

• 综 述 •

全基因组测序在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行病学调查中的应用^{*}

储丹丹^{1,2}综述,单 斌^{1,2△}审校

(1. 昆明医科大学第一附属医院医学检验科, 云南昆明 650032;

2. 云南省检验医学重点实验室, 云南昆明 650032)

摘 要:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的广泛传播已成为全球重要的公共卫生问题,但研究其传播的传统方法在分辨能力、信息量和时效性等多个方面稍显不足。随着科学技术的发展,全基因组测序技术(WGS)已成为分析追踪和溯源 MRSA 感染暴发、流行的重要手段。WGS 可以有效整合利用 MRSA 的全基因组信息,具有很高的分辨率和强大的信息量,在进行菌株充分分型的基础上,能更精确地判断 MRSA 同源性的远近,分辨不同的进化传播路线,这对细菌感染预防控制工作有重大意义。

关键词:全基因组测序; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 流行病学; 暴发; 溯源

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.026

中图法分类号:R449.6

文章编号:1673-4130(2020)22-2797-05

文献标识码:A

Application of whole-genome sequencing in molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*^{*}

CHU Dandan^{1,2}, SHAN Bin^{1,2△}

(1. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Laboratory

Medicine, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: The widespread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become an important public health problem in the world, but the conventional methods to study the spread of MRSA are inadequate in many aspects, such as the discernibility, amount of information, time-validity. With the development of science and technology, the whole-genome sequencing (WGS) has become an important means to analyze and trace the outbreak of MRSA infection. WGS could effectively integrate and utilize the whole genome information of MRSA, with high discernibility and powerful information. On the basis of full typing of strains, it could more accurately judge the distance of MRSA homology and distinguish different evolutionary transmission routes, which is of great significance to the prevention and control of bacterial infection.

Key words: whole-genome sequencing; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; epidemiology; outbreak; tracing

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是一种高致病性革兰阳性菌,常定植在健康人体鼻腔、咽喉、皮肤等部位^[1],当机体免疫力低下时可引起呼吸道、皮肤软组织、血液及医疗器械相关性感染,是引起医院和社区感染的重要病原菌之一^[2]。MRSA 具有多重耐药性,并且常携带多种毒力因子,由它所致的感染多呈流行或暴发,治疗困难大,病死率高,增加了社会经济和医疗负担^[2]。因此,快速、可靠地鉴别及追溯

医院和社区 MRSA 感染的源头,获得其分子特性,掌握疾病流行扩散的趋势,对于指导临床治疗和疾病防控至关重要^[2-3]。本文就 MRSA 常规分型方法、细菌全基因组测序(WGS)概述、WGS 用于 MRSA 流行病学调查实例等方面进行简要综述。

1 MRSA 的常规分子分型方法

目前对 MRSA 流行病学的研究主要采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)、spa 分

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81460322)。

[△] 通信作者, E-mail: shanbin6@139.com。

型、SCC mec 分型等技术^[4-6]。PFGE 利用限制性内切酶对细菌染色体 DNA 片段进行酶切,再将酶切片段电泳分离,最后对所得酶切图谱进行比对,分析各菌株间的相关性。MLST 通过对 MRSA 染色体上的管家基因进行 PCR 扩增,并将测序结果与 MLST 数据库进行比对,从而根据碱基序列的差异及等位基因的不同组合类型分析菌株间的同源性和进化关系^[7]。spa 分型通过扩增编码葡萄球菌 A 蛋白(SPA)基因片段的 X 区来对 MRSA 进行分型。SCC mec 分型则是利用多重 PCR 扩增 SCC mec 元件中的特有序列,与质控菌株比较得到分型结果^[8]。但是,这些传统分子分型方法都是从细菌 DNA 片段或特殊位点入手,结果仅能反映细菌基因组的局部遗传信息,在高度克隆化的菌株或进行长时间跨度的流行病学研究时分辨能力有限^[9]。此外,这些传统方法在实际操作时不仅费时,且不能在分型的同时获得耐药基因、毒力基因等反映致病性的重要信息,故在实际应用中稍显不足。

2 WGS 概述

下一代测序(NGS)是一种允许数千到数十亿个 DNA 片段独立或同时进行高通量、大规模并行测序的方法^[10],近年来 NGS 的应用已经从研究工具过渡到诊断方法,并在临床微生物学实验室中的应用越来越普遍。WGS 是最重要的一种 NGS 技术,已逐渐成为研究细菌流行病学特征的重要手段^[11]。

相较于 Sanger 测序,WGS 不需要针对不同 DNA 片段或细菌种属设计特定引物,而是通过大规模随机序列扩增和实时检测合成信号以获得大量原始数据,再通过各种生物信息学工具来分析序列数据的质量,并将未精确排序的原始测序数据转换为完整的基因组序列信息。尤其是细菌完成图的绘制可以非常清晰地了解基因组的结构,为研究细菌的功能和进化提供数据参考^[12-13]。此外,WGS 不仅可获得纯菌落的基因组信息,还可获得混合标本的基因组信息,故可以区分高度相关的谱系,具有其他方法没有的分辨率和精度。通过 WGS 技术,不仅可获得近乎完整的细菌 DNA 信息,包括种属、耐药基因和毒力因子的携带情况、可移动元件等信息,还可对多个细菌间的基因组信息进行比较,对于耐药菌株的分子流行病学和传播机制研究至关重要^[13]。

WGS 在细菌流行病学调查中的应用与生物信息学技术的发展密不可分^[3]。多种生物信息学工具的开发和成熟使微生物基因组序列分析工作日趋简便。目前,运用 WGS 数据进行菌株分型和溯源主要通过筛选细菌核心基因组的单核苷酸多态性(SNP)位点差异,以 SNP 差异数量的多少反映菌株基因组之间

的差异,进而分析其同源性^[12,14-15]。通常暴发流行菌株基因组之间的差异主要体现在单个碱基的变异,同源性比较接近,而散发菌株基因组之间差异较大,可能存在大片段序列的插入或缺失,所以 SNP 可以准确衡量菌株之间的差异。因此,在比较基因组 SNP 差异前,需要先确定菌株的核心基因组。简而言之,利用 WGS 溯源分析主要步骤包括:(1)获取 WGS 原始序列数据;(2)挑选合适的参考基因组序列;(3)确定所有基因组序列的核心基因组;(4)用 SNP 差异构建系统发生树,找到菌株之间的同源关系等。WGS 应用于感染暴发菌株分析时,可以利用其基因组数据的强大分辨率和大量菌株信息,在进行充分分型的基础上对暴发菌株同源性的远近进行精确判断,并分辨出不同的进化路线,甚至可推算出基因组碱基突变需花费的时间^[6,11]。

3 WGS 在 MRSA 流行病学调查中的实践应用

近年来,WGS 技术的广泛应用使人们能够对 MRSA 的传播模式进行更详细的研究,包括分析过去无记录的传播和全面、详细的菌株进化过程^[16-18]。随着该技术的日益普及和成本的降低,WGS 将不再局限于科学研究,而将越来越多地应用于常规临床实验室,为日常医疗和科研工作带来便利。目前,WGS 已经在医院、其他医疗机构和社区的流行病调查中发挥重要作用,为医院和社区的疾病预防和溯源工作做出前所未有的贡献。

3.1 医院内 MRSA 流行病学调查 新生儿和儿童免疫系统发育不成熟,一旦感染 MRSA 会造成严重的后果。因此,在新生儿科或儿科,WGS 已被用于跟踪 MRSA 的传播和评价早期感染控制措施的效果。KOSER 等^[19]利用 WGS 证实 MRSA 在英国某院婴儿特护病房内部、产后病房和社区中传播,并证实一名医务人员携带的 MRSA 在病房内的播散使暴发感染发展为持续感染,同时证明了抗菌药物耐药基因和耐药表型检测结果之间的一致性。EARLS 等^[20]利用 WGS 证实发生在爱尔兰某院新生儿重症监护病房的两次 MRSA 暴发均由同一个型别且高度克隆的菌株引起,通过与国际菌株的比较,推断此次暴发菌株很可能来源于澳大利亚,因为该型别是澳大利亚的流行克隆菌株类别之一。DURAND 等^[18]通过 WGS 发现法国两次不同的新生儿 MRSA 暴发之间存在的传播证据,也同时排除了某些型别造成大规模地方性聚集感染的可能性,由此说明 WGS 具有足够分辨力来证实或排除由传统流行病学调查方法确定的暴发事件。

除新生儿科外,WGS 在医院其他科室的菌株流行病学调查中同样重要。KONG 等^[21]采用 WGS 和传统分子分型方法对江苏某医院神经外科发生的一

起疑似 MRSA 疫情进行研究,鉴定了此次疫情中的暴发菌株和散发菌株,此外 WGS 结果还证实耐药基因的存在与否与耐药表型检测结果基本一致,这是传统分子分型方法无法做到的。CUNNINGHAM 等^[22]用 WGS 联合 PFGE 对某院烧伤科分离的 MRSA 进行分析,发现虽然 PFGE 为同一型别,但 WGS 可将菌株分为高度克隆株和非克隆株,可见 WGS 具有远超于常规方法的分辨率。TONG 等^[23]用 WGS 证实了泰国某院病房内和病房间的感染传播事件,并证明每个病房中均有 1 例患者充当了暴发中传播源头的角色。RUBIN 等^[24]运用 WGS 证实长期携带 MRSA 的医务人员和感染预防控制工作中的偶然疏漏导致了 MRSA 间歇性小范围的医院传播。

3.2 社区及其他医疗机构间 MRSA 流行病学调查 虽然医院感染预防和控制部门的重点范围是医院内部,但感染有时可能发生在医院外,比如来自其他医院、其他国家的患者,特别是曾在海外住院的患者。美国一项研究利用 WGS 对来自美国 22 个州及地区和其他 7 个国家的 357 株 MRSA 进行调查,详细分析了菌株在宾夕法尼亚州的起源及其随后的传播范围^[25]。FLUIT 等^[26]将美国 1 株 ST80 MRSA 与欧洲分离的其他 3 株 ST80 型进行比对,发现所有菌株来源于约 20 年前的同一菌株,可见 WGS 对长时间大范围的院外传播具有很好的分析能力。HARRIS 等^[27]证明 WGS 可以用来研究 MRSA 的洲际和局部传播,揭示优势菌株的流行和微观进化,还证实该技术在追踪 MRSA 院内传播方面的潜力。

随着人口老龄化,老年患者从医院到其他医疗机构(如养老院),从一家医院到另一家医院,从入院到出院的速度比以前更快,许多研究都重点关注到 MRSA 在这些过程中的传播^[28-31]。一项研究用 WGS 对英国和爱尔兰的 MRSA 进行比较,结果表明在同一转诊区域内的医院检出的菌株有相似性,且在一家医院内的菌株传播是由从另一家医院转诊的患者引起的^[32]。此外,在伦敦两家国家卫生服务医院和一家地区综合医院中进行的一项研究发现,医院频繁收治患者会导致医院内以病房为单位的传播^[33]。

此外,WGS 在 MRSA 定植与感染的研究中发挥着同样重要的作用^[34]。在对荷兰一家肿瘤医院进行的一项医务人员无症状鼻腔细菌定植的研究中,WGS 证实了 MSSA 和 MRSA 菌株在暴发中的相似性^[35]。MOORE 等^[36]证明在 MRSA 的定植和感染研究中,WGS 对其他方法无法区分的菌株具有很高的分辨率。

4 WGS 在 MRSA 流行病学中的应用展望

WGS 技术为医院、社区和其他医疗机构中 MR-

SA 的流行病学调查提供了新的分析手段,可以单独或联合传统方法对疑似暴发菌株进行分析,获得菌株的遗传信息、亲缘关系、传播路径、耐药性和毒力等特征,极大地扩展了对 MRSA 临床和流行病学方面的认识,包括医院和社区中传播克隆的共性及耐药决定因素的演变。随着该技术的发展,其价格越来越低,快速、精确、全面的优点将使得该技术越来越多地被应用到流行病调查中,通过对不同菌株所有遗传信息的比对,发现菌株之间的遗传特性差异及同源性,从而帮助院感科和疾控部门制订更准确、更详细的疫情防控方案,进而提高对 MRSA 暴发和流行的了解和控制。

参考文献

- [1] GAJDÁCS M. The continuing threat of methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. Antibiotics (Basel), 2019, 8 (2):52-58.
- [2] LAKHUNDI S, ZHANG K. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4):e00020-18.
- [3] CARRICO J A, ROSSI M, MORAN-GILAD J, et al. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians[J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(4):342-349.
- [4] MONECKE S, JATZWALK L, MULLER E, et al. Diversity of SCCmec elements in Staphylococcus aureus as observed in South-Eastern Germany[J]. PLoS One, 2016, 11 (9):e0162654.
- [5] MONECKE S, SLICKERS P, EHRLICH R. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 53(2):237-251.
- [6] SHORE A C, ROSSNEY A S, KINNEVEY P M, et al. Enhanced discrimination of highly clonal ST22-methicillin-resistant Staphylococcus aureus IV isolates achieved by combining spa, dru, and pulsed-field gel electrophoresis typing data[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5):1839-1852.
- [7] MUN Y S, HWANG Y J. Novel spa and multi-locus sequence types (MLST) of staphylococcus aureus samples isolated from clinical specimens in Korean[J]. Antibiotics (Basel), 2019, 8(4):202-209.
- [8] MCCLURE-WARNIER J A, CONLY J M, ZHANG K. Multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. J Vis Exp, 2013, 145:50779.
- [9] OGIHARA S, SAITO R, SAWABE E, et al. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison of PCR-based open reading frame typing, multilocus sequence typing, and Staphylococcus protein A gene typing[J]. J Infect Chemother, 2018, 24(4):312-

- 314.
- [10] GU W, MILLER S, CHIU C Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-338.
- [11] TANG P, CROXEN M A, HASAN M R, et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology[J]. *Am J Infect Control*, 2017, 45(2): 170-179.
- [12] BESSER J, CARLETON H A, GERNER-SMIDT P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(4): 335-341.
- [13] TENOVER F C, TICKLER I A, LE V M, et al. Updating molecular diagnostics for detecting methicillin-susceptible and methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates in blood culture bottles[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(11): e01195-19.
- [14] PEACOCK S J, PARKHILL J, BROWN N M. Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens[J]. *Microbiology*, 2018, 164(10): 1213-1219.
- [15] SCHURCH A C, ARREDONDO-ALONSO S, WILLEMS R J L, et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(4): 350-354.
- [16] CROUCHER N J, DIDELOT X. The application of genomics to tracing bacterial pathogen transmission[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 23: 62-67.
- [17] ANJUM M F, MARCO-JIMENEZ F, DUNCAN D, et al. Livestock-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus from animals and animal products in the UK[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2136.
- [18] DURAND G, JAVERLIAT F, BES M, et al. Routine whole-genome sequencing for outbreak investigations of staphylococcus aureus in a national reference center[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 511.
- [19] KOSER C U, HOLDEN M T, ELLINGTON M J, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(24): 2267-2275.
- [20] EARLS M R, COLEMAN D C, BRENNAN G I, et al. Intra-hospital, inter-hospital and intercontinental spread of ST78 MRSA from two neonatal intensive care unit outbreaks established using whole-genome sequencing[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1485.
- [21] KONG Z, ZHAO P, LIU H, et al. Whole-genome sequencing for the investigation of a hospital outbreak of MRSA in China[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149844.
- [22] CUNNINGHAM S A, CHIA N, JERALDO P R, et al. Comparison of whole-genome sequencing methods for analysis of three methicillin-resistant staphylococcus aureus outbreaks[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(6): 1946-1953.
- [23] TONG S Y, HOLDEN M T, NICKERSON E K, et al. Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a high transmission setting[J]. *Genome Res*, 2015, 25(1): 111-118.
- [24] RUBIN I M, HANSEN T A, KLINGENBERG A M, et al. A sporadic four-year hospital outbreak of a ST97-IVa MRSA with half of the patients first identified in the community[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1494.
- [25] CHALLAGUNDLA L, LUO X, TICKLER I A, et al. Range expansion and the origin of USA300 North American epidemic methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. *mBio*, 2018, 9(1): e02016-17.
- [26] FLUIT A C, CARPAIJ N, MAJOOR E A, et al. Comparison of an ST80 MRSA strain from the USA with European ST80 strains[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(3): 664-669.
- [27] HARRIS S R, FEIL E J, HOLDEN M T, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread[J]. *Science*, 2010, 327(5964): 469-474.
- [28] CHOW A, LIM V W, KHAN A, et al. MRSA transmission dynamics among interconnected acute, intermediate-term, and long-term healthcare facilities in Singapore[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(Suppl2): S76-S81.
- [29] EARLS M R, KINNEVEY P M, BRENNAN G I, et al. The recent emergence in hospitals of multidrug-resistant community-associated sequence type 1 and spa type t127 methicillin-resistant Staphylococcus aureus investigated by whole-genome sequencing: implications for screening[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175542.
- [30] PARDOS DE LA G M, RAYGOZA J A, MWANGI M, et al. Molecular types of methicillin-resistant staphylococcus aureus and methicillin-sensitive s. aureus strains causing skin and soft tissue infections and nasal colonization, identified in community health centers in New York City[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(8): 2648-2658.
- [31] STINE O C, BURROWES S, DAVID S, et al. Transmission clusters of methicillin-resistant staphylococcus aureus in long-term care facilities based on whole-genome sequencing[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2016, 37(6): 685-691.
- [32] DONKER T, REUTER S, SCRIBERRAS J, et al. Population genetic structuring of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone EMRSA-15 within UK reflects patient referral patterns[J]. *Microb Genom*, 2017, 3(7): e000113.
- [33] TOSAS A O, STABLER R A, BETLEY J, et al. Frequent undetected ward-based methicillin-resistant staphylococ-

cus aureus transmission linked to patient sharing between hospitals[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(6): 840-848.

[34] SENN L, CLERC O, ZANETTI G, et al. The stealthy superbug: the role of asymptomatic enteric carriage in maintaining a long-term hospital outbreak of st228 methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. mBio, 2016, 7(1): e02039-15.

[35] WETERINGS V, BOSCH T, WITTEVEEN S, et al. Next-generation sequence analysis reveals transfer of methicillin resistance to a methicillin-susceptible staphylococcus aureus strain that subsequently caused a methicillin-resistant staphylococcus aureus outbreak: a descriptive study[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(9): 2808-2816.

[36] MOORE G, COOKSON B, GORDON N C, et al. Whole-genome sequencing in hierarchy with pulsed-field gel electrophoresis: the utility of this approach to establish possible sources of MRSA cross-transmission[J]. J Hosp Infect, 2015, 90(1): 38-45.

(收稿日期: 2020-02-22 修回日期: 2020-06-30)

• 综 述 •

miR-486-5p 在肿瘤发生与发展及其他疾病中的最新研究进展*

王倩倩^{1,2}综述, 任传利^{2△}审校

(1. 大连医科大学研究生院, 辽宁大连 116044; 2. 江苏省苏北人民医院/扬州大学附属苏北人民医院检验科, 江苏扬州 225001)

摘 要:微小核糖核酸(miRNA)是一组高度保守的非编码核苷酸序列, 具有调控转录后基因表达的功能。miRNA 通过靶向不同基因影响细胞生理和疾病发展。miRNA 具有调控细胞增殖、凋亡等生物学特性, 参与组织炎症损伤等病理过程, 其中 miR-486-5p 作为近年新发现的 miRNA, 与肿瘤等疾病发生、发展密切相关, 有望辅助疾病早期诊断、靶向治疗及预后评估。

关键词:微小核糖核酸; miR-486-5p; 肿瘤; 靶向治疗

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 22. 027 **中图法分类号:**R446. 9

文章编号:1673-4130(2020)22-2801-05 **文献标识码:**A

Recent advances of miR-486-5p in oncogenesis and other diseases*

WANG Qianqian^{1,2}, REN Chuanli^{2△}

(1. Graduate School, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Northern Jiangsu People's Hospital of Jiangsu Province / Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: microRNAs (miRNAs) are a group of highly conserved non-coding nucleotide sequences. Their function is to regulate post-transcriptional gene expression. miRNAs affects cell physiology and disease development by targeting different genes. miRNA regulates biological characteristics such as cell proliferation and apoptosis, and participates in pathological processes such as inflammatory injury. miR-486-5p is a newly discovered miRNA in recent years, it closely relates to the occurrence and development of diseases. miR-486-5p is expected to help in early diagnosis, targeted therapy and prognosis assessment.

Key words: miRNA; miR-486-5p; tumor; targeted therapy

微小核糖核酸(miRNA)是一类内源基因编码的 18~25 个核苷酸组成的单链非编码 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3'或 5'非翻译区(UTR)结合, 参与蛋白质的翻译或 mRNA 的降解^[1], 调节众多细胞生物学进程, 如细胞增殖、生长、分化、细胞凋亡、细胞周期^[2]。每种 mRNA 可被多种 miRNA 调控, 但调控效率有所不同, 相反的单个 miRNA 可以靶向不同 mRNA。miRNA 水平及所调控基因沉默对人类健康及疾病发

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81573220)。

△ 通信作者, E-mail: m17318894531@126.com。

本文引用格式: 王倩倩, 任传利. miR-486-5p 在肿瘤发生与发展及其他疾病中的最新研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(22): 2801-2804.