmente spiegato dall'invecchiamento della popolazione.

Per quanto riguarda i casi di listeriosi di origine alimentare sono stati segnalati 39 casi umani da sei Stati membri (Austria, Danimarca, Germania, Irlanda, Italia e Svezia) e uno non-SM (Svizzera). Gli episodi erano dovuti ad alimenti come formaggi, pesce e prodotti ittici, carne e prodotti a base di carne e verdura.

I dati sugli alimenti pronti al consumo (RTE) su *L. monocytogenes* sono generati dal regolamento 2073/2005 che stabilisce i criteri microbiologici e le norme di attuazione che devono essere rispettate dagli operatori del settore alimentare nell'attuazione delle misure igieniche generali e specifiche.

I dati su *L. monocytogenes* negli animali e i mangimi forniti dagli Stati membri all'EFSA sono generati da schemi di monitoraggio non armonizzati negli Stati membri e per i quali non esistono obblighi di segnalazione obbligatori.

Nel 2017, 26 Stati membri hanno riferito i dati su alimenti RTE. Il numero di segnalazioni relative agli Stati membri varia considerevolmente in base alla categoria/tipo di alimenti RTE. I risultati non soddisfacenti nelle diverse categorie di alimenti RTE sono stati costantemente più elevati nella fase di lavorazione rispetto al dettaglio. Considerando i dati nei campioni di alimenti RTE provenienti da tutte le fasi di campionamento, nel 2017 la presenza di *L. monocytogenes* era più alta nei pesci e nei prodotti della pesca (6%) seguita da insalate RTE (4,2%), carne RTE e prodotti a base di carne (1,8%), formaggi molli e semi-morbidi (0,9%), frutta e verdura (0,6%) e formaggi a pasta dura (0,1%). Questi dati sono, in generale, in accordo con i dati del 2016.

Una vasta gamma di prodotti alimentari può occasionalmente essere contaminata durante le varie fasi di produzione e distribuzione degli alimenti, in particolare durante la fase di lavorazione degli alimenti. Molti diversi tipi di alimenti RTE sono stati implicati in casi sporadici o focolai di listeriosi nell'uomo. Alcuni Stati membri concentrano i campionamenti soprattutto su quegli alimenti RTE che favoriscono la crescita di *L. monocytogenes* e che vengono conservati per periodi prolungati a temperature di refrigerazione prima del consumo. I classici alimenti ad alto rischio sono carne e prodotti a base di carne RTE, pesce e prodotti ittici e formaggi. Negli ultimi anni, tuttavia, i focolai di listeriosi sono stati causati anche da alimenti che, sulla base delle precedenti esperienze e valutazioni del rischio⁸, non sono stati considerati come probabili veicoli alimentari. Ne è un esempio il focolaio nella UE relativo al mais congelato⁹. Altri esempi anche al di fuori della UE (Stati Uniti) relativo ai meloni¹⁰, ai gelati¹¹, alle mele caramellate confezionate¹² e germogli¹³ sono prove di potenziali veicoli precedentemente sconosciuti.

⁸ Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC and Whiting RC, 2018. A review of *Listeria monocytogenes*:

An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments (vol. 75, p. 1, 2017). *Food Control*, 88, 236-236.

⁹ EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018b.

Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables - first update. EFSA supporting publication 2018;15(7):EN-1448, 22 pp.

¹⁰ CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2011. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms, Colorado (final update).

¹¹ Pouillot R, Klontz KC, Chen Y, Burall LS, Macarasin D, Doyle M, Bally KM, Strain E, Datta AR, Hammack TS and Van Doren JM, 2016. Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream, United States, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22, 2113-2119.

¹² CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2015a. Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made from bidart bros. Apples (final update).

¹³ CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2015b. Sprouts and investigation of human listeriosis cases (final update). Wholesome Soy Products, Inc..

La yersiniosi rimane la terza zoonosi batterica di origine alimentare più diffusa nell'UE nel 2017. Tra il 2008 e il 2017 si è registrata una significativa diminuzione dei casi di yersiniosi nella UE, ma negli ultimi 5 anni (2013-2017) la tendenza non ha mostrato alcun aumento o diminuzione significativa. I più alti tassi di notifica sono stati segnalati negli Stati membri dell'Europa nordorientale.

Ventisei Stati Membri hanno segnalato 6.823 casi confermati di yersiniosi nel 2017. Il tasso di notifica dell'UE è stato di 1,77 casi ogni 100.000 abitanti, il 2,8% in meno rispetto al 2016. *Yersinia enterocolitica* è stata la specie più comunemente segnalata da casi umani. Il bio sierotipo più comune è stato 4/O:3 seguito da 2/O:9 e 2/O:5,27. Tre casi fatali sono stati segnalati tra i 4.467 casi confermati di yersiniosi per i quali queste informazioni erano disponibili.

Yersinia è stata identificata in 12 focolai di origine alimentare che hanno interessato 147 persone in 6 Stati membri. Undici di questi sono stati causati da *Y. enterocolitica*, tra cui un grande focolaio in Danimarca che ha coinvolto 80 pazienti.

Pochissimi Stati membri hanno riportato dati da alimenti e da animali per presenza di *Yersinia* nel 2017, come negli anni precedenti. Questi scarsi dati precludono osservazioni significative a livello europeo.

A seguito del Decreto del Commissario ad Acta del 29 settembre 2015, n. U00452 (Piano Regionale per la Sorveglianza e la Gestione di Emergenze Infettive durante il Giubileo Straordinario 2015 - 2016) prorogato al 2019 con il Decreto del Commissario ad Acta del 25 maggio 2018, n. U00209, il Centro di Riferimento che nel corso degli anni ha costantemente trasmesso dati riguardanti gli isolamenti umani all'Agenzia Regionale di Sanità Pubblica, ha avviato con le medesime finalità, un rapporto di collaborazione con il Servizio Regionale per l'Epidemiologia, Sorveglianza e Controllo delle Malattie Infettive (SERESMI).

Avendo il medesimo Decreto sopra menzionato nel sotto paragrafo relativo alla Sorveglianza, individuato il Laboratorio Regionale di Riferimento quale centro competente per le tossinfezioni alimentari con particolare riguardo a *Salmonella*, tale collaborazione si è estesa con l'interessamento nel corso del 2017 delle strutture sanitarie pubbliche della regione Lazio richiedenti ulteriori attività diagnostiche di caratterizzazione sugli isolati di *Listeria monocytogenes*.

Tale attività si è quindi affiancata a quella tradizionale che il Centro garantisce alle strutture sanitarie pubbliche e private della Regione Lazio per quanto attiene la caratterizzazione degli isolati umani di *Salmonella*. In assenza di un'analoga organizzazione sul territorio della Regione Toscana, il Laboratorio dà supporto nell'attività di diagnostica sierologica e molecolare, all'Ospedale "San Luca" di Lucca, che nel corso dell'anno ha conferito 139 ceppi di *Salmonella* spp.

Complessivamente le strutture che hanno collaborato con l'invio di ceppi batterici sono state 50 in particolare: 26 Ospedali, 23 Laboratori privati, 1 Clinica privata.

Come già registrato negli anni precedenti, il numero più rilevante dei campioni è stato conferito da strutture sanitarie presenti soprattutto nella città di Roma e nel territorio della provincia di Roma.

Accanto a questa attività, il Centro ha continuato a fornire il supporto diagnostico ai Laboratori della Sede Centrale e delle Sezioni dell'Istituto che eseguono prove di microbiologia, nella sierotipizzazione dei ceppi isolati sia nell'ambito dell'attività svolta su campioni di alimenti, sia su campioni diagnostici che su campioni eseguiti nello svolgimento di attività di ricerca.

Sempre attiva e proficua la collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per l'antibiotico resistenza (CRAB) presso l'IZSLT, con l'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito della partecipazione alla rete Enter-net e con il Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi dell'IZS delle Venezie nell'ambito della rete Enter-vet.

Nel corso degli ultimi anni il Centro ha operato un ampliamento significativo delle proprie competenze e quindi della offerta diagnostica e pertanto a fianco della diagnostica sierologica e molecolare su ceppi di *Salmonella* isolati da pazienti umani e in ambito veterinario si è aggiunta una analoga attività su altri patogeni di interesse in sanità pubblica quale *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* STEC.

La partecipazione alla rete ENTER-NET, implica che il Centro raccolga, archivi ed elabori le informazioni riguardanti gli isolamenti umani ottenuti nella Regione Lazio e le trasmetta periodicamente all'Istituto Superiore di Sanità mentre la sua adesione alla rete ENTER-VET sistema di sorveglianza per gli isolamenti di *Salmonella* spp da campioni di origine veterinaria (alimenti, animali ed ambiente), richiede di trasmettere al Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, i dati relativi alla tipizzazione degli isolati ottenuti da matrici veterinarie dai laboratori di microbiologia dell'Istituto presenti nelle due regioni di competenza e dai laboratori pubblici e privati delle medesime regioni che hanno rapporti di collaborazione con il Centro.

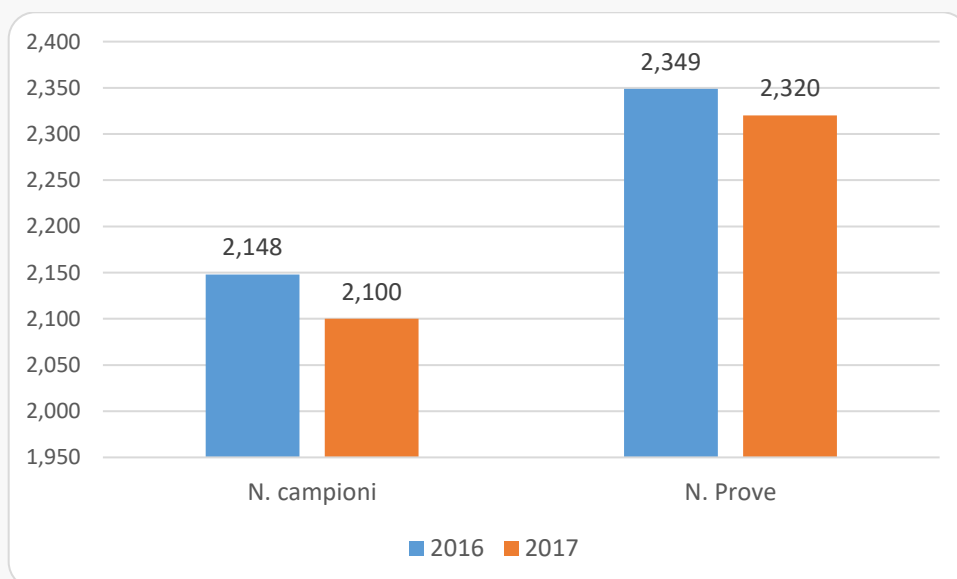
Nel corso dell'anno sono stati collezionati complessivamente ulteriori 1.179 ceppi patogeni identificati come *Salmonella* (875), *Shigella* (7), *Listeria monocytogenes* (248), *Yersinia enterocolitica* (37), *E. coli* STEC (12) di cui 456 di origine umana e 713 di origine veterinaria. Tutti i ceppi identificati come appartenenti al genere *Salmonella* così come tutti gli altri isolati riferibili ad Enterobatteri sia di origine umana che veterinaria pervenuti nel corso dell'anno sono stati trasferiti, come di consueto, al Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza (CRAB) individuato presso l'Istituto, per la determinazione dei fattori di resistenza.

I ceppi di di origine veterinaria di *Listeria monocytogenes*, essendo il Centro il punto di contatto per l'Istituto con l'LNLR per *Listeria* presso l'IZS di Teramo per il tramite del sistema SEAP (Sistema Informativo Agenti Patogeni Alimentari), dopo essere stati sottoposti alle attività diagnostiche previste, sono inviati al Laboratorio di Riferimento Nazionale.

I ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da casi umani dopo esecuzione delle prove diagnostiche in coerenza con quanto previsto dalla Nota circolare del Ministero della Salute 0008252-1\3/03/20917 DGPRES-DGPRES-P del 13 marzo c.a. avente per oggetto "Sorveglianza e prevenzione della listeriosi" e dalla nota dell'Istituto Superiore di Sanità DSVA 16/11/2017-0000620 del 16 novembre c.a. avente per oggetto "Attività del Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CREP), sono trasferiti all'Istituto Superiore di Sanità.

Complessivamente nel 2017 è stato registrato un lieve decremento sia del numero dei campioni pervenuti che delle prove eseguite rispetto allo scorso anno.

Grafico 1 - Campioni e prove 2016 - 2017



La maggior parte dell'attività è riferibile ai compiti istituzionali del Centro (80,8%), tuttavia risulta non trascurabile l'attività legata al Controllo qualità (19,2%) con prove eseguite sia per il mantenimento della qualifica degli operatori che per la validazione delle prove per l'emissione e la revisione delle Procedure Operative Standard adottate.

SALMONELLA DI ORIGINE UMANA

Complessivamente i ceppi notificati al sistema Enter-net sono stati 294 di cui 284 ceppi di *Salmonella*, 6 di *Campylobacter*, 3 di *Shigella* e 1 di *Escherichia coli*.

La maggior parte degli isolati batterici è stata inviata dagli ospedali (61,2%) seguiti dai laboratori privati (38,4%) della provincia di Roma.

Tabella 1 - Numero delle strutture afferenti distinte per tipologia

Strutture	Numero	%
Ospedali	26	52
Laboratori privati	23	46
Cliniche e Case di Cura	1	2
Totale	50	100

Grafico 2 - Numero delle strutture afferenti distinte per tipologia

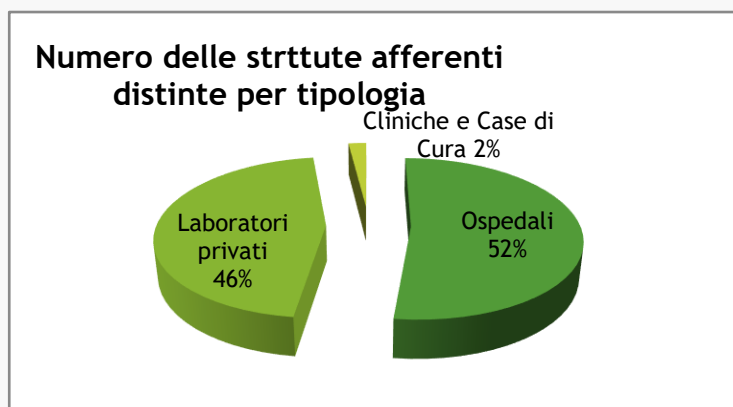


Tabella 2 - Strutture afferenti e numero di isolati inviati

Strutture	Numero ceppi
Ospedale Bambino Gesù	44
Laboratorio Analisi Guidonia	40
Policlinico A. Gemelli	21
Laboratorio Analisi Bios	18

Strutture	Numero ceppi
Ospedale San Filippo Neri	15
Policlinico Umberto I	13
Ospedale San Camillo Forlanini	11
Laboratorio Marilab	10
Laboratorio Analisi Aurelia	9
Ospedale Sandro Pertini	9
Ospedale G.B. Grassi Ostia	8
Ospedale S. Eugenio (RM)	8
Ospedale San Pietro Fatebenefratelli	8
Ospedale di Formia	7
Presidio Ospedaliero Genzano di Roma	6
Laboratorio G. Alessandrini	5
Ospedale Madre Giuseppina Vannini	5
Ospedale S. Maria Goretti	5
Policlinico Casilino	4
IRCCS S. Raffaele Pisana	3
Laboratorio Analisi Lepetit	3
Laboratorio Biolab	3
Laboratorio Namur	3
Laboratorio Preneste	3
Laboratorio Analysis Artemisia	2
Laboratorio Casella	2
Laboratorio Dott. G. Bugliosi	2
Laboratorio Proda	2
Policlinico Universitario Campus Bio-medico di Roma	2
Salvator Mundi International Hospital	2
USI Prati	2
Aurelia Hospital	1
Casa di Cura Nostra Signora della Mercedes	1
IFO Istituto Dermatologico San Gallicano	1
Lab. Marilab Zambrini	1
Laboratorio Artemedica Torvergata	1
Laboratorio Axalab	1
Laboratorio Biodiagnostica (USI)	1
Laboratorio Iris	1
Laboratorio Ricerche Cliniche Clodio	1
Laboratorio Rocomar (Gruppo USI)	1
Laboratorio Sermolab (LT)	1
Labortatorio Analisis 1980	1

Strutture	Numero ceppi
Ospedale A. Fiorini di Terracina (LT)	1
Ospedale Civile "Coniugi Bernardini" di Palestrina	1
Ospedale Cristo Re	1
Ospedale Israelitico	1
Ospedale L. Spallanzani	1
Ospedale S. Andrea	1
Policlinico Luigi di Liegro	1
Totale	294

Tabella 3 - Rappresentazione per specie e sottospecie degli isolati di Salmonella di origine umana

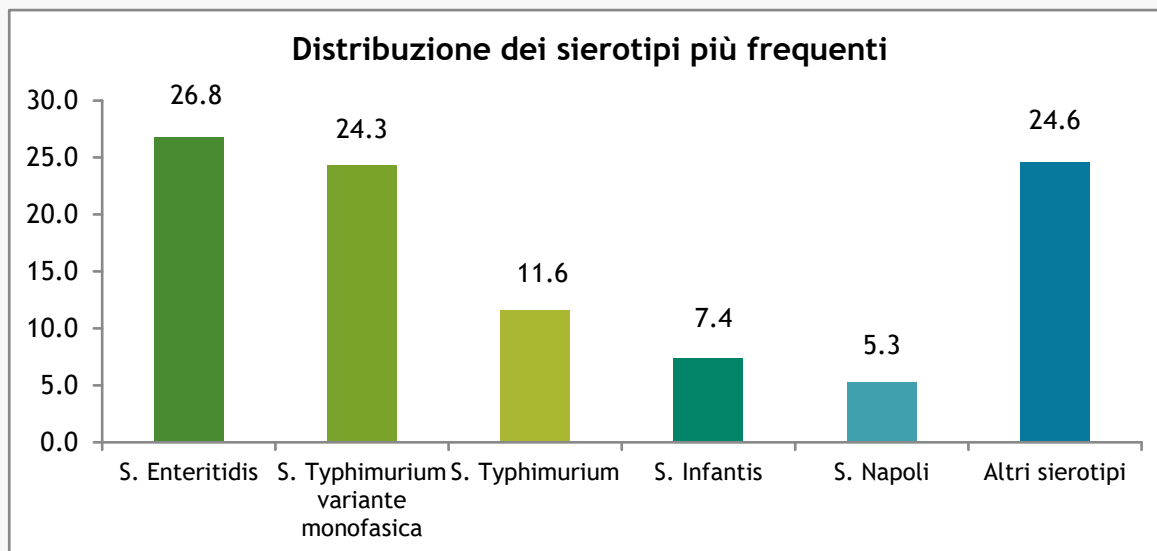
Specie	Subspecie	Numero ceppi
S. enterica	subsp. enterica (I)	279
	subsp. salamae (II)	1
	subsp. arizonae (IIIa)	
	subsp. diarizonae (IIIb)	2
	subsp. houtenae (IV)	
	subsp. indica (VI)	1
S. bongori		1
Totale		284

Tabella 4 - Sierotipi di Salmonella di origine umana

Sierotipi	Totale	%
S. Enteritidis	76	26,8
S. Typhimurium variante monofasica	69	24,3
S. Typhimurium	33	11,6
S. Infantis	21	7,4
S. Napoli	15	5,3
S. Brandenburg	9	3,2
S. Derby	7	2,5
S. Thompson	4	1,4
S. Braenderup	3	1,1

Sierotipi	Totale	%
S. Newport	3	1,1
S. Rissen	3	1,1
S. Saintpaul	3	1,1
S. Bovismorbificans	2	0,7
S. Goldcoast	2	0,7
S. Stanleyville	2	0,7
S. Szentes	2	0,7
S. Abony	1	0,4
S. Agama	1	0,4
S. Agbeni	1	0,4
S. Bredeney	1	0,4
S. Carno	1	0,4
S. Coeln	1	0,4
S. Corvallis	1	0,4
S. Haduna	1	0,4
S. Kambole	1	0,4
S. Kapemba	1	0,4
S. London	1	0,4
S. Montevideo	1	0,4
S. Muenchen	1	0,4
S. Nagoya	1	0,4
S. Panama	1	0,4
S. Paratyphi B	1	0,4
S. Paratyphi C	1	0,4
S. Richmond	1	0,4
S. Typhi	1	0,4
S. Uganda	1	0,4
S. Veneziana	1	0,4
<i>Salmonella</i> O:7 Gruppo (C1)	1	0,4
S. enterica subsp. salamae 41:z:1,5	1	0,4
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5,7	2	0,7
S. enterica subsp. indica 48:z10:1,5	1	0,4
S. bongori 48:z35:-	1	0,4
<i>Salmonella</i> non tipizzabile sierologicamente	3	1,1
Totale	284	100

Grafico 3 - Distribuzione dei sierotipi più frequenti isolati dall'uomo



S. Enteritidis con il 26,8% è il sierotipo più frequente, segue *S. Typhimurium* monofasica (24,3%) e *S. Typhimurium* (11,6%). Questi 3 sierotipi da soli rappresentano il 62,7 % di tutti gli isolati.

Tabella 5 - Frequenza di isolamento di *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofasica e *S. Enteritidis* nel triennio 2015 - 2017

Sierotipo	2015	2016	2017
S. Enteritidis	14,0	24,9	26,8
S. Typhimurium variante monofasica	25,2	22,3	24,3
S. Typhimurium	22,9	17,0	11,6

Grafico 4 - Frequenza di isolamento di *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofasica e *S. Enteritidis* nel triennio 2015 - 2017

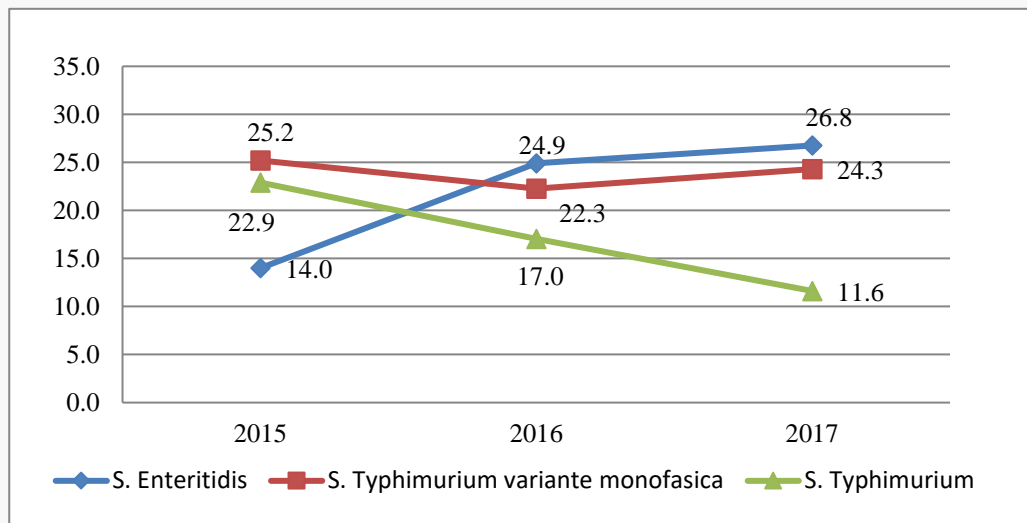


Tabella 6 - Distribuzione degli isolati per fascia d'età

Fascia età	Numero	%
0 - 11 mesi	10	3,5
1 - 5 anni	80	28,2
16 - 64 anni	69	24,3
6 - 14 anni	58	20,4
65 + anni	59	20,8
Non riportato	8	2,8
Totale	284	100

Grafico 5 - Distribuzione degli isolati per fascia d'età

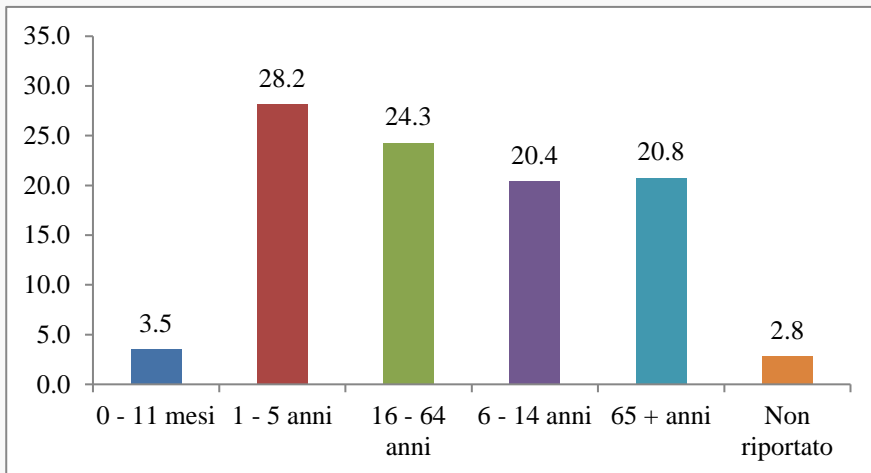


Grafico 6 - Matrice biologica di isolamento

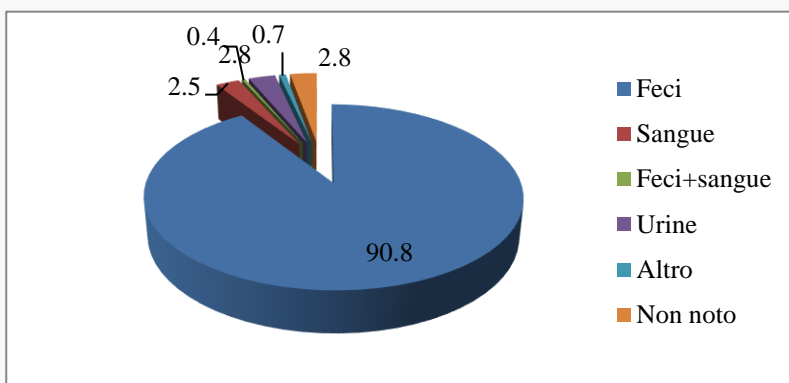


Grafico 7 - Motivo accertamenti diagnostici

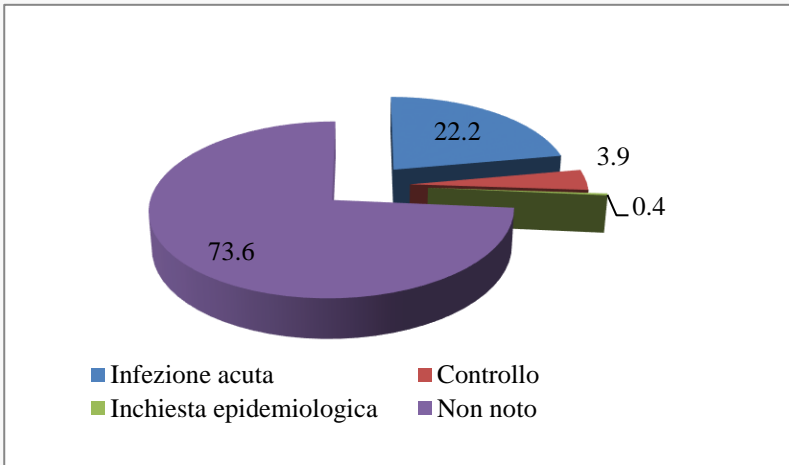


Grafico 8 - Ricoveri ospedalieri

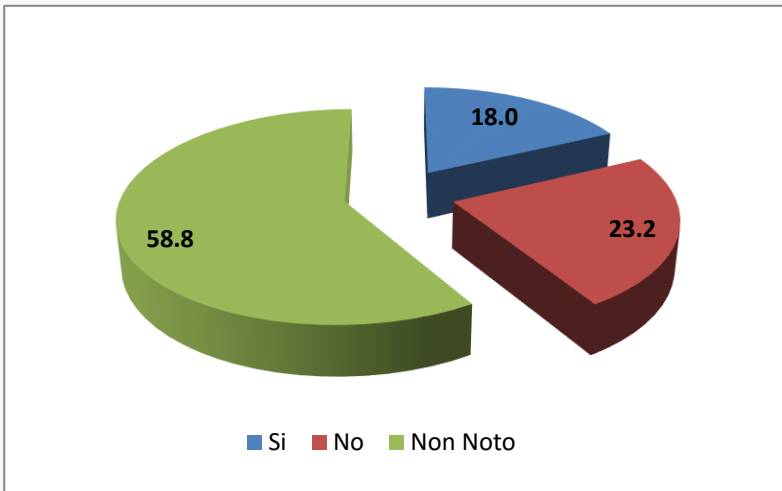


Grafico 9 - Notizie su viaggi recenti

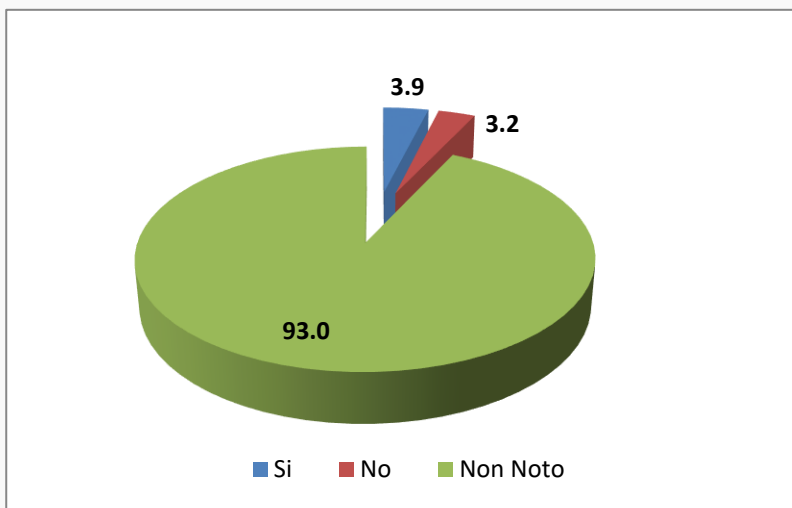


Grafico 10 - Dati sul consumo di alimenti

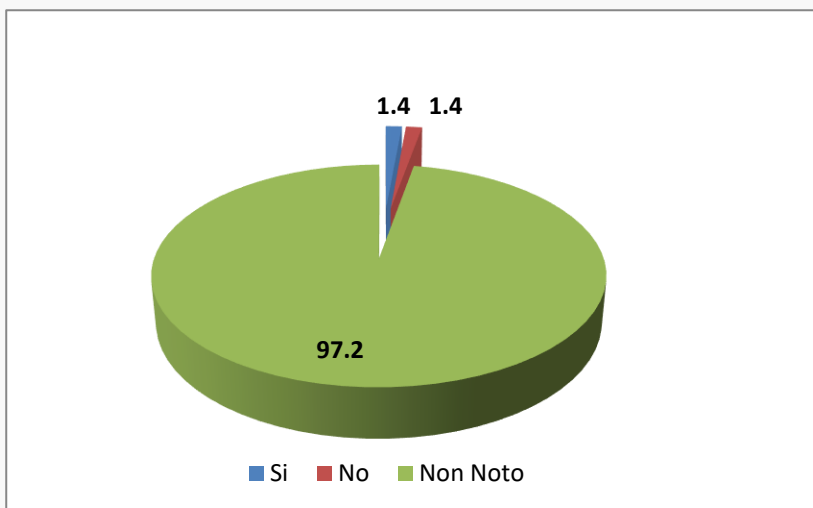


Tabella 7 - Sierotipi isolati e conferiti dall'Ospedale "San Luca" di Lucca

Sierotipo	Numero
S. Typhimurium variante monofasica	33
S. Typhimurium	29
S. Enteritidis	20

Sierotipo	Numero
S. Napoli	9
S. Derby	7
S. Thompson	6
S. Bredeney	5
S. Infantis	5
S. London	4
S. Weltevreden	4
S. Abony	2
S. Brandenburg	2
S. Stanley	2
S. Typhi	2
S. Abo	1
S. Agona	1
S. Braenderup	1
S. Kottbus	1
S. Saintpaul	1
S. Vitkin	1
Ceppo non appartenente al Genere <i>Salmonella</i>	3
Totale	139

SALMONELLA DI ORIGINE VETERINARIA

Nel corso del 2017 sono stati notificati dal CREP alla rete Enter-vet complessivamente 140 ceppi di *Salmonella* di cui 94 (67,1%) provenienti dalla Regione Lazio e 46 (32,9%) dalla Regione Toscana. Gli isolati provengono dai laboratori diagnostici e di microbiologia degli alimenti della Sede Centrale e delle Sezioni del Lazio e della Toscana oltre che da due Laboratori privati di Roma che eseguono attività a favore del privato.

Tabella 8 - Isolamenti di *Salmonella* per regione di provenienza

Regione	Numero	%
Lazio	94	67,1
Toscana	46	32,9
Totale	140	100

Tabella 9 - Rappresentazione per specie e sottospecie degli isolati di *Salmonella*

Specie	Subspecie	ANIMALE	ALIMENTO	AMBIENTE	Totale
S. enterica	subsp. enterica	55	58	6	119
	subsp. salamae	1			1
	subsp. diarizonae	12	1		13
	subsp. houtenae	5			5
	<i>Salmonella</i> non tipizzabile	1	1		2
Totale		74	60	6	140

Tabella 10 - Sierotipi di origine veterinaria per frequenza di isolamento

Sierotipo	ANIMALE	ALIMENTO	AMBIENTE	Totale	%
S. Infantis	1	18	4	23	16,4
S. Derby	2	14	1	17	12,1
S. Typhimurium	10	1		11	7,9
S. Typhimurium variante monofasica	1	10		11	7,9
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5,7	10			10	7,1
S. Kentucky	6			6	4,3
S. Napoli	6			6	4,3
S. Abortusovis	5			5	3,6
S. Enteritidis	4	1		5	3,6

Sierotipo	ANIMALE	ALIMENTO	AMBIENTE	Totale	%
S. Rissen		4		4	2,9
S. Veneziana	3			3	2,1
S. Brandenburg		2		2	1,4
S. Kapemba		2		2	1,4
S. London		2		2	1,4
S. Mbandaka	2			2	1,4
S. Newport	1	1		2	1,4
S. Thompson		1	1	2	1,4
S. Abony	1			1	0,7
S. Agbeni		1		1	0,7
S. Braenderup	1			1	0,7
S. Bredeney		1		1	0,7
S. Coeln	1			1	0,7
S. Corvallis	1			1	0,7
S. Etterbeek	1			1	0,7
S. Fischerhuetten	1			1	0,7
S. Kisarawe	1			1	0,7
S. Koketime	1			1	0,7
S. Lagos	1			1	0,7
S. Litchfield	1			1	0,7
S. Manhattan	1			1	0,7
S. Mishmarhaemek	1			1	0,7
S. Montevideo	1			1	0,7
S. Senftenberg	1			1	0,7
S. enterica subsp. diarizonae 40:i:1,5,7	1			1	0,7
S. enterica subsp. diarizonae 50:r:1,5		1		1	0,7
S. enterica subsp. diarizonae O:65	1			1	0,7
S. enterica subsp. houtenae 1,40:z4,z23:-	1			1	0,7
S. enterica subsp. houtenae 38:z4,z23:-	1			1	0,7
S. enterica subsp. houtenae 43:z4,z23:-	1			1	0,7
S. enterica subsp. houtenae 44:z4,z23:-	1			1	0,7
S. enterica subsp. houtenae 48:g,z51:-	1			1	0,7
S. enterica subsp. salamae 41:z:1,5	1			1	0,7
<i>Salmonella</i> non tipizzabile	1	1		2	1,4
Totale complessivo	74	60	6	140	100

SALMONELLA NEGLI ANIMALI

Tabella 11 - Distribuzione dei sierotipi nelle specie animali

Sierotipo	Pollo	Gallina ovaioia	Tacchino	Anatra	Bovino	Bufalo	Ovino	Caprino	Suino	Cinghiale	Animali da compagnia	Animali selvatici	Rettili - Anfibi	Totale	%
S. Typhimurium	2		1	1	1	1						4		10	13,5
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5,7							8	2						10	13,5
S. Kentucky		6												6	8,1
S. Napoli		1	1					1				2	1	6	8,1
S. Abortusovis							5							5	6,8
S. Enteritidis	1	3												4	5,4
S. Veneziana											1	1	1	3	4,1
S. Derby			1						1					2	2,7
S. Mbandaka	1	1												2	2,7
S. Typhimurium variante monofasica		1												1	1,4
S. Abony													1	1	1,4
S. Braenderup		1												1	1,4
S. Coeln												1		1	1,4
S. Corvallis				1										1	1,4
S. Etterbeek													1	1	1,4
S. Fischerhuetten													1	1	1,4
S. Infantis		1												1	1,4
S. Kisarawe													1	1	1,4
S. Koketime													1	1	1,4
S. Lagos													1	1	1,4
S. Litchfield												1		1	1,4
S. Manhattan						1								1	1,4
S. Mishmarhaemek		1												1	1,4
S. Montevideo													1	1	1,4
S. Newport						1								1	1,4
S. Senftenberg		1												1	1,4

Sierotipo	Pollo	Gallina ovaioia	Tacchino	Anatra	Bovino	Bufalo	Ovino	Caprino	Suino	Cinghiale	Animali da compagnia	Animali selvatici	Rettili - Anfibi	Totale	%
S. enterica subsp. diarizonae 40:i:1,5,7													1	1	1,4
S. enterica subsp. diarizonae O:65													1	1	1,4
S. enterica subsp. houtenae 1,40:z4,z23:-										1				1	1,4
S. enterica subsp. houtenae 38:z4,z23:-										1				1	1,4
S. enterica subsp. houtenae 43:z4,z23:-													1	1	1,4
S. enterica subsp. houtenae 44:z4,z23:-													1	1	1,4
S. enterica subsp. houtenae 48:g,z51:-													1	1	1,4
S. enterica subsp. salamae 41:z:1,5													1	1	1,4
Salmonella non tipizzabile	1													1	1,4
Totale	5	16	3	2	1	3	13	3	1	2	1	9	15	74	100

Tabella 12 - Numero e prevalenza dei principali sierotipi nelle specie animali

Sierotipo	Totale	%
S. Typhimurium	10	13,5
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5,7	10	13,5
S. Kentucky	6	8,1
S. Napoli	6	8,1
S. Abortusovis	5	6,8
Altri sierotipi	37	50,0
Totale	74	100

Grafico 11 - Numero e prevalenza dei principali sierotipi nelle specie animali

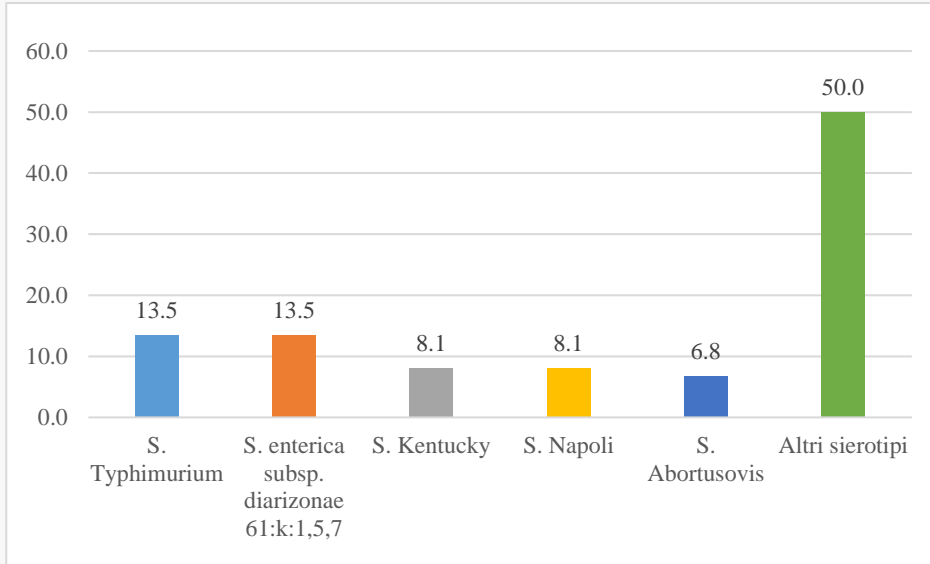


Tabella 13 - Distribuzione dei sierotipi nelle specie avicole

Sierotipo	Pollo	Gallina ovaiola	Tacchino	Anatra
S. Typhimurium	2		1	1
S. Kentucky		6		
S. Napoli		1	1	
S. Enteritidis	1	3		
S. Derby			1	
S. Mbandaka	1	1		
S. Typhimurium variante monofasica		1		
S. Braenderup		1		
S. Corvallis				1
S. Infantis		1		
S. Mishmarhaemek		1		
S. Senftenberg		1		
Salmonella non tipizzabile	1			
Totale	5	16	3	2

Tabella 14 - Sierotipi isolati negli ovini

Sierotipo	Ovino	Caprino
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5,7	8	2
S. Napoli		1
S. Abortusovis	5	
Totale	13	3

Tabella 15 - Sierotipi nei suidi

Sierotipo	Suino	Cinghiale
S. Derby	1	
S. enterica subsp. houtenae 1,40:z4,z23:-		1
S. enterica subsp. houtenae 38:z4,z23:-		1
Totale	1	2

Tabella 16 - Sierotipi nei bovidi

Sierotipo	Bovino	Bufalo
S. Typhimurium	1	1
S. Manhattan		1
S. Newport		1
Totale	1	3

Tabella 17 - Sierotipi isolati in animali da compagnia

Sierotipo	Animali da compagnia (Cane)
S. Veneziana	1

Tabella 18 - Sierotipi isolati in animali selvatici

Sierotipo	Fagiano	Procione	Tasso	Cincillà	Airone	Germano reale
S. Typhimurium				2	2	
S. Napoli	1	1				
S. Veneziana			1			
S. Coeln		1				
S. Litchfield						1
Totale	1	2	1	2	2	1

Tabella 19 - Sierotipi isolati nei rettili e anfibi

Sierotipo	Rettili	Anfibi
S. Napoli	1	
S. Veneziana		1
S. Abony	1	
S. Etterbeek	1	
S. Fischerhuetten	1	
S. Kisarawe	1	
S. Koketime	1	
S. Lagos	1	
S. Montevideo	1	
S. enterica subsp. diarizonae 40:i:1,5,7	1	
S. enterica subsp. diarizonae O:65	1	
S. enterica subsp. houtenae 43:z4,z23:-	1	
S. enterica subsp. houtenae 44:z4,z23:-	1	
S. enterica subsp. houtenae 48:g,z51:-	1	
S. enterica subsp. salamae 41:z:1,5	1	
Totale	14	1

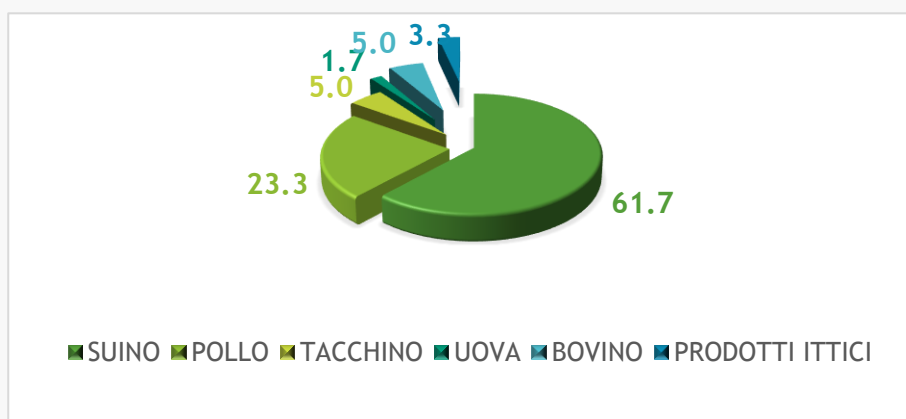
Tutti gli isolati provengono da animali ospitati presso il Bioparco di Roma tranne *S. enterica* subsp. *houtenae* 48:g,z51:-, isolata da una iguana ed inviata al Centro da un ambulatorio veterinario e *S. Veneziana* isolata da un anfibio (rospo) proveniente da uno stagno nella città di Roma.

SALMONELLA NEGLI ALIMENTI

Tabella 20 - Sierotipi isolati negli alimenti

Sierotipo	Suino	Pollo	Tacchino	Uova	Bovino	Prodotti ittici	Totale	%
S. Infantis	1	13	2		1	1	18	30,0
S. Derby	14						14	23,3
S. Typhimurium variante monofasica	10						10	16,7
S. Rissen	4						4	6,7
S. Brandenburg	2						2	3,3
S. Kapemba	2						2	3,3
S. London	1				1		2	3,3
S. Agbeni	1						1	1,7
S. Bredeney					1		1	1,7
S. enterica subsp. diarizonae 50:r:1,5						1	1	1,7
S. Enteritidis				1			1	1,7
S. Newport			1				1	1,7
S. Thompson		1					1	1,7
S. Typhimurium	1						1	1,7
Salmonella non tipizzabile	1						1	1,7
Totale	37	14	3	1	3	2	60	100

Grafico 12 - Presenza di Salmonella negli alimenti



La carne di suino ed i prodotti derivati risultano essere i più contaminati seguiti dalla carne di pollo.

Tabella 21 - Sierotipi isolati da carne suina

Sierotipo	Carne lavorata (salsiccia)	Carne lavorata (salame)	Preparazione gastronomica (tramezzini cotti e funghi)	Carne fresca	Tampone su carcassa	Totale
S. Derby	2	2			10	14
S. Typhimurium variante monofasica	4	1			5	10
S. Rissen	1	1			2	4
S. Brandenburg	1				1	2
S. Kapemba	1				1	2
S. Infantis				1		1
S. London					1	1
S. Agbeni			1			1
S. Typhimurium					1	1
Salmonella non tipizzabile	1					1
Totale	10	4	1	1	21	37

Tabella 22 - Sierotipi isolati da carne di pollo e tacchino

Sierotipo	POLLO				TACCHINO			Totale
	Carne fresca	Carne lavorata (Hamburger)	Carne lavorata (Involtini)	Prodotti a base di carne	Uova	Carne fresca	Carne lavorata (Macinato)	
S. Infantis	10		1	2			2	15
S. Enteritidis					1			1
S. Newport						1		1
S. Thompson		1						1
Totale	10	1	1	2	1	1	2	18

Tabella 23 - Sierotipi isolati da carne di bovino

Sierotipo	Carne lavorata (Macinato)
S. Infantis	1
S. London	1
S. Bredeney	1
Totale	3

Tabella 24 - Sierotipi isolati da prodotti ittici

Sierotipo	PRODOTTI ITTICI (non specificato)	MOLLUSCO BIVALVE (Cannolicchi)
S. Infantis	1	
S. enterica subsp. diarizonae 50:r:1,5	1	1
Totale	2	1

Tabella 25 - Sierotipi isolati da fonti ambientali

Sierotipo	Attrezzature	Fertilizzante: Ammendante compostato con fanghi
S. Infantis	4	
S. Derby	1	
S. Thompson		1

LISTERIA

Tabella 26 - Categorie di campioni positivi per *Listeria monocytogenes*

Categoria	N. campioni	N. ceppi
Prodotti/Preparazioni a base di carne	15	129
Prodotti ittici	14	183
Latte/derivati	8	26
Prodotti/Preparazioni gastronomiche	6	45
Carne fresca	5	14
Preparazioni gastronomiche a base di pesce	1	7
Ortaggi e legumi cotti in acqua o al vapore	1	3
Campioni ambientali	6	14
Animale	2	2
Totale	58	423

Tabella 27 - Sierotipi di *Listeria monocytogenes*

Sierotipi	Numero	%
Sierotipo 1/2a	225	53,2
Sierotipo 4b/4e	99	23,4
Sierotipo 1/2c	67	15,8
Sierotipo 1/2b	24	5,7
Sierotipo 3a	6	1,4
Non tipizzabile sierologicamente	2	0,5
Totale	423	100

Grafico 13 - Sierotipi di *Listeria monocytogenes*

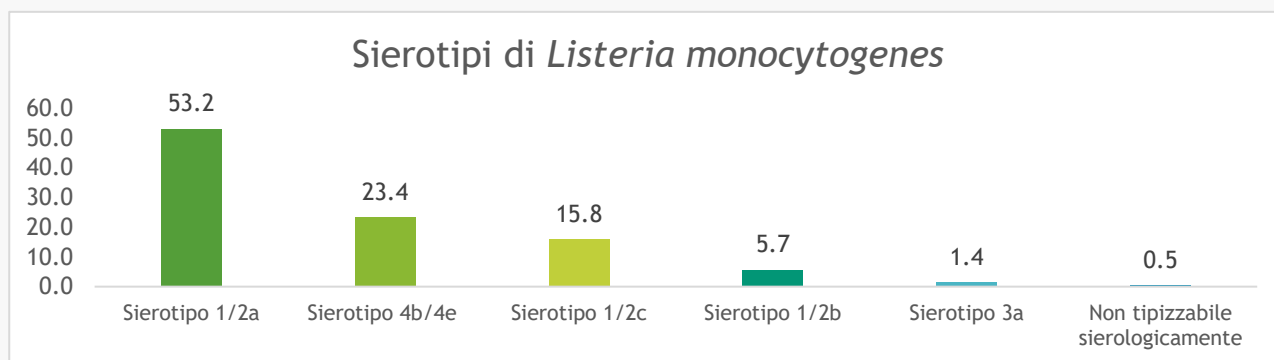


Tabella 28 - Tipologia dei campioni e sierotipi di *Listeria monocytogenes*

Categoria	Sierotipo	Totale
Prodotti/Preparazioni a base di carne	1/2a	67
	1/2c	58
	1/2b	4
Prodotti ittici	1/2a	120
	4b/4e	50
	1/2b	8
	3a	5
Latte/derivati	1/2a	12
	4b/4e	12
	1/2b	1
	1/2c	1
Prodotti/Preparazioni gastronomiche	4b/4e	36
	1/2b	5
	1/2a	2
	Non tipizzabile	2
Carne fresca	1/2a	7
	1/2c	5
	1/2b	2
Preparazioni gastronomiche a base di pesce	1/2a	7
Ortaggi e legumi cotti in acqua o al vapore	1/2c	3
Campioni ambientali	1/2a	10
	1/2b	3
	4b/4e	1
Animale	1/2b	1
	3a	1
Totale		423

Grafico 14 - Tipologia dei campioni e sierotipi di *Listeria monocytogenes*

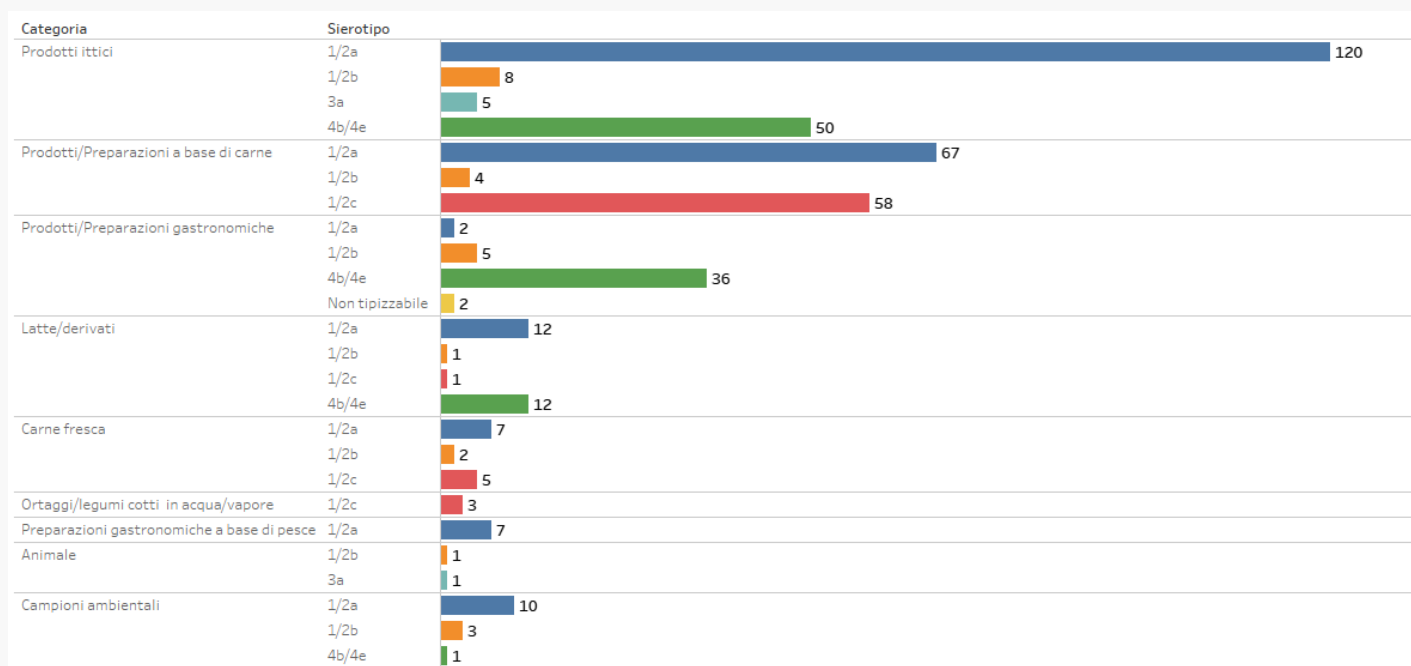


Tabella 29 - Isolamenti di *Listeria monocytogenes* in campioni di origine umana

Sierotipi	Numero
Sierotipo 1/2b	6
Sierotipo 1/2a	1
Sierotipo 1/2c	1
Sierotipo 4b/4e	1
Totale	9

YERSINIA

In totale sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica complessivamente 44 ceppi di *Yersinia enterocolitica* isolati da 26 campioni (33 ceppi) di carne fresca di suino analizzati nell'ambito del Piano Nazionale Monitoraggio Antibioticoresistenza Dec. 652/2013 e da 6 campioni (11 ceppi) nell'ambito del Controllo Ufficiale

Tabella 30 - Ceppi isolati da carne fresca di suino analizzati nell'ambito del Piano Nazionale Monitoraggio Antibioticoresistenza Dec. 652/2013

Sierogruppo	N. isolati
O5	9
O8	10
Non appartenente ai sierogruppi O1-O2, O3, O5, O8, O9	14

Tabella 31 - Ceppi isolati da campioni nell'ambito del Controllo Ufficiale

Sierogruppo	Carne fresca di suino	Carne macinata di suino	Salsiccia macinata di suino	Preparato di carne bovina	Spiedini di suino e pollo
O5	4	1	1	1	2
Non appartenente ai sierogruppi O1-O2, O3, O5, O8, O9					2