

ANTIBIOTICORESISTENZA DEI PATOGENI BATTERICI DEL SUINO E POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE: LA SITUAZIONE ATTUALE

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE MAIN PATHOGENS OF SWINE AND TERAPEUTIC OPPORTUNITY: THE CURRENT STATE

BASSI PATRIZIA

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)
Bruno Ubertini*

INTRODUZIONE

La resistenza che numerose specie batteriche hanno acquisito negli anni ha portato alla progressiva riduzione delle disponibilità terapeutiche, congiuntamente alla maggior sensibilità che si è sviluppata recentemente nei confronti dell'uso prudente dell'antibiotico, in generale, e delle molecole considerate critiche per l'uomo, in particolare. La necessità di dati sempre più aggiornati ed aggregati, sia per scopo terapeutico che epidemiologico, ha portato alla condivisione da parte di alcuni istituti zooprofilattici sperimentali, nello specifico Lombardia e Emilia Romagna (IZSLER), Venezie (IZSVE) e Umbria e Marche (IZSUM); di metodiche di rilevazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) tramite pannelli di antibiotici comuni che potessero fornire un dato uniforme al veterinario aziendale indipendentemente dalla sede di analisi del campione; parallelamente, il dato confrontabile sul territorio permette di monitorare attentamente la situazione epidemiologica delle resistenze agli antibiotici. I dati del primo anno (2022) di utilizzo dei pannelli armonizzati sono quindi riportati di seguito per i principali agenti eziologici batterici che si incontrano nell'allevamento suinicolo, in modo da fornire una veduta complessiva della situazione attuale.

Materiali e Metodi

I dati di sensibilità dei diversi patogeni indagati alle molecole testate sono stati estrapolati dai database dei tre istituti zooprofilattici sperimentali Lombardia e Emilia Romagna (IZSLER), Venezie (IZSVE) e Umbria e Marche (IZSUM) nell'ambito dell'attività diagnostica operata nell'anno 2022. Le molecole testate fanno parte di pannelli armonizzati utilizzati dai tre istituti che variano per enterobatteri gram negativi, patogeni respiratori gram negativi, patogeni gram positivi setticemici e batteri anaerobi, come riportato in tabella 1.

Tabella 1: pannelli di molecole testate e loro concentrazioni in funzione dei microrganismi isolati. HL (High Level)

Pannello	Eenterobatteri gram negativi	Patogeni respiratori gram negativi	Patogeni gram positivi setticemici
Antibiotici		Concentrazione (µg/ml)	
Aminosidina (paramomicina)	1-32		
Amoxicillina + acido clavulanico	025/012-32/16	0,06/0,03-16/8	025/012-16/8
Ampicillina	0,25-32	0,015-16	0,03-16
Bacitracina			
Cefazolina	0,5-8		0,25-8
Ceftiofur		0,06-8	0,25-8
Clindamicina			0,5-2
Colistina	0,03-8		
Doxiciclina			
Enrofloxacin	0,015-32	0,03-2	0,25-4
Eritromicina			0,03-8
Florfenicolo	1-64	0,25-8	2-8
Flumequina	1-16		
Gentamicina	0,25-32		
Kanamicina +HL	2-32		8-32 + 250-500
Lincomincina			
Oxacillina			0,25-4
Penicillina			0,03-16
Rifampicina			0,06-2
Sulfisoxazolo	128-512		128-512
Spectinomincina		4-128	
Tetraciclina	0,5-16	0,12-16	0,25-16
Tiamulina		8-32	
Tilmicosina		0,25-64	8-32
Tildipirosina		2-16	
Tilosina			
Trimetoprim + sulfonamidi	0,06/1,19-16/304		0,12/2,38-8/152
Tulatromicina		16-128	
Valnemulina			

Ai valori di MIC registrati sono stati attribuiti, dove possibile, il giudizio di Sensibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R), secondo i *breakpoint* ricavati in letteratura nel suino per le diverse associazioni agente eziologico/molecola (CASFM 2014; CASFM 2020; CLSI M100; CLSI VET06; CLSI VET08; EUCAST). Laddove non presenti in letteratura i valori di *breakpoint*, il giudizio viene emesso come “non Valutabile (V)”.

RISULTATI

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP)

Complessivamente sono stati valutati 199 isolati riferibili a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, di cui 80,9% isolati da polmone e 12,6% da visceri non specificati in fase di consegna del

campione. I biotipi isolati erano riferiti a APP biotipo 1 in 101 campioni e biotipo 2 in 13 campioni provenienti da aziende differenti, negli altri casi il biotipo non era specificato. Complessivamente si osserva sensibilità di più del 90% degli isolati di APP testati per ceftiofur, gamitromicina, tiamulina, tildipirosina, tilmicosina, trimetoprim + sulfonamidi e tulatromicina (figura 1), mentre le resistenze maggiori, sopra il 20% di isolati resistenti, si registrano per amoxicillina con acido clavulanico, kanamicina e tetraciclina (figura 1). In riferimento al biotipo, si osserva come per il biotipo 2 si siano registrate maggiori resistenze verso amoxicillina con acido clavulanico, ampicillina e tetraciclina rispetto al biotipo 1 (figura 2). In tabella 2a e 2 b sono riportati i dati relativi a tutti gli antibiotici per gli isolati di APP suddivisi anche in funzione del biotipo.

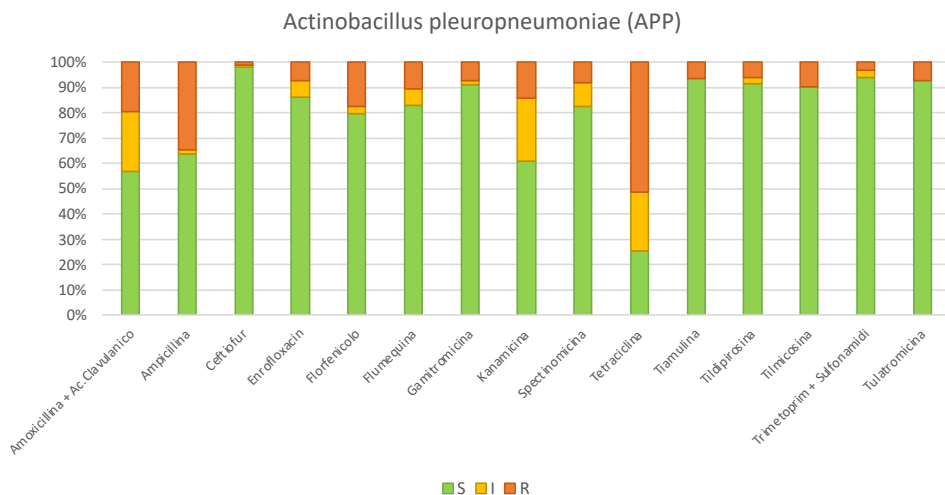


Figura 1: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

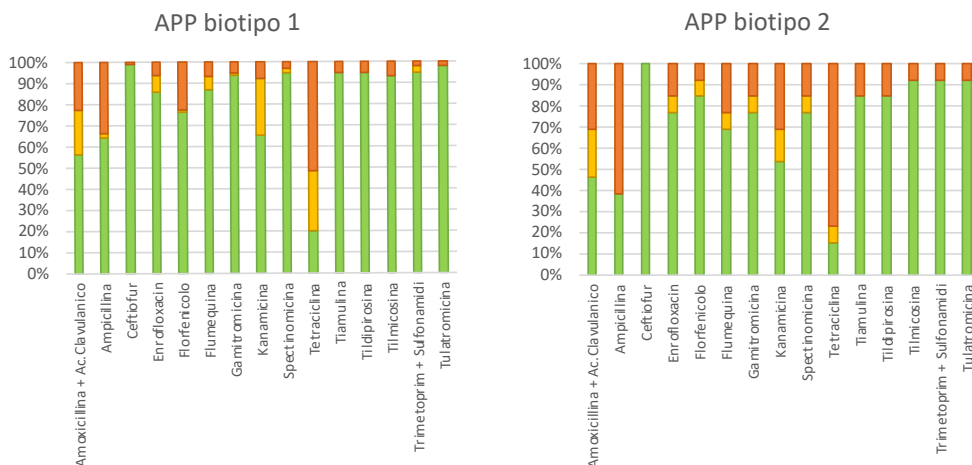


Figura 2: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) biotipo 1 e 2. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso.

Tabella 2a: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP).

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	56.8	23.6	19.6	199
Ampicillina	63.8	1.5	34.7	199
Ceftiofur	98	1	1	199
Enrofloxacin	86.4	6.5	7	199
Florfenicolo	79.9	2.5	17.6	199
Flumequina	82.9	6.5	10.6	199
Gamitromicina	91	2	7	199
Kanamicina	61.1	24.7	14.1	198
Spectinomocina	82.4	9.5	8	199
Tetraciclina	25.6	23.1	51.3	199
Tiamulina	93.5	0	6.5	199
Tildipirosina	91.5	2.5	6	199
Tilmicosina	90.5	0	9.5	199
Trimetoprim + Sulfonamidi	93.9	3.1	3.1	163
Tulatromicina	93	0	7	199

Tabella 2b: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) biotipo 1 e 2.

Antibiotico	Sensibile		Intermedio		Resistente	
	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 1	Biotipo 2
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	56.4	46.2	20.8	23.8	22.8	30.8
Ampicillina	64.4	38.5	2	0	33.7	61.5
Ceftiofur	99	100	0	0	1	00
Enrofloxacin	86.1	76.9	7.9	7.7	5.9	15.4
Florfenicolo	76.2	84.6	1	7.79	22.8	7.7
Flumequina	87.1	69.2	5.9	7.7	6.9	23,8
Gamitromicina	94.1	76.9	1	7.7	5	15.4
Kanamicina	65.3	53.8	26.7	15.4	7.9	30.8
Spectinomocina	95	76.9	2	7.7	3	15.4
Tetraciclina	19.8	15.4	28.7	7.7	51.5	76.9
Tiamulina	95	84.6	0	0	5	15.4
Tildipirosina	95	84.6	0	0	5	15.4
Tilmicosina	93.1	92.3	0	0	6.9	7.7
Trimetoprim + Sulfonamidi	95	92.3	3	0	2	7.7
Tulatromicina	98	92.3	0	0	2	7.7

Streptococcus suis

Sono stati sottoposti a test di sensibilità 442 isolati riferibili a *Streptococcus suis*, provenienti da matrici differenti: carcassa (37,4%), polmone (26,5%), visceri non specificati (17,1%) e cervello (12%). L'identificazione del sierotipo tramite metodica molecolare di PCR che permette di identificare i sierotipi 1,2,7 e 9 (Silva *et al.*, 2006), quando richiesta (184 isolati), ha evidenziato la presenza di 9 isolati di sierotipo 1, 72 isolati di sierotipo 2, 21 isolati di sierotipo 7 e 82 isolati di sierotipo 9. L'analisi degli esiti delle MIC effettuate è riportata in tabella 3 e figura 3 per tutti gli isolati di *Streptococcus suis*, mentre gli esiti specifici rilevati nei diversi sierotipi sono riportati in tabella 4 (a-b-c-d) e figura 4 (a-b-c-d).

Tabella 3: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	88	5.4	6.6	392
Ampicillina	94.3	3.4	2.3	440
Cefazolina	93.7	2.3	4.1	394
Ceftiofur	95.7	1.4	2.9	442
Clindamicina	12.2	58.9	28.9	394
Enrofloxacin	80.7	15	4.3	440
Eritromicina	18.1	0	81.9	393
Florfenicolo	92.7	3.4	3.9	440
Kanamicina	91.2	0	8.8	352
Kanamicina alta resistenza	78.3	0	21.7	83
Oxacillina	95.9	0	4.1	364
Penicillina	67.7	19.4	13	439
Rifampicina	85	11.7	3.3	393
Tetraciclina	1.1	2.5	96.4	442
Trimetoprim + Sulfonamidi	69.8	18.8	11.4	367

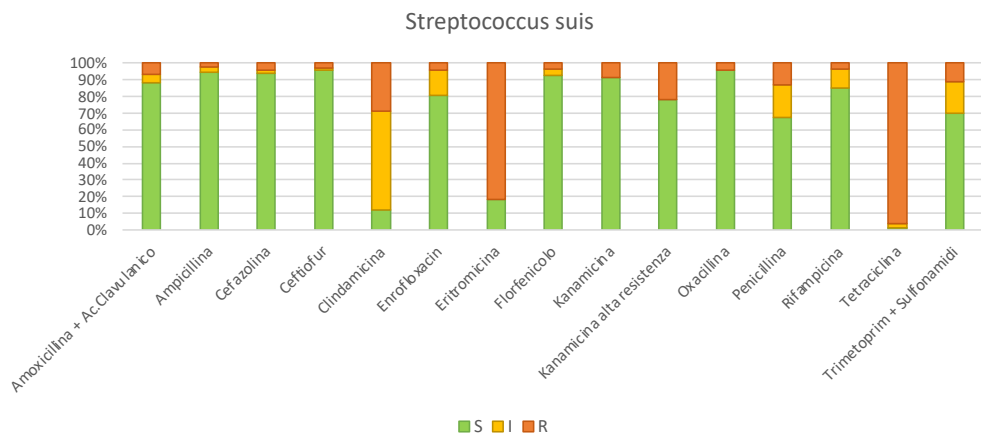


Figura 3: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Come riportato, la maggior parte degli isolati di *S. suis* risulta suscettibile alla penicillina (67,7%) e all'ampicillina (94,3%), mentre tetraciclina ed eritromicina mostrano i maggiori tassi di resistenza (rispettivamente 96,4% e 81,7%). L'elevata percentuale di isolati che hanno mostrato di essere sensibili a aumentate dosi di clindamicina (intermedi) sono da imputare ad un limite tecnico legato alla concentrazione massima di clindamicina in piastra (2 µg/ml) che è pari al valore di *breakpoint* considerato come intermedio. Non potendo testare quindi concentrazioni aggiuntive, la maggior parte degli intermedi potrebbero essere ascritti alla categoria dei resistenti.

Tabella 4: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis* in funzione del sierotipo testato (1,2,7,9).

Antibiotico	Sensibile				Intermedio				Resistente			
	1	2	7	9	1	2	7	9	1	2	7	9
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	100	98.6	90.5	84	0	0	0	7.4	0	1.4	9.5	8.6
Ampicillina	100	98.6	95	90.2	0	0	0	7.3	0	1.4	5.0	2.4
Cefazolina	100	100	90.5	91.5	0	0	4.8	3.7	0	0	4.8	4.9
Ceftiofur	100	97.2	95.2	96.3	0	0	0	1.2	0	2.8	4.8	2.4
Clindamicina	44.4	13.9	0	4.9	33.3	54.2	81	51.2	22.2	31.9	19.0	43.9
Enrofloxacin	100	88.9	95	89	0	11.1	5	7.3	0	0	0	3.7
Eritromicina	44.4	22.2	4.8	3.7	0	0	0	0	55.6	77.8	95.2	96.3
Florfenicolo	88.9	95.8	85.7	96.3	11.1	2.8	9.5	3.7	0	1.4	4.8	0
Kanamicina	100	93.1	95.2	90.2	0	0	0	0	0	6.9	4.8	9.8
Oxacillina	100	100	95.2	89.9	0	0	0	0	0	0	4.8	10.1
Penicillina	100	97.2	90	41.5	0	1.4	0	41.5	0	1.4	10	17.1
Rifampicina	77.8	87.5	90.5	80.5	22.2	12.5	4.8	14.6	0	0	4.8	4.9
Tetraciclina	0	0	0	0	0	1.4	0	2.4	100	98.6	100	97.6
Trimetoprim + Sulfonamidi	100	95.6	89.5	48.6	0	4.4	5.3	43.2	0	0	5.3	8.1

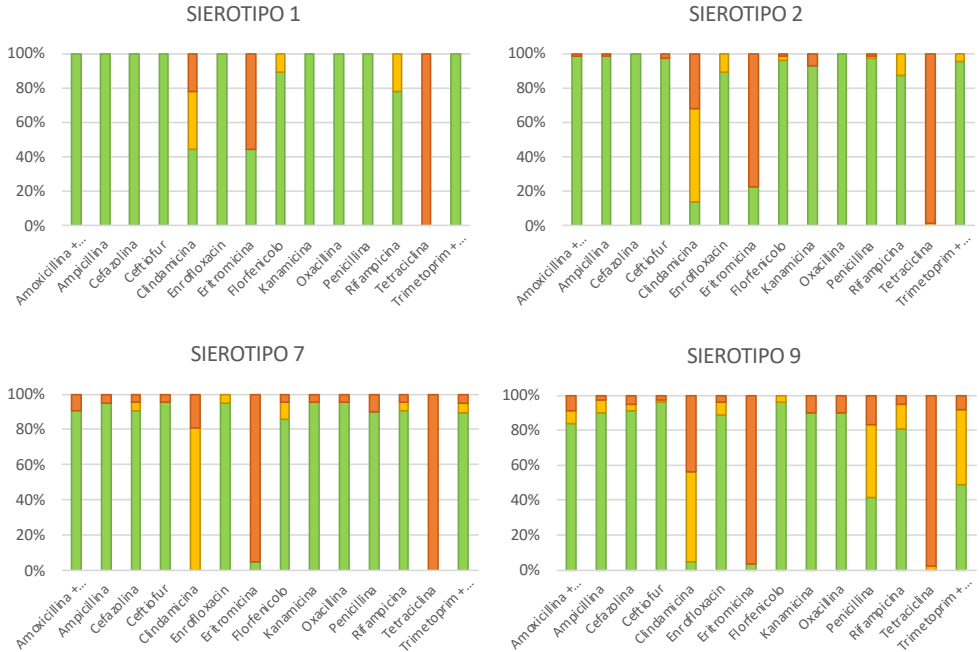


Figura 4: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis* sierotipi 1,2,7 e 9. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso.

Dalla valutazione delle sensibilità di *S. suis* in funzione del sierotipo rilevato si nota come, per il sierotipo 9, si riduca sensibilmente la percentuale di isolati suscettibili alla penicillina (41,5% vs >90 % negli altri sierotipi), in misura minore anche per altri beta lattamici (ampicillina e amoxicillina in associazione ad acido clavulanico) (tabella 4 e figura 4). Differenze notevoli si osservano anche per l'associazione trimetoprim potenziata con sulfamidico (48,6% di suscettibili al sierotipo 9 vs > 80% per gli altri sierotipi) (tabella 4 e figura 4).

Pasteurella multocida

Gli isolati di *Pasteurella multocida* analizzati (n. 112) provenivano principalmente da polmone (48,2%), visceri non definiti (18,8%) e tamponi respiratori (17%). *Pasteurella multocida* mantiene buoni livelli di sensibilità per la maggior parte delle molecole testate, si nota ridotta sensibilità per tetraciclina (50,5%) e tiamulina (66,7%), come si nota in tabella 5 e figura 5.

Tabella 5: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Pasteurella multocida*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Acido clavulanico	87.39	5.41	7.21	111
Ampicillina 92.8		0.9	6.3	111
Ceftiofur	97.3	0	2.7	111
Enrofloxacin	97.3	0	2.7	110
Florfenicolo	97.3	0.9	1.8	111
Flumequina	96.4	1.8	1.8	112
Gamitromicina	96.4	0.9	2.7	112
Kanamicina	85.7	5.4	8.9	112
Spectinomina	82.1	4.5	13.4	112
Tetraciclina	50.5	6.3	43.2	111
Tiamulina	66.7	0	33.3	111
Tildipirosina	92.9	0	7.1	112
Tilmicosina	92.7	0	7.3	110
Trimetoprim + Sulfonamidi	82	6.3	11.7	111
Tulatromicina	95.5	1.8	2.7	112

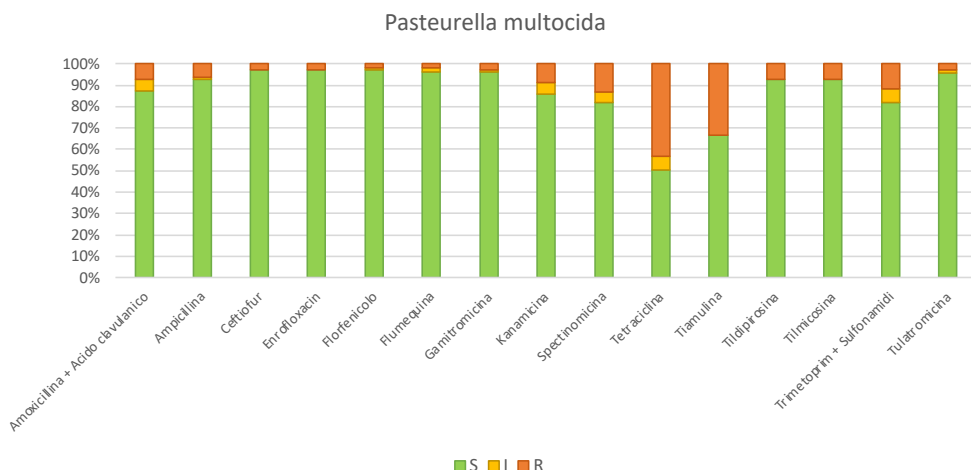


Figura 5: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Pasteurella multocida*. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso.
Escherichia coli

Complessivamente sono stati testati 2244 isolati di *Escherichia coli* provenienti prevalentemente da carcasse (30,7%), feci (28,6%) intestino (17,5%) o tampone rettale (5,5%), oppure isolati da visceri (6%). Gli isolati testati hanno mostrato elevato grado di resistenza ad ampicillina (88%), sulfisoxazolo (81,5%) e tetraciclina (81,3%), come si vede in Tabella 6 e Figura 6. Alcuni isolati sono stati sottoposti a ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità per *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) tramite multiplex *Polimerase Chain Reaction* (PCR) per geni codificanti le adesine F4 (k88), F5 (k99), F6 (987p) e F18 e le tossine LT I, STaP, STb e Stx2e, utilizzando i *primers* riportati da Casey & Bosworth (2009). Viene inteso come ETEC un isolato in grado di codificare per un'adesina e una tossina contemporaneamente. Tra gli isolati testati, 527 sono stati identificati come ETEC, di cui 313 con fimbria (F) F18 e 175 F4. I risultati dei test di sensibilità sono stati messi in relazione anche con i risultati della ricerca di geni ETEC, come si nota in Tabella 7 e Figura 7.

Tabella 6: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Aminosidina	60.7	2.2	37.1	2231
Amoxicillina + Acido clavulanico	63.1	21.6	15.3	2239
Ampicillina	11.9	0.1	88	2236
Cefazolina	21.6	32.4	46	2243
Cefotaxime	82	0	18	2238
Colistina	90.5	0	9.5	2238
Enrofloxacin	49.4	25.3	25.4	2239
Florfenicolo	21.4	18.9	59.7	2239
Flumequina	55.8	14.1	30	2244
Gentamicina	49	3.4	47.6	2241
Kanamicina	58.2	4.1	37.7	2242
Sulfisoxazolo	18.5	0	81.5	2231
Tetraciclina	17.6	1.1	81.3	2242
Trimetoprim + Sulfonamidi	33.5	0	66.5	2241

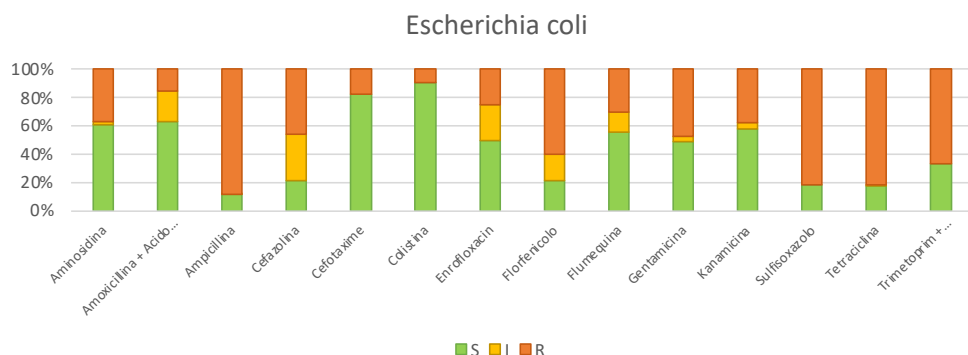


FIGURA 6: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

TABELLA 7: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli* in funzione della presenza di geni codificanti per fattori di patogenicità ETEC.

Antibiotico	Sensibile			Intermedio			Resistente		
	ETEC	F18	F4	ETEC	F18	F4	ETEC	F18	F4
Aminosidina	42.4	41.5	43.9	3.1	3.2	2.3	54.5	55.3	53.8
Amoxicillina + Acido clavulanico	52	54.5	47.7	25.9	25	25.9	22.1	20.5	26.4
Ampicillina	5.3	4.8	4.6	0.2	0.3	0	94.5	94.9	95.4
Cefazolina	16.9	19.5	13.2	24.9	24.9	24.7	58.2	55.6	62.1
Cefotaxime	73.3	75.7	71.7	0	0	0	26.7	24.3	28.3
Colistina	86.1	86.9	85.1	0	0	0	13.9	13.1	14.9
Enrofloxacin	35.4	40.9	26.4	32.7	36.7	26.4	31.9	22.4	47.1
Florfenicolo	12	13.5	9.8	11.8	5.8	20.1	76.1	80.8	70.1
Flumequina	39	38.8	39.4	23	30.4	14.3	38	30.8	46.3
Gentamicina	22.8	16.3	29.9	5.1	7.7	1.7	71.9	76	68.4
Kanamicina	38.7	39	37.1	5.5	5.8	5.7	55.8	55.3	57.1
Sulfisoxazolo	12.2	9.9	15.9	0	0	0	87.8	90.1	84.1
Tetraciclina	11.2	12.5	10.4	1.1	1.9	0	87.6	85.6	89.6
Trimetoprim + Sulfonamidi	25.4	21.6	29.7	0	0	0	74.6	78.4	70.3

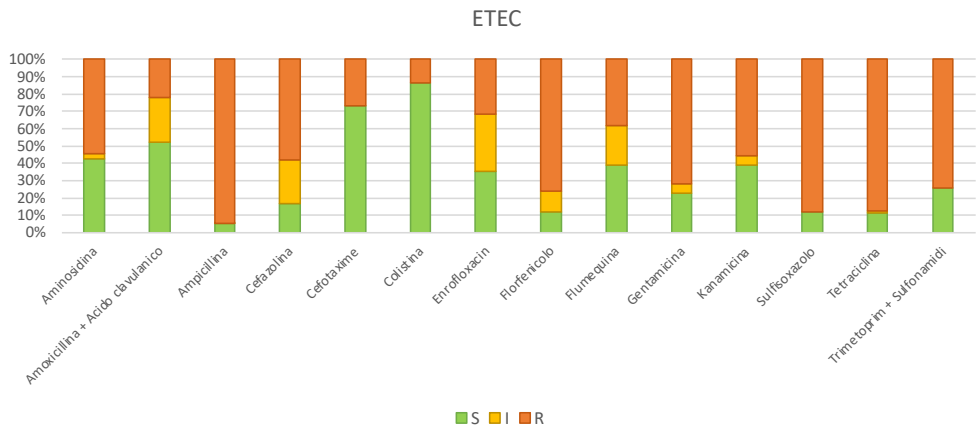


FIGURA 7a: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC). S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

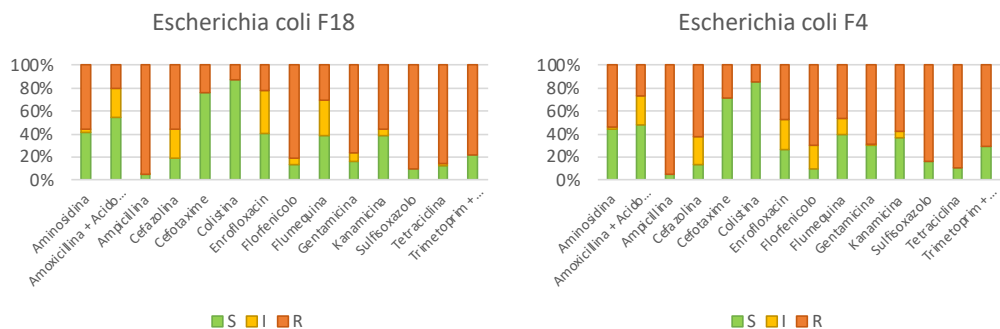


FIGURA 7b: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli* F18 e F4. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Salmonella

È stata valutata la sensibilità di 81 isolati di *Salmonella* spp. . Sono emersi elevati livelli di resistenza nei confronti di ampicillina (85,2%), enrofloxacin (84%), sulfisoxazolo (86,8%) e tetraciclina (74,1%) (Tabella e figura 8). Al contrario, le maggiori sensibilità sono state registrate per aminosidina (90,1%), amoxicillina protetta con acido clavulanico (80,2) e colistina (98,8%). La sierotipizzazione degli isolati di *Salmonella* ha permesso di identificare 63 isolati di *Salmonella choleraesuis* e 5 isolati di *Salmonella typhimurium* variante monofasica, i cui risultati di sensibilità alle molecole testate sono riportati in tabella e figura 9.

TABELLA 8: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Aminosidina	90.1	1.2	8.6	81
Amoxicillina + Acido clavulanico	80.2	16	3.7	81
Ampicillina	13.8	0	86.3	80
Cefotaxime	95.1	0	4.9	81
Colistina	98.8	0	1.2	81
Enrofloxacin	16	0	84	81
Florfenicolo	35.8	4.9	59.3	81
Flumequina	46.9	14.8	38.3	81
Sulfisoxazolo	13.2	0	86.8	76
Tetraciclina	24.7	1.2	74.1	81
Trimetoprim + Sulfonamidi	44.7	0	55.3	76

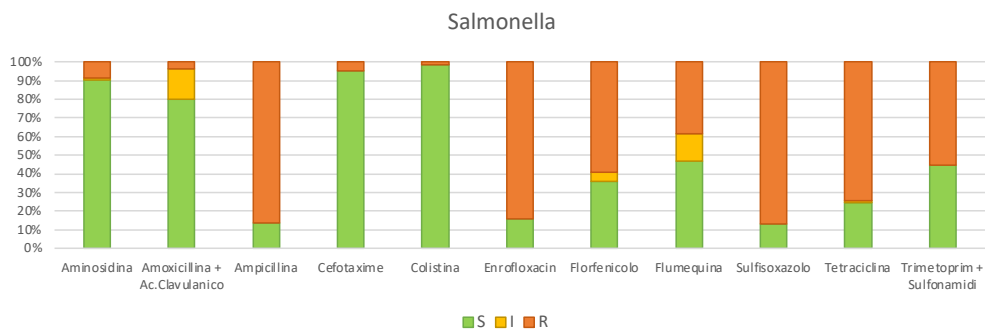


FIGURA 8: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

TABELLA 9: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella choleraesuis* (SC) e typhimurium variante monofasica (STM).

Antibiotico	Sensibile		Intermedio		Resistente	
	SC	STM	SC	STM	SC	STM
Aminosidina	93.7	60	1.6	0	4.8	40
Amoxicillina + Acido clavulanico	84.1	40	15.9	20	0	40
Ampicillina	12.9	0	0	0	87.1	100
Cefotaxime	96.8	100	0	0	3.2	0
Colistina	98.4	100	0	0	1.6	0
Enrofloxacin	12.7	60	0	0	87.3	40
Florfenicolo	36.5	20	3.2	20	60.3	60
Flumequina	44.4	60	17.5	0	38.1	40
Sulfisoxazolo	13.1	0	0	0	86.9	100
Tetraciclina	25.4	0	0	0	74.6	100
Trimetoprim + Sulfonamidi	45.9	40	0	0	54.1	60

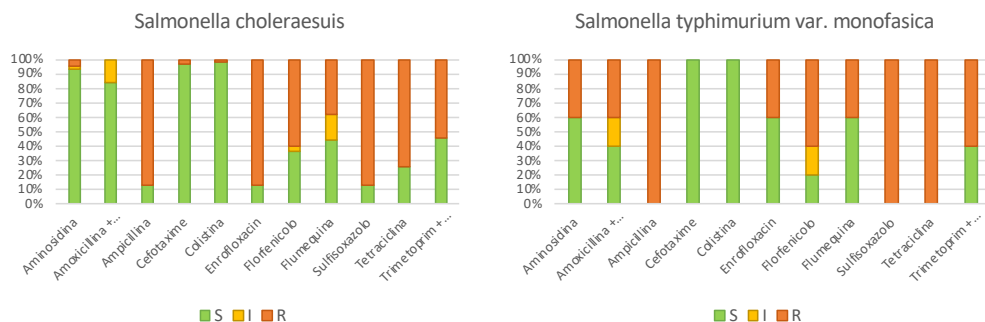


FIGURA 9: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella choleraesuis* e *typhimurium* variante monofasica. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Come si può notare dai risultati riportati in tabella 9 e figura 9, la sensibilità degli isolati di *S. choleraesuis* è maggiore per le molecole aminosidina (93,7% vs 6+0%) e amoxicillina associata ad acido clavulanico (84,1% vs 40%) rispetto a *S. typhimurium* var. monofasica, che invece si mostra più sensibile a flumequina (60% vs 44,4%) e enrofloxacin (60% vs 12,7%).

BIBLIOGRAFIA

- Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) “Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine”. J Vet Diagn Invest. 21(1):25-30.
- Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) Recommandations 2014
- Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) Recommandations Vétérinaires 2020
- CLSI_M100, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing, 29th Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2019.
- CLSI_VET_06, Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious Bacteria Isolated From Animals, 1st Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2017.
- CLSI_VET_08, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
- EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2021.
- Silva L.M.G., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P (2006) “Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR”. Vet Microbiol 115(1-3):117-127.