

Чувствительность к антибиотикам и идентификация клинических штаммов *Pseudomonas fulva*

Е. П. СИВОЛОДСКИЙ¹, Г. В. ГОРЕЛОВА¹, С. П. БОГОСЛОВСКАЯ¹, Е. В. ЗУЕВА²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Antibiotic Susceptibility and Identification of Clinical *Pseudomonas fulva* Isolates

E. P. SIVOLODSKY, G. V. GORELOVA, S. P. BOGOSLOVSKAYA, E. V. ZUEVA

S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg

L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg

В коллекции культур псевдомонад, выделенных в г. Санкт-Петербурге в 1995—2005 гг., выявлены 8 наиболее ранних клинических штаммов *P. fulva*, что подтверждает медицинскую значимость этого вида. Установлен высокий уровень видовой идентификации всех штаммов *P. fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.). Апробированы и предложены тесты традиционных исследований, позволяющие достоверно идентифицировать *P. fulva* без использования генетических методов. Установлен профиль чувствительности к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva*. У двух штаммов *P. fulva* выявлена приобретённая резистентность к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу.

Ключевые слова: *Pseudomonas fulva*, идентификация, MALDI-TOF масс-спектрометрия, пигменты псевдомонад, чувствительность к антибиотикам, медицинское значение.

The earliest eight clinical strains of *Pseudomonas fulva* were identified in the culture collection of pseudomonads isolated in St. Petersburg in 1995—2005, that confirmed the medical importance of the species. A high level of the species identification of all the strains of *P. fulva* by MALDI-TOF mass-spectrometry with the use of Microflex device with database MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.) was shown. Tests for routine studies providing identification of *P. fulva* without the use of genetic methods were approved. The profile of the antibiotic susceptibility of the clinical strains of *P. fulva* was described. Acquired resistance of two *P. fulva* isolates to the 3rd generation cephalosporins and chloramphenicol was detected.

Key words: *Pseudomonas fulva*, identification, MALDI-TOF mass-spectrometry, pigments of pseudomonads, antibiotic susceptibility, medical value.

Введение

Бактерии *Pseudomonas fulva* (от греч. *fulva* — жёлто-коричневый) были выделены в Японии с рисовых полей и описаны в 1963 году [1]. Первое сообщение о медицинской значимости *P. fulva* было опубликовано в 2010 году [2]. Клинический штамм был выделен в Аргентине из ликвора девочки с опухолью мозга, осложнённой инфекцией. Первоначально штамм был определен автоматическим микробиологическим анализатором Vitek 2 как *P. putida*, однако методами секвенирования ПЦР-продукта гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации окончательно идентифицирован как *P. fulva*. У штамма была выявлена металло-бета-лактамаза типа VIM-2 с локализацией гена bla_{vim-2} в интегрене. В том же году был

опубликован случай выделения *P. fulva* из крови больного в Республике Корея [3]. Идентификация *P. fulva* была проведена по результатам секвенирования гена 16S рРНК и генов *gyrB* и *rpoD*. Штамм был чувствителен ко всем антисинегнойным антибиотикам.

В 2011 году появилось сообщение об идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии штамма *P. fulva* непосредственно в культуральной среде с посевом крови [4]. В 2010—2012 гг. в госпитале Чао-Янг (Пекин) были выделены штаммы *P. fulva* у 15 кардиологических больных с бактериемией [5]. Анализатором Vitek 2 бактерии были идентифицированы как *P. putida*, но секвенирование генов 16S рРНК, *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* установило их принадлежность к *P. fulva*. Лекарственная чувствительность штаммов не была приведена.

Эти данные свидетельствуют о медицинской значимости *P. fulva*, недостаточности информации о чувствительности штаммов к антибиотикам,

© В. М. Подборонов, И. П. Смирнова, 2014

Адрес для корреспонденции: 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева 6, ВМедА им. С. М. Кирова

сложности идентификации ввиду фенотипического сходства с *P. putida* и необходимости использовать генетические методы. Представляет интерес изучение пригодности для идентификации *P. fulva* метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Цель данного исследования — характеристика лекарственной чувствительности клинических штаммов *P. fulva*, оценка их идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и выявление наиболее значимых тестов идентификации традиционными методами исследований.

Материал и методы

Объектами исследования были 8 штаммов *P. fulva* из рабочей коллекции культур Е. П. Сиволодского (№ 22—27, 30 и 31) и типовые штаммы *P. putida* CIP 52191^T(ATCC 12633), *P. luteola* CIP 102995^T(JCM 3352), *P. oryzae* CIP 102996^T(JCM 2952), полученные из коллекции бактерий Института Пастера (Париж). Штаммы *P. fulva* были выделены в 1995—2005 гг. из мочи беременных и урологических больных в лечебных учреждениях г. Санкт-Петербурга. Они хранились в коллекции как псевдомонады неустановленной видовой принадлежности. Принадлежность их к виду *P. fulva* была установлена в ходе данного исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и традиционными тестами. Для выращивания исследуемых бактерий применяли «питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)» производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболensk).

Для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии использовали настольный MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия). Подготовку к исследованию чистых культур штаммов бактерий и проведение исследований осуществляли в соответствии с инструкцией к прибору. Уровень идентификации бактерий трактовали по критериям, указанным в инструкции: ≥ 2.300 —3.000 высокая вероятность идентификации вида; 2.000—2.299 надёжная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1.700—1.999 вероятная идентификация рода; 0.000—1.699 ненадёжная идентификация.

Чувствительность грамотрицательных бактерий к ионам бария как маркера их принадлежности к роду *Pseudomonas* определяли по методу, описанному в [6]. Оксидазу определяли у культур бактерий, выросших на агаре Мюллера-Хинтон при 26°C в течение 24 ч. Культуру изучали по Ковачу параллельно с реактивом тетраметил-пара-фенилендиамин на полоске OXItest (Erba Lachema) и в 1% водном растворе диметил-пара-фенилендиамина в капле на стекле чашки Петри [7]. Продукцию флуоресцеина выявляли путём посева бактерий на питательную среду King B (bio Merieux) и синтетическую среду King BS, состав которой был разработан нами [8]. Посевы выращивали при 26°C и 35°C в течение 24 и 48 ч. Результат учитывали при ультрафиолетовом освещении. Для обнаружения продуцирования бактериями жёлтого водонерастворимого пигмента колоний засеивали суточные культуры секторами на ГРМ-агар и инкубировали при 26°C в течение 48 ч. Продукцию коричневого водорастворимого пигмента выявляли посевом тех же суточных культур секторами на ГРМ-агар, но инкубацию проводили при 35°C в течение 48 ч. При учёте результатов обращали внимание на появление тёмно-коричневой окраски питательной среды вокруг газонов бактерий. Для усиления продукции коричневого пигмента целесообразно дополнительно вносить в ГРМ-агар перед его стерилизацией 0,05% раствор L-тирозина. Окисление и ферментацию глюкозы изучали О/Ф тестом на среде Хью-Лейфсона [7]. Утилизацию бактериями аминокислот L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода исследовали

по разработанному нами методу [9]. Утилизацию бактериями гипурата натрия изучали на синтетической питательной среде [9]. Наличие у бактерий нитратредуктазы, аргининдигидролазы и гидролиза эскулина определяли микрообъёмным методом с использованием тест-системы «Рапид-Энтер» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург).

Чувствительность к антибиотикам бактерий *P. fulva* изучали в отношении 30 антимикробных препаратов с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 (bio Merieux). К некоторым антибиотикам определяли чувствительность диско-диффузионным методом, используя диски производства НИИЭМ имени Пастера. Результаты определения чувствительности оценивали в соответствии с МУК 4.12.1890-04 [10].

Результаты и обсуждение

Изучение методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.) 8 штаммов нашей коллекции, продуцирующих жёлтый и коричневый пигменты, установило принадлежность всех штаммов к виду *P. fulva*. При этом были получены максимальные показатели уровня идентификации — у всех штаммов в диапазоне от 2.302 до 2.455, что соответствует высокой вероятности идентификации вида бактерий. Высокий уровень идентификации *P. fulva* был обеспечен обширной базой данных этого прибора, содержащей информацию о большинстве известных видов псевдомонад, включая *P. fulva*.

Информация о *P. fulva* отсутствует в базе данных автоматизированных микробиологических анализаторов Vitek 2 и Phoenix, которые не идентифицируют эти бактерии или ошибочно определяют их как *P. putida* [2, 5]. Сведения о фенотипических признаках *P. fulva* противоречивы, получены на малом количестве штаммов [2, 3, 11], что нуждается в их уточнении.

Наиболее характерными признаками *P. fulva*, определившими название вида, являются продукция жёлтого водонерастворимого пигмента колоний и коричневого водорастворимого пигмента, окрашивающего питательную среду вокруг колоний. Однако бактерии, выращенные при одной температуре, редко имеют оба пигмента. Нами было установлено, что температурный оптимум для синтеза жёлтого и коричневого пигментов различен. Жёлтый пигмент продуцируют все штаммы *P. fulva* на ГРМ-агаре при 26°C в течение 48 ч.

При этом большинство штаммов коричневого пигмент не образуют. Коричневый пигмент продуцируют все штаммы *P. fulva* на ГРМ-агаре при 35°C в течение 48 ч, при этом большинство штаммов жёлтый пигмент не образуют (табл. 1). Такой же коричневого пигмент образуют большинство штаммов *P. putida*, однако они не продуцируют жёлтый пигмент. Поэтому продукцию указанных пигментов следует определять на ГРМ-агаре на отдельных чашках при 26°C (жёлтый пигмент) и 35°C (коричневый пигмент) в течение 48 ч.

Таблица 1. Фенотипическая характеристика *P. fulva* и других псевдомонад, продуцирующих жёлтый и коричневый пигменты

Таксономические признаки	Исследуемые штаммы						
	1* (n=8)	2 (n=3)	3 (n=1)	4 (n=1)	5 (n=1)	6 (n=1)	7 (n=1)
Чувствительность к ионам бария	+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	—	—	+	—	—
Продукция флуоресцеина:							
среда King B при 26°C и 35°C	—	—	—	—	—	—	—
среда King BS при 26°C	+	0	0	0	+	—	—
при 35°C	—	0	0	0	—	—	—
Продукция жёлтого пигмента колоний в течение 48 ч:							
при 26°C	+	0	0	0	—	+	+
при 35°C	-/+	+	+	+	—	+	+
Продукция коричневого пигмента вокруг колоний за 48 ч:							
при 26°C	-/+	0	0	0	—	—	—
при 35°C	+	0	0	0	+	—	—
О/Ф тест с глюкозой	±	±	±	±	±	±	±
Утилизация гиппурата натрия	—	—	0	0	+	—	—
Утилизация источника N и C:							
L-лизина	—	0	0	0	+	—	—
L-лейцина	—	0	0	0	+	—	—
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	+	+	—
Нитратредуктаза	—	—	—	—	—	+	—
Гидролиз эскулина	—	—	—	—	—	+	—
Рост при 41°C	—	—	—	—	—	+	—

Примечание. * 1 — *P. fulva*, наши данные; 2 — *P. fulva* [9]; 3 — *P. fulva* [3]; 4 — *P. fulva* [2]; 5 — *P. putida* (типовой); 6 — *P. luteola* (типовой); 7 — *P. oryzihabitans* (типовой); 0 — не изучался; -/+ — отрицательный результат у большинства штаммов; ± — положительный результат у большинства штаммов.

Сведения о наличии оксидазы у *P. fulva* противоречивы: отмечается наличие оксидазы [11] или её отсутствие [2, 3]. По нашим данным, все 8 изученных штаммов продуцируют оксидазу слабой активности, которая выявляется любым реактивом. Большинство авторов отмечают отсутствие образования флуоресцеина бактериями *P. fulva* на среде King B [2, 3, 11]. Наши результаты подтверждают отсутствие продукции флуоресцеина всеми штаммами *P. fulva* на среде King B (bioMerieux) при 26°C и 35°C в течение 48 ч. Однако на синтетической среде King BS, разработанной нами [8], все штаммы *P. fulva* продуцировали флуоресцеин при 26°C, но не продуцировали при 35°C в течение 48 ч, что подтверждает правильность принадлежности *P. fulva* к группе флуоресцирующих псевдомонад, как было указано при описании этого вида [1].

Бактерии *P. fulva* можно отличить от *P. putida* по отсутствию утилизации гиппурата натрия, а также отсутствию утилизации L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода [9]. Тесты на аргининдигидролазу, нитратредуктазу, гидролиз эскулина, рост при 41°C позволяют отличить *P. fulva* от других видов псевдомонад, продуцирующих жёлтый пигмент — *P. luteola*, *P. oryzihabitans* (см. табл. 1).

Все 8 штаммов *P. fulva* нашей коллекции были выделены из клинического материала: 4 штамма из мочи беременных женщин в родильном доме, остальные — из мочи женщин и мужчин, являвшихся пациентами лечебных учреж-

дений г. Санкт-Петербурга. Концентрация *P. fulva* в моче составляла 10^4 — 10^7 КОЕ/мл, что указывает на их этиологическую значимость. С 2010 г. известны только 4 сообщения о выделении *P. fulva* из клинического материала: 3 публикации по 1 штамму [2—4] и одно сообщение о выделении 15 штаммов [5]. Наши сведения свидетельствуют о более ранней циркуляции клинических штаммов *P. fulva* в период 1995—2005 гг. в России и подтверждают медицинскую значимость *P. fulva*.

Изучение чувствительности к антибиотикам показало (табл. 2), что все 8 клинических штаммов *P. fulva* имеют природную устойчивость к ампициллину, ингибиторозащищённым пенициллинам (ампициллин/сульбактам, ампициллин/клавуланат) и цефалоспорином I и II поколений (цефазолин, цефуроксим). Два штамма (№ 27, 31) имеют приобретённую устойчивость к цефалоспорином III поколения (цефотаксиму, цефтриаксону, цефеперазону/сульбактаму), однако чувствительны к цефтазидиму. Все штаммы сохранили чувствительность к цефепиму, карбапенемам (имипенему, меропенему), а также к азлоциллину, азтреонаму (кроме № 27), пиперациллину/газобактаму, колистину, аминогликозидам (амикацину, гентамицину, тобрамицину, нетилмицину), ципрофлоксацину, левофлоксацину, тетрациклину, тигециклину. Три штамма (№ 23, 27, 31) приобрели устойчивость к хлорамфениколу. Все штаммы резистентны к фосфомицину, рифампицину, эритромицину, нитрофурантоину, триметоприму/сульфаметоксазолу.

Таблица 2. Чувствительность к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva*

Антибиотики	МПК, мг/л (группы SIR)									
	22*	23*	24*	25*	26*	27*	30*	31*	1**	1***
Ампициллин	32R	32R	32R	32R	32R	32R	32R	32R		
Ампициллин/сульбактам	32R	32R	16R	32R	32R	32R	32R	32R		
Ампициллин/клавуланат	16I	32R	8S	32R	32R	32R	32R	32R		
Цефазолин	64R	64R	64R	64R	64R	64R	64R	64R		
Цефуроксим	64R	64R	8R	64R	64R	64R	64R	64R		
Цефотаксим	8S	8S	1S	8S	16I	64R	1S	64R		S
Цефтазидим	4S	2S	1S	2S	2S	4S	1S	4S	32R	S
Цефтриаксон	16I	16I	2S	16I	16I	64R	16I	64R		
Цефоперазон/сульбактам	16S	8S	8S	16S	16S	64R	16S	64R		
Цефепим	1S	1S	1S	1S	2S	2S	1S	2S	8S	S
Имипенем	1S	1S	2S	1S	2S	2S	1S	2S	32R	S
Меропенем	1S	2S	0,2S	1S	2S	4S	1S	4S	32R	S
Амикацин	2S	2S	2S	2S	2S	2S	2S	2S	16S	S
Гентамицин	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S	128R	S
Тобрамицин	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S		S
Нетилмицин	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S	1S		
Ципрофлоксацин	0,2S	0,2S	0,2S	0,2S	0,2S	0,5S	0,2S	0,5S	0,5S	
Тетрациклин	1S	1S	1S	1S	1S	4S	2S	4S		
Тигециклин	0,5S	2S	1S	0,5S	0,5S	4I	2S	4I		
Хлорамфеникол	16I	32R	8S	16I	16I	64R	16I	64R		R
Колистин	0,5S	0,5S	0,5S	0,5S	0,5S	0,5S	0,5S	0,5S	1S	
Фосфомицин	256R	256R	256R	256R	256R	256R	256R	256R		
Нитрофурантоин	512R	64I	64I	512R	64I	128R	128R	256R		
Пиперациллин/тазобактам	S	S	S	S	S	S	S	S	128R	S
Азлоциллин	S	S	S	S	S	S	S	S		
Азтреонам	S	I	S	S	I	R	I	S	16I	S
Левифлоксацин	S	S	S	S	S	S	S	S		S
Рифампицин	R	R	R	I	I	R	R	R		
Эритромицин	R	I	R	I	R	R	R	I		
Триметоприм/сульфаметоксазол	160R	80R	20S	320R	160R	320R	80R	320R		R

Примечание. * – номера штаммов *P. fulva* (наши данные); ** – штамм по [2]; *** – штамм по [3]; группы SIR: S – чувствительность, I – умеренно резистентный, R – резистентный.

Эти результаты свидетельствуют, что в течение 1995–2005 годов некоторые штаммы *P. fulva* приобрели устойчивость к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу. Профиль чувствительности к антибиотикам штамма № 27 (устойчивость к цефотаксиму, цефтриаксону, цефоперазону/сульбактаму, азтреонаму; чувствительность к цефтазидиму и пиперациллину/тазобактаму) характерен для бета-лактамазы расширенного спектра действия типа CTX-M.

Данные о чувствительности к антибиотикам штамма *P. fulva*, выделенного в Республике Корея [3], совпадают с данными по чувствительности большинства наших штаммов (табл. 2). Вызывает интерес сообщение [2] о выделении в Аргентине штамма *P. fulva*, резистентного к карбапенемам, что обусловлено продукцией металло-бета-лактамазы типа VIM-2 с локализацией гена *bla*_{VIM-2} в интегрене (см. табл. 2). Там же в 2005 году были выделены два клинических штамма *P. putida* с металло-бета-лактамазой типа VIM-2 [12]. Имеется сообщение [13] о высокой частоте циркуляции в Республике Корея штаммов *P. putida*, устойчивым к карбапенемам (22%). Учитывая, что *P. fulva* часто ошибочно идентифицировали как *P. putida*, следует признать оба вида псевдомонад возможным резервуаром генов карбапенемаз в резистоме [14].

Заключение

Таким образом, в рабочей коллекции культур псевдомонад, выделенных в Санкт-Петербурге в 1995–2005 гг., выявлены наиболее ранние изоляты клинических штаммов *P. fulva*, что подтверждает медицинскую значимость этого вида псевдомонад. Установлен высокий уровень идентификации всех штаммов *P. fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.). Апробированы и предложены тесты традиционных исследований, позволяющие достоверно идентифицировать *P. fulva* без использования генетических методов, среди них: чувствительность к ионам бария; продукция водонерастворимого желтого пигмента колоний при 26°C и водорастворимого коричневого пигмента при 35°C; наличие оксидазы слабой активности; продукция флуоресцеина на синтетической среде King BS при 26°C; отсутствие утилизации гиппурата натрия, L-лизина, L-лейцина и др. Установлен профиль чувствительности к антибиотикам клинических штаммов *P. fulva*. У двух штаммов *P. fulva* выявлена приобретённая резистентность к цефалоспорином III поколения и хлорамфениколу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iizuka H., Komagata K. New species of *Pseudomonas* belonged to fluorescent group (studies on the microorganisms of cereal grains. Part V). J Agricul Che Soc Japan 1963; 37: 137—141.
2. Almuzara M.N., Vazquez M., Tanaka N., Turko M., Ramires M.S., Lopez E.L. et al. First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2010; 48: 2: 660—664.
3. Seok Y., Shin H., Lee Y., Cho I., Na S., Yong D. et al. First report of blood stream infection caused by *Pseudomonas fulva*. J Clin Microbiol 2010; 48: 7: 2656—2657.
4. Kok J., Thomas L.C., Olma T., Chen S.C.A., Iredell J.R. Identification of bacteria in blood culture broths using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization sepsityper and Time of Flight Mass Spectrometry. PLOS One 2011; 6: 8: e23285.
5. Liu Yingmei, Liu Kun, Yu Xiaomin, Li Binbin, Cao Bin. Identification and control of *Pseudomonas* spp. (*P.fulva* and *P.putida*) bloodstream infection outbreak in a teaching hospital in Beijing, China. Int J Infect Dis 2014; 23: 105—108.
6. Sivolodskii E.P. Determination of the sensitivity of bacteria to barium ions, a taxonomic marker of the genus *Pseudomonas*. Microbiology 2012; 81 (1): 112—117.
7. Герхардт Ф., ред. Методы общей бактериологии. т. 3. М.: Мир; 1983.
8. Сиволодский Е.П. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флуоресцеина бактериями рода *Pseudomonas*. Клин лабор диагн 2012; 10: 60—62.
9. Sivolodskii E.P. Application of the profiles of amino acid utilization as the sole carbon and nitrogen sources for pseudomonad taxonomy. Microbiology 2009; 78: 6: 711—716.
10. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.12.1890-04. М.: 2004.
11. Uchino M., Shida O., Uchimura T., Komagata K. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. J Gen Appl Microbiol 2001; 47: 5: 247—261.
12. Almuzara M., Radice M., de Garate N., Kossman A., Cuirolo A., Santella G. et al. VIM-2 — producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. Emer Infect Dis 2007; 13: 4: 668-669.
13. Seong Eun Kim, Seong -Hwan Park, Kyung-Hwa Park, Su-Hyun Kim, Sock-In Jung, Jong-Hee Shin et al. Nosocomial *Pseudomonas putida* bacteremia: high rates of carbapenem resistance and mortality. Chonnam Med J 2012; 48: 2: 91—95.
14. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объем, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5—6: 38—48.