

資料

我が国の豚群に分布する非定型 *Salmonella* Typhimurium 流行系統の特徴

新井 暢 夫

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌グループ)
Arai, N. (2026). Phylogenetic characterization of dominant clade of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant isolated from swine in Japan.
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 87, 24-31.

キーワード： *Salmonella* Typhimurium、非定型株、流行系統、薬剤耐性、重金属抵抗性

1. はじめに

家畜のサルモネラ症は、我が国の養豚、酪農、肉牛生産における主要な損耗要因の一つであり、適切な制御が求められている。サルモネラ属菌はグラム陰性通性嫌気性桿菌であり、*Salmonella enterica* と *Salmonella bongori* の2菌種からなる。さらに *Salmonella enterica* は6種の亜種から構成される。また、サルモネラ属菌は菌体 (O) 抗原と鞭毛 (H) 抗原の組み合わせにより血清型が決定され、これまでに2,600以上の血清型が報告されている^{15,19)}。中でも、血清型 Typhimurium (*S. Typhimurium*、抗原構造 4i:1,2) が我が国の家畜のサルモネラ症において高頻度に分離される。さらに近年では、2相H抗原を発現できない非定型 *S. Typhimurium* (抗原構造 4i:-) によるサルモネラ症が増加している^{17,18)}。我が国での非定型 *S. Typhimurium* の広がりに先立ち、ヨーロッパの豚におけるサルモネラ症、及び豚肉やその加工品を原因とした食中毒事例が2000年代より顕在化してきた^{7,8,13,25)}。このような事例の多くは、multilocus sequence typing により sequence type 34 (ST34) に型別される特定のクローンによる発生であった。一方で、我が国に分布する非定型 *S. Typhimurium* の遺伝的背景、すなわち *S. Typhimurium* や海外株との遺伝的関係性は不明であった。そこで著者らは、我が国の幅広い地域、動物種より *S. Typhimurium* と非定型 *S. Typhimurium* を収集後、さらにヨーロッパ株を加えて、菌の全ゲノム情報に基づく分子系統解析 (全ゲノム系統解析) により、*S. Typhimurium* と非定型 *S. Typhimurium* が9つの遺伝系統 (クレード) に区別されることを明らかにした²⁾。このうち、クレード9

はST34のヨーロッパ株と日本株から構成され、多剤耐性 (ASSuT、アンピシリン、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリン) を示した。これらの特徴はヨーロッパで流行中のクローンに合致することから、当該クローンが我が国の家畜にも分布していることが明らかとなった。本稿では、ST34非定型 *S. Typhimurium* の世界的な分布状況と本クローンが特異的に保有する遺伝因子の機能について紹介する。

2. ST34 非定型 *S. Typhimurium* の分布状況

(1) 世界的な分布状況

S. Typhimurium と非定型 *S. Typhimurium* は抗原構造が異なるため、抗原構造表に基づく両者は別の血清型として取り扱われる。しかし、菌の全ゲノム情報を用いた分子系統解析により、これまでに分離されてきた4i:-は、基本的に *S. Typhimurium* の単相変異株 (非定型株) と考えるのが妥当である。先行研究によると、非定型 *S. Typhimurium* には世界的にいくつかのクローンが報告されており、特に“Spanish clone”^{21,31)} と“European clone”²⁷⁾ が主要なクローンである。Spanish cloneは1997年に分離された後、ヨーロッパ諸国とアメリカ合衆国に広まった^{21,31)}。本クローンの特徴として、ST19、ファージ型U302、多剤耐性株であることが挙げられる。なお、本クローンの薬剤耐性は、アンピシリン、クロラムフェニコール、サルファ剤、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、トリメトプリムに対する各薬剤耐性遺伝子を搭載したIncA/Cプラスミドを保有することに由来する。

European cloneは1990年代後半から分離され始め、その後ヨーロッパ諸国へ広まった²⁷⁾。本クローンの特徴として、ST34であることのほか、複数の薬剤耐性遺伝子が搭載された複合トランスポゾンを保

有することが挙げられる。複合トランスポゾンには、薬剤耐性遺伝子として *bla*_{TEM-1B}、*strA*、*strB*、*sul2*、*tet(B)* が含まれており、ST34 非定型 *S. Typhimurium* の多くは ASSuT の耐性パターンを示す。また、本来 2 相 H 抗原遺伝子 (*fliB*) が存在するはずの領域が複合トランスポゾンに置き換わっており、本因子は *S. Typhimurium* の非定型化 (単相変異) に何らかの影響を与えていると予想されている (図 1)¹⁴⁾。加えて、銅及びヒ素抵抗性遺伝子が搭載された約 81 kb のゲノミックアイランドを染色体上に保有することも本クローンを特徴づける重要な点である (図 2)。ヨーロッパでは、本クローンを原因とする豚のサルモネラ症、及び豚肉やその加工品を原因とした食中毒事例が 2000 年代初頭から相次いで報告されるようになった^{7,8,13,25)}。その後、北アメリカ¹²⁾、南アメリカ³²⁾、ア

ジア²²⁾、オセアニア⁶⁾、アフリカ¹⁾ といったように世界各地の豚及びヒトから分離されるようになり、家畜衛生と公衆衛生の両面から注視すべきクローンとなっている。また、本クローンが系統特異的に保有する複合トランスポゾン内の薬剤耐性遺伝子に加えて、拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*_{CTX-M-55})、コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-3.1*)、プラスミド性キノロン耐性遺伝子 (*qnrS1*) などを搭載したプラスミドを獲得した菌株が分離されるなど、本クローンは更なる進化を続けている¹⁰⁾。

(2) 日本での分布状況

このような中、著者らの研究グループは *S. Typhimurium* と非定型 *S. Typhimurium* における各クレード特異的な一塩基多型 (SNP) を検出する

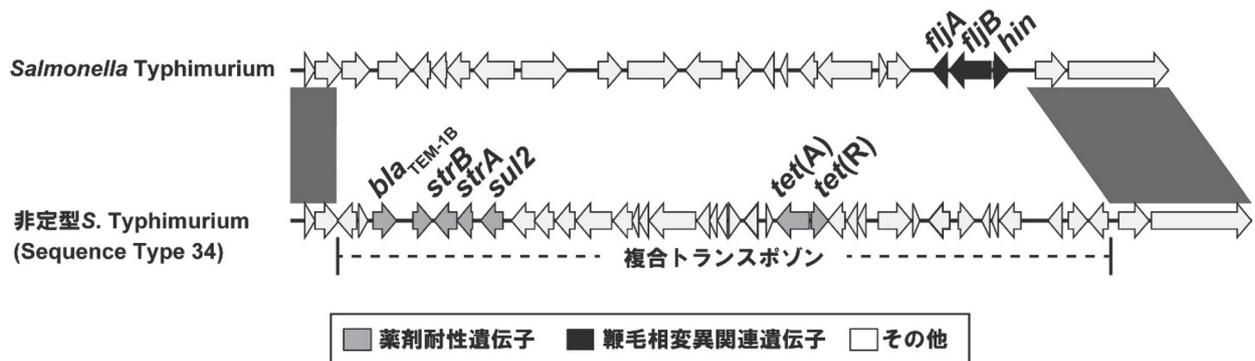


図 1 *S. Typhimurium* および ST34 非定型 *S. Typhimurium* の 2 相 H 抗原遺伝子周辺の構造比較

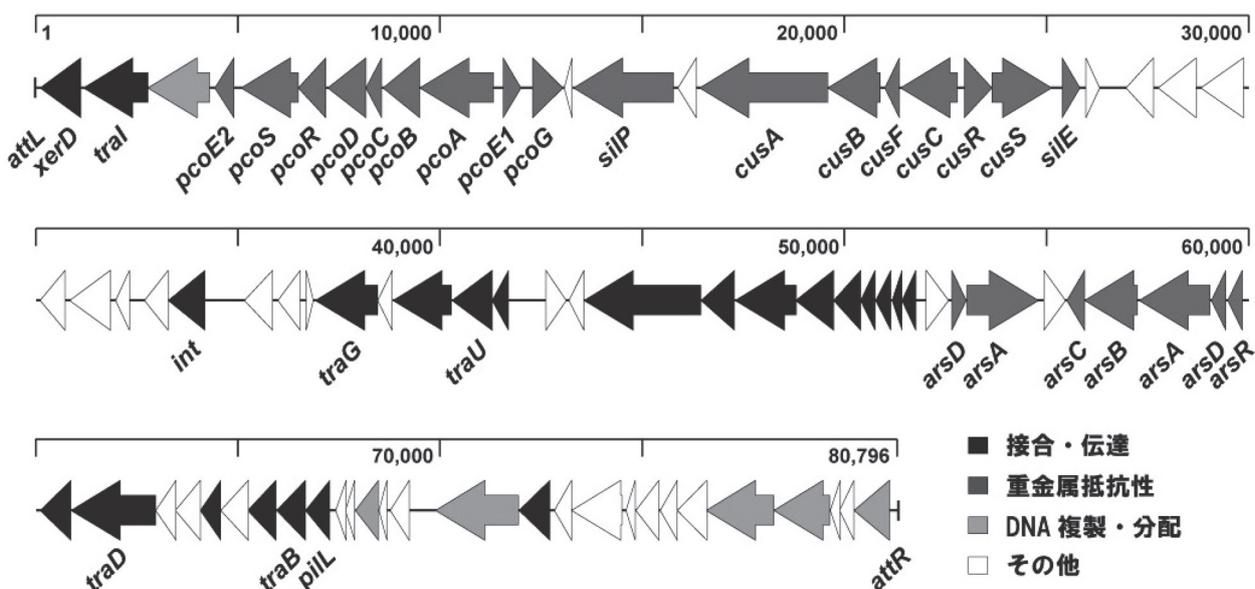


図 2 ICEmST の遺伝子構造
引用文献 4 の Fig 1 を改変。

PCR系を構築した²⁾。本法を過去40年間に我が国の牛及び豚由来株に適用したところ、European cloneに相当するSNP9型が2012年以降に最優勢の遺伝子型となっていることが明らかとなった。ヨーロッパをはじめ、ST34非定型*S. Typhimurium*は主に豚とヒトを中心に分離報告されているが、豚のみならず牛でも優勢遺伝子型となっていることが我が国の特徴である。また、菌の全ゲノム塩基配列情報を比較すると、牛由来株と豚由来株ではほぼ同一と判定される例もあり、異なる動物種間で伝播している可能性が考えられる。このため、地域内のサルモネラ症の発生防止に向けて、動物種を超えた関係者間の情報共有が重要であると考えられる。

全ゲノム情報に基づいて、我が国の家畜に分布するST34/SNP9型株の遺伝的多様性を調べると、本系統には2つのサブクレードが存在することが明らかとなった³⁾。サブクレード間の差異として、プロファージの保有状況、2相H抗原周辺の遺伝子構造が異なっていることが挙げられる。これらの違いが菌の性状に与える影響については不明であり、さらなる解析が必要である。また、ST34/SNP9型株はASSuTの耐性パターンを基本とするが、クロラムフェニコール、トリメトプリム耐性を加えたASSuTCTmの耐性パターンを示す菌株が増加傾向にある。具体的には、国内分離ST34/SNP9型計214株において、ASSuTCTmを示す菌株の割合は2014年以前では2.6%であったのに対して、2015年以降26%となった。これらは、クロラムフェニコール耐性遺伝子：*floR*、*cmlA1*、トリメトプリム耐性遺伝子：*dfxA12*を搭載したIncFIあるいはIncHI型プラスミドを獲得したことに由来する。加えて、家畜衛生及び公衆衛生の両面から重要視されているプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5*)を保有する菌株が分離されるなど、ST34/SNP9型株の薬剤感受性の動向には今後も注視する必要がある。

3. ST34 特異的遺伝因子の機能

(1) ICEmST の遺伝構造と伝達性

上述の通り、ST34の多くは複合トランスポゾン及びプラスミド上の複数の薬剤耐性遺伝子に由来する多剤耐性株であり、本遺伝子型の世界的流行の一助になったと考えられる。一方で、しばしば*S. Typhimurium*において多剤耐性系統は発生するが、世界的に拡散した例は限られている。著者らは、本

クローンの世界的拡散の背景に更なる要因がある可能性を考え、ST34特異的遺伝因子であるICEmSTに着目した。ICEmSTは両端に55bpのダイレクトリピートを持ち、内部に菌の接合・伝達、銅やヒ素といった重金属への抵抗性への関与が疑われる遺伝子群が存在する(図2)。本因子は、もともと*Salmonella* genomic island 3 (SGI-3)として報告されたが²⁷⁾、先行研究でSGI-3という名称が使用されていることが後に分かり²⁴⁾、著者らは非定型*S. Typhimurium* (monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium)が保有するintegrative and conjugative element (ICE)として、ICEmSTという呼称を提唱した³⁾。

ICEはプラスミドなどのように遺伝子の水平伝播に寄与する可動性遺伝因子の一つである²⁰⁾。本因子は宿主細菌の染色体上に存在し、時に染色体より切り出され、中間環状体を形成する。続いて、自身にコードされるリラクターゼにより2本鎖がほどかれつつ、IV型分泌装置を介した接合伝達によってレシピエント細菌へ送り込まれる。その後、相補鎖が合成され2本鎖環状DNAが形成されたのち、レシピエント染色体に挿入される。これまでにICEは、大腸菌、*Vibrio*属菌、*Bacillus*属菌、*Streptococcus*属菌といったグラム陰性、陽性細菌それぞれから数多く報告されている¹¹⁾。ICEの内部に搭載される遺伝子は“積み荷”と呼ばれ、積み荷遺伝子として薬剤耐性遺伝子のほか、バイオフィルム形成能、土壌汚染物質であるクロロカテコールといった難分解性化学物質の分解を規定する遺伝子などが報告されている^{9,16,29)}。

著者らはST34特異的遺伝因子がICE様の遺伝子構造であることに着目し、その伝達性をフィルター法により検討した⁴⁾。その結果、宿主染色体からの切り出し、中間環状体の形成、レシピエント細菌染色体への挿入が確認でき、著者らは本因子をICEであると結論付けた(図3)。また、本因子は*S. Typhimurium*と非定型*S. Typhimurium*のみならず、血清型Thompson、Hadar、Newportなどにも伝播することが確認された。親株のヒ酸水素二ナトリウムに対する最小発育阻止濃度(MIC)が0.25未満~0.5 µg/mLであるのに対して、ICEmST伝達株のMICは64 µg/mL以上まで上昇した。また、嫌気条件下における硫酸銅に対して、伝達株では親株と比較して、6倍程度のMICの上昇が観察された。このことから、ICEmSTは宿主細菌の銅及びヒ素抵抗性を増強させることが明らかとなった。

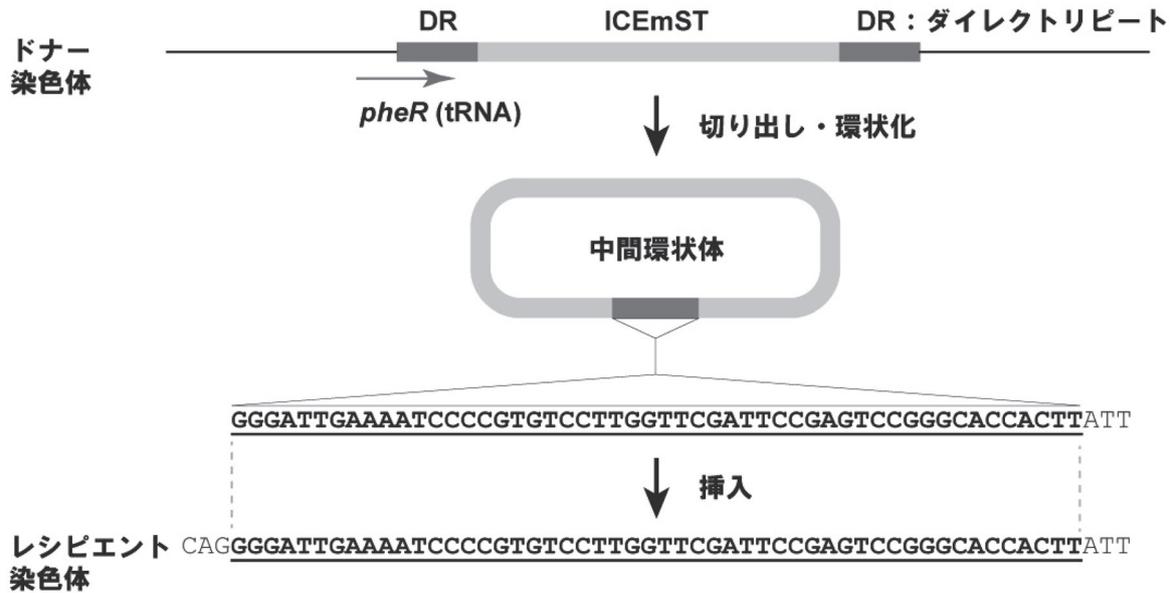


図3 ICEmST の伝達機構

さらに、ICEmST には *cus* 遺伝子群、*pco* 遺伝子群という2つの銅抵抗性への関与が疑われる遺伝子群が存在する。*Cus* 遺伝子群は6つの遺伝子(*cusCFBA-RS*)で構成されており、菌体内及びペリプラズムに存在する銅イオンの外界への排出に寄与する²⁸⁾。*Pco* 遺伝子群は9つの遺伝子 (*pcoABCDEIE2G-RS*) からなり、ペリプラズムにおける銅イオンの毒性を減弱させる機能を有する³⁰⁾。特に *Cus* システムは、嫌気条件における銅抵抗性への関与が大腸菌で報告されている²⁶⁾。著者らは、遺伝子組換え技術により ICEmST 保有株から *cus* 遺伝子群、*pco* 遺伝子群を人為的に欠失させた菌株を作出し、親株との硫酸銅に対する感受性を比較した。その結果、*cus* 遺伝子群欠失株でのみ、嫌気条件における顕著な感受性の増加、すなわち抵抗性の減弱が認められた。このため、ICEmST が与える銅抵抗性は *cus* 遺伝子群に由来することが明らかとなった。

(2) 養豚における銅の使用状況

家畜の飼料中には、主に成長促進と抗菌作用を目的として銅や亜鉛などの微量重金属が含まれている。薬剤耐性菌制御におけるワンヘルスアプローチの観点から、家畜生産の現場での抗菌薬の使用低減が求められている。このような背景の中、銅は特に離乳期豚での下痢予防における抗菌薬の代替物として期待されている。一方で、重金属の多給は中毒や、糞便及び堆肥など周辺の土壌環境の汚染につながるなどから、上限濃度が設定されている場合がある。日本では、関係

団体の自主規制値として、豚の発育ステージごとに銅濃度の上限値が設定されており、離乳期豚で 125 ppm と最も高い。欧州連合 (EU) では同じく離乳期の豚飼料中の硫酸銅濃度の上限を 150 ppm と定めている³³⁾。また、飼料中の銅は豚糞便中では濃縮される可能性が指摘されており、結果として細菌に選択圧を与えることになると考えられている²³⁾。

(3) サルモネラの腸管定着性に与える影響

著者らは、ICEmST を保有する ST34 非定型 *S. Typhimurium* が抗菌薬のみならず、銅によっても選択されてきたと仮説を立て、図4で示す試験を実施した⁵⁾。本試験では、EUでの銅濃度上限値を参考にして、硫酸銅濃度 150 ppm に調製した飼料を離乳期 (導入時3週齢) の SPF ランドレースに3週間給餌した。2週間の馴致期間の後、非感染群には PBS (-)、感染群として ICEmST 非保有株 : L-3569、ICEmST 伝達株 : L-3569TC を 10⁹ CFU/頭で経口投与して7日間経過観察した。試験中、糞便中での排菌数と銅濃度、血清中炎症マーカーの推移を調べた。まず、サルモネラ投与2日後から 40℃ を超える発熱、軟便、下痢が観察され、本試験においてサルモネラ症が発症したものと考えられた。また、下痢スコア (通常 : 0、軟便 : 1、下痢 : 2、水様性下痢 : 3) の推移を調べると、L-3569株投与群では感染5日後には全頭で症状が終息したが、L-3569TC株投与群では試験終了まで軟便を呈する個体が存在した。

	非感染群	病豚由来S. Typhimurium L-3569株投与群	L-3569TC株投与群
投与菌の特徴	—	ICEmST非保有株	ICEmST保有株
硫酸銅に対するMIC ppm [mM]	—	250 [1]	1,500 [6]
頭数 (SPFランドレース)			

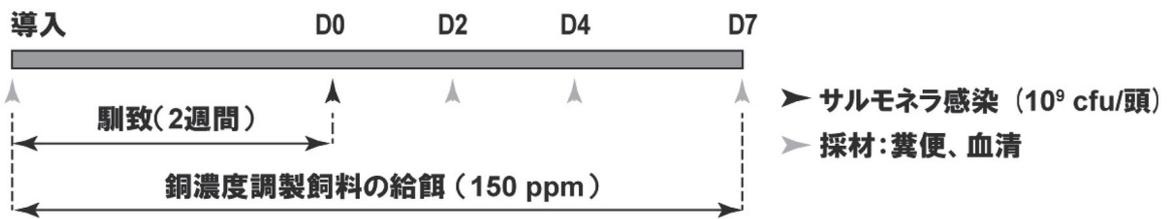


図4 銅給餌豚へのサルモネラ感染実験の概要とスケジュール

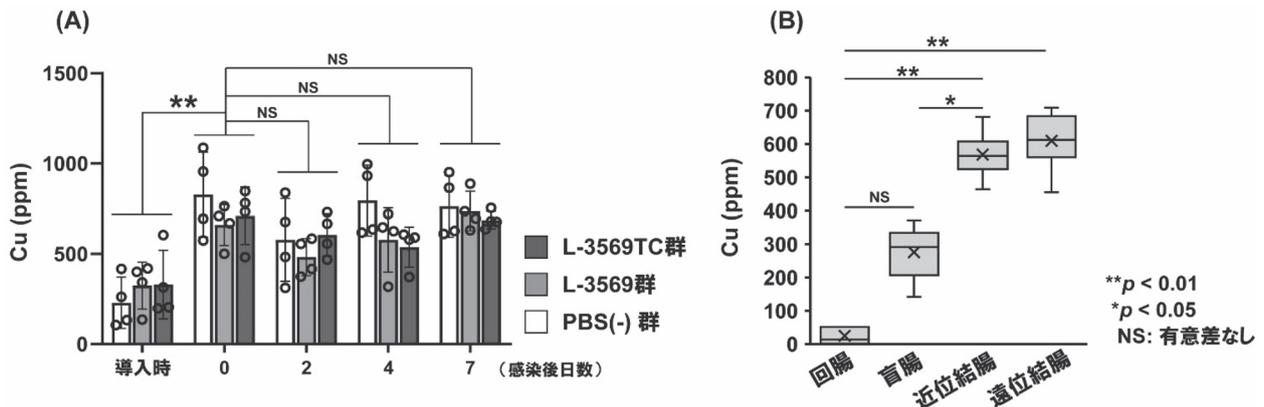


図5 糞便 (A) および消化管内容物中 (B) での銅濃度

引用文献5の Fig 2 および Fig S3 を改変。Tukey-Kramer test (A) および Dunn-Bonferroni test (B) により、各水準を比較した。B の各箱ひげ図は全 12 頭分の水準を示す。

続いて糞便中の銅濃度について、導入時には約 300 ppm であったが硫酸銅調製飼料の給餌後には、700 ppm を超える濃度となった (図 5A)。また、各腸管内容物の銅濃度を調べると、回腸: 24.5 ± 27.4 ppm (平均値 ± 標準誤差)、盲腸: 276.0 ± 74.3 ppm、近位結腸: 568.1 ± 64.8 ppm、遠位結腸: 609.3 ± 76.9 ppm であり、小腸から大腸にかけて銅が濃縮されていることが明らかとなった (図 5B)。L-3569 株と L-3569TC 株の硫酸銅に対する MIC は、それぞれ 250 ppm、1,500 ppm であるため、硫酸銅により L-3569TC が選択されている可能性が考えられた。実際に糞便中での排菌を比較すると、感染 2 日後、L-3569TC 株感染群で

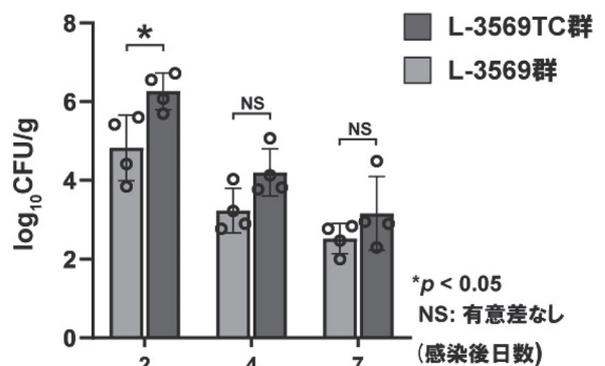


図6 サルモネラ感染群における糞便への排菌量の推移
引用文献5の Fig 2 を改変。Student's t-test により各群間の平均値を比較した。

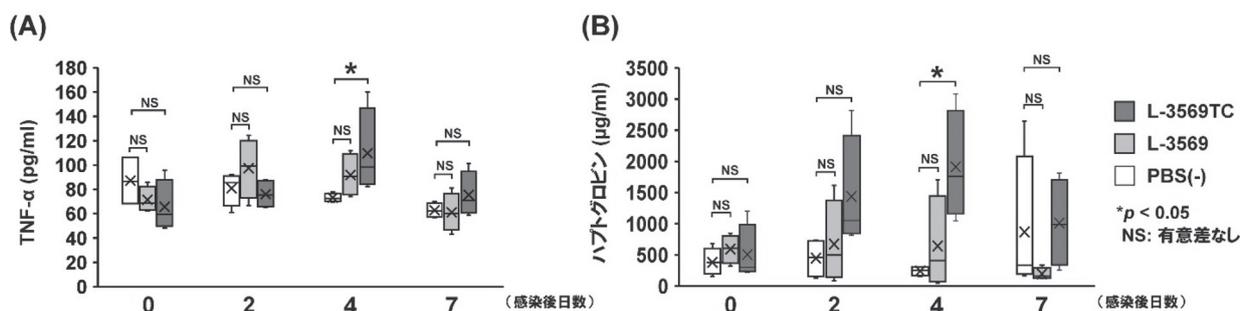


図7 血清中炎症マーカー:TNF- α (A)、ハプトグロビン (B) の推移
引用文献5の Fig 3を改変。Dunn-Bonferroni testにより、各水準を比較した。

統計学的に有意に排菌数が多く、以降も有意差はなかったものの試験終了まで排菌数が多い傾向にあった(図6)。また、炎症性マーカーであるTNF- α (図7A)とハプトグロビン(図7B)の血清中濃度について、感染群は非感染群と比較して高い傾向にあり、特に菌投与4日後には両マーカーともにL-3569TC群と非感染群間において統計学的に有意な差が確認された。以上の成績から、ICEmSTを持つL-3569TC株はL-3569株より急性期での病態の悪化や持続感染に向けた能力が高いこと、すなわちICEmSTが銅存在下の豚の腸管においてサルモネラの定着性と生残性に寄与することが示唆された。

4. おわりに

本稿では我が国の豚群に分布する非定型S. Typhimurium流行系統について、国内外での分布状況とその特徴を概説した。ST34非定型S. Typhimuriumは、引き続き国内外の家畜に維持・拡散されているだけでなく、新たに薬剤耐性遺伝子を獲得するなどして進化を続けている。また、本クローンの特徴である重金属抵抗性に注目すると、病原細菌の選択に与える影響について、抗菌薬のみならず抗菌作用のあるその他の化学物質へ目を向けることの重要性が見えてきた。銅や亜鉛といった重金属は養豚において汎用されており、サルモネラ属菌に限らず、これらの化合物に対する病原細菌の抵抗性に注意する必要がある。

利益相反

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

1) Al-Gallas N, et al. (2021) Quinolone resistance

among *Salmonella* Kentucky and Typhimurium isolates in Tunisia: first report of *Salmonella* Typhimurium ST34 in Africa and *qnrB19* in Tunisia. *J Appl Microbiol*, 130: 807-818.

- 2) Arai N, et al. (2018) Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last 4 decades. *J Clin Microbiol*, 56: e01758-17.
- 3) Arai N, et al. (2019) *Salmonella* genomic island 3 is an integrative and conjugative element and contributes to copper and arsenic tolerance of *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother*, 63: e00429-19.
- 4) Arai N, et al. (2021) Identification of a recently dominant sublineage in *Salmonella* 4,[5],12:i:- sequence type 34 isolated from food animals in Japan. *Front Microbiol*, 12: 690947.
- 5) Arai N, et al. (2024) ICEmST contributes to colonization of *Salmonella* in the intestine of piglets. *Sci Rep*, 14: 31407.
- 6) Arnott A, et al. (2018) Multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- sequence Type 34, New South Wales, Australia, 2016-2017. *Emerg Infect Dis*, 24: 751-753.
- 7) Bonardi S. (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect*, 145: 1513-1526.
- 8) Bone A, et al. (2010) Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage. *March-*

- May 2010. Euro Surveill, 15, 19592.
- 9) Carter MQ, et al. (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. J Bacteriol, 192: 3249–3258.
 - 10) Chung The H, et al. (2023) Multidrug resistance plasmids underlie clonal expansions and international spread of *Salmonella enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- ST34 in Southeast Asia. Commun Biol, 6: 1007.
 - 11) Delavat F, et al. (2017) The hidden life of integrative and conjugative elements. FEMS Microbiol Rev, 41: 512–537.
 - 12) Elnekave, E, et al. (2018) *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- in swine in the United States midwest: an emerging multidrug-resistant clade. Clin Infect Dis, 66: 877–885.
 - 13) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2011) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J, 9: 2090.
 - 14) García P, et al. (2016) Horizontal acquisition of a multidrug-resistance module (R-type ASSuT) is responsible for the monophasic phenotype in a widespread clone of *Salmonella* serovar 4,[5],12:i. Front Microbiol, 7: 680.
 - 15) Grimont, P, et al. (2007) Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, World Health Organization Centre for Reference and Research on Salmonella, 9th Edn. Paris: Pasteur Institute.
 - 16) Harada S, et al. (2010) Chromosomally encoded *bla*_{CMY-2} located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother, 54: 3545–3550.
 - 17) Ido N, et al. (2011) Molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- isolated from cattle and humans in Iwate Prefecture, Japan. J Vet Med Sci, 73: 241–244.
 - 18) Ido N, et al. (2014) Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. PLoS One 9: e104380.
 - 19) Issenhuth-Jeanjean S, et al. (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol, 165: 526–530.
 - 20) Johnson CM, et al. (2015) Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work. Annu Rev Genet, 49: 577–601.
 - 21) Laorden L, et al. (2010) Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant. J Clin Microbiol, 48: 4563–4566.
 - 22) Mather AE, et al. (2018) New variant of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium associated with invasive disease in immunocompromised patients in Vietnam. mBio 4:9(5): e01056-18.
 - 23) Medardus J, et al. (2014) In-feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant salmonellae. Appl Environ Microbiol, 80: 2317–2325.
 - 24) Moreno S, et al. (2012) Identification and characterization of novel *Salmonella* mobile elements involved in the dissemination of genes linked to virulence and transmission. PLoS One, 7: e41247.
 - 25) Mossong J, et al. (2007) Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. Euro Surveill, 12: E11–E12.
 - 26) Outten FW, et al. (2001) The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 276: 30670–30677.
 - 27) Petrovska L, et al. (2016) Microevolution of monophasic *Salmonella* Typhimurium during epidemic, United Kingdom, 2005–2010. Emerg Infect Dis, 22: 617–624.
 - 28) Rademacher C, et al. (2012) Copper-responsive gene regulation in bacteria. Microbiology, 158: 2451–2464.
 - 29) Ravatn R, et al. (1998) Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. Strain

- B13. J Bacteriol, 180: 4360–4369.
- 30) Rensing C, et al. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol Rev, 27: 197–213.
 - 31) Soyer Y, et al. (2009) *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J Clin Microbiol, 47: 3546–3556.
 - 32) Tavechio T, et al. (2004) “Multiplex PCR” identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in São Paulo state, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 46, 115–117.
 - 33) The European Commission (2018) Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1039. Official J Eur Union, 8–24.