

## ARTÍCULO ORIGINAL

# La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México

Patricia Manzano-Gayosso,<sup>a\*</sup> Luis J. Méndez-Tovar,<sup>b</sup> Francisca Hernández-Hernández<sup>a</sup>  
y Rubén López-Martínez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

<sup>b</sup>Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología "Ernesto Macotela", Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS  
México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 12 de octubre de 2007

Aceptado: 12 de octubre de 2007

## RESUMEN

**Antecedentes:** Mundialmente se ha observado incremento en los casos de micosis asociada a falla terapéutica. Ante el desconocimiento real de este fenómeno en México, se decidió estudiar la resistencia a antifúngicos.

**Material y métodos:** Se evaluaron 76 aislamientos de pacientes del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social: 36 con dermatofitosis y 40 con candidiasis. Para dermatófitos se utilizó el método E-test® y para *Candida* spp. el método de microdilución en caldo. Los antimicóticos fueron itraconazol, ketoconazol y fluconazol para dermatófitos; además, voriconazol y anfotericina B para levaduras.

**Resultados:** De los 36 dermatófitos, siete (19.4%) fueron resistentes a uno o más antifúngicos: tres *Trichophyton rubrum*, tres *T. mentagrophytes* y un *T. tonsurans*. Un *T. rubrum* mostró resistencia a los tres azoles; los seis aislamientos restantes fueron resistentes sólo a fluconazol. De los 40 aislamientos de *Candida*, 11 (27.5 %) mostraron resistencia: siete a ketoconazol e itraconazol; tres sólo a itraconazol y uno a ketoconazol. Un aislamiento de *C. glabrata* fue resistente a los cuatro azoles. Ninguna de las levaduras mostró resistencia a anfotericina B.

**Conclusiones:** La falla terapéutica podría deberse a fenómenos de resistencia. En este trabajo se encontró una resistencia a antifúngicos de 20 y 27.5% en dermatófitos y levaduras, respectivamente.

## Palabras clave:

Dermatófitos, *Candida*, resistencia antifúngica, azólicos

## Introducción

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un hecho conocido desde hace más de 50 años. Respecto a los hongos, este fenómeno era poco frecuente en los ochenta del siglo pasado.<sup>1</sup> En los últimos años, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interac-

## SUMMARY

**Background:** An increase in mycosis associated with therapeutic failure has been observed worldwide. The dearth of data in Mexico led us to study antifungal resistance.

**Material and methods:** Seventy six isolates of patients from the Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social were included: 36 with dermatophyoses and 40 with candidiasis. Dermatophytes were assessed using the E-test method and *Candida* spp. using the broth microdilution method. Antifungal drugs included itraconazole, ketoconazole and fluconazole for dermatophytes; in addition, voriconazole and amphotericin B were used to treat yeasts.

**Results:** From the 36 dermatophytes, seven isolates (19.4%) showed resistance to one or more antifungal drugs: three to *Trichophyton rubrum*, three to *T. mentagrophytes* and one to *T. tonsurans*. One *T. rubrum* isolate was resistant to the three azoles; the other six isolates were resistant to fluconazole only. From the 40 Candida isolates, 11 (27.5%) showed resistance: seven to ketoconazole and itraconazole; three only to itraconazole and one to ketoconazole. One *C. glabrata* isolate showed resistance to the four azoles. None of the yeasts showed resistance to amphotericin B.

**Conclusion:** Therapeutic failure could be caused by drug resistance. In our study we found an antifungal resistance of 20% and 27.5% in dermatophytes and in yeasts respectively.

## Key words:

Dermatophytes, *Candida*, antifungal resistance, azoles

ciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria.<sup>2-4</sup>

Durante muchos años, los compuestos antimicóticos fueron escasos y poco efectivos. Para el tratamiento de las micosis superficiales se contaba únicamente con griseofulvina y nistatina. A partir de mediados del siglo pasado, la comercialización de anfotericina B, aunque tóxica, ayudó de manera importante en el tratamiento de micosis sistémicas.<sup>5</sup> Con el advenimiento de los azoles tópicos como el miconazol y clotrimazol, y posteriormente los azoles sistémicos como

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Patricia Manzano-Gayosso. Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Tel.: 5623 2458. Correo electrónico: angelesmg@liceaga.facmed.unam.mx.

ketoconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol, el tratamiento de las micosis superficiales y sistémicas se simplificó, mejorando las expectativas de curación en estas infecciones.<sup>6</sup>

Sin embargo, con la pandemia del sida, así como por el uso indiscriminado de drogas esteroides, cirugías y trasplantes, muchos investigadores notaron la aparición de casos de fallas en la terapéutica antimicótica a diversos compuestos como ketoconazol, fluconazol e incluso anfotericina B.<sup>7-9</sup>

En México, aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos; en algunos casos ha sido posible demostrar deficiencias inmunológicas.<sup>10,11</sup> En otros, el comportamiento clínico hace sospechar resistencia primaria o secundaria a los antifúngicos, principalmente en quienes reciben estos medicamentos como profilaxis (en casos de trasplantes, sida, enfermedades autoinmunes tratadas con corticosteroides) o tratamientos repetidos por micosis recidivantes.

Con estos antecedentes, en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, se decidió investigar la resistencia antifúngica en dermatófitos, agentes más frecuentes causantes de micosis superficiales, así como en levaduras del género *Candida*, principal causa de micosis oportunistas.

## Material y métodos

**Cepas:** se estudiaron 36 aislamientos de dermatófitos de pacientes con infecciones de diferentes zonas corporales: uñas, 19 casos; piel glabra, ocho; superficie plantar, seis; ingle, dos; cabeza, uno. Fueron obtenidos de 23 mujeres y 13 hombres adultos. Las especies de dermatófitos aisladas fueron *Trichophyton rubrum*, 25; *T. mentagrophytes*, seis; *T. tonsurans*, tres; *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum canis*, un aislamiento de cada especie. Los aislamientos fueron conservados en agar dextrosa Sabouraud con antibióticos a 25 °C.

Para determinar la sensibilidad o resistencia, en los dermatófitos se utilizó el método de E-test® siguiendo las indicaciones del fabricante para hongos filamentosos y que ya han sido ensayadas por otros autores.<sup>12</sup> Los aislamientos fueron cultivados en agar lactrimel y se incubaron durante siete días a 28 °C. Los conidios fueron suspendidos en solución salina a 0.85% y la concentración se ajustó a  $1 \times 10^6$  conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer. Con un hisopo estéril, la suspensión fue aplicada de manera homogénea sobre placas de agar-RPMI (Gibco); una vez seco el inóculo, se aplicaron las tiras impregnadas con ketoconazol, itraconazol o fluconazol, compuestos disponibles institucionalmente para el tratamiento de las dermatofitosis. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas y después a 28 °C. Las cajas fueron revisadas diariamente durante cinco días y se registró la concentración mínima inhibitoria. Aunque no se conocen con precisión los puntos de corte para determinar la sensibilidad o resistencia de los dermatófitos frente a las diferentes drogas antifúngicas, en este estudio fueron consi-

derados los parámetros establecidos por el *Clinical Laboratory Standards Institute* en su documento M38-A para hongos filamentosos: fluconazol  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ ; itraconazol  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ .<sup>13</sup>

Las 40 cepas de *Candida* fueron aisladas de las siguientes formas clínicas: fungemia, 12; candidiasis bucal pseudo-membranosa, 11; onicomicosis, 10; lesiones intertriginosas, tres; infección de vías respiratorias inferiores, tres; artritis, uno. El número de cepas obtenido por especie fue *C. albicans*, 16; *C. tropicales*, ocho; *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. famata* y *C. dubliniensis*, tres de cada una; dos aislamientos de *C. kefyr* y un aislamiento de *C. humicola* y de *C. guilliermondii*.

La sensibilidad de *Candida spp.* se determinó siguiendo las indicaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* en su documento M27-A2.<sup>14</sup> Se prepararon placas depositando 100 µl de diluciones decrecientes de los siguientes antifúngicos: ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y anfotericina B. Cada pozo fue inoculado con 100 µl de una suspensión de  $1 \times 10^3$  UFC/ml de cada cepa. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 horas. La lectura se realizó visualmente con ayuda de un espejo invertido para determinar la concentración mínima inhibitoria (80% de inhibición de crecimiento). Como control de calidad se utilizaron dos cepas: *C. parapsilosis* (ATCC 22019) y *C. krusei* (ATCC 6258).

## Resultados

De los 36 aislamientos obtenidos de pacientes con dermatofitosis, siete (19.4%) mostraron rangos de concentración mínima inhibitorias correspondientes a resistencia a uno o más de los compuestos azólicos (Cuadro I): dos aislamientos de *T. mentagrophytes* variedad *mentagrophytes* (de tiña del cuerpo) y uno de *T. mentagrophytes* variedad *interdigitale* (de tiña plantar) fueron resistentes a fluconazol; dos aislamientos de *T. rubrum* a partir de onicomicosis fueron resistentes a fluconazol; un tercer aislamiento de esta

**Cuadro I. Respuesta de sensibilidad y resistencia de dermatófitos a compuestos azólicos\***

Dermatófitos (clave del aislamiento)	Sensible	Resistente
<i>T. rubrum</i> (04-509)	-	K, I, F
<i>T. rubrum</i> (04-519)	K, I	F
<i>T. rubrum</i> (05-325)	K, I	F
<i>T. mentagrophytes</i> variedad <i>mentagrophytes</i> (04-504)	K, I	F
<i>T. mentagrophytes</i> variedad <i>mentagrophytes</i> (04-537)	K, I	F
<i>T. mentagrophytes</i> variedad <i>interdigitale</i> (04-711)	K, I	F
<i>T. tonsurans</i> (05-83)	K, I	F

\*Puntos de corte tomados del documento M38-A del *Clinical Laboratory Standards Institute*:<sup>13</sup> Resistente: ketoconazol e itraconazol,  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ; fluconazol  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ . Sensible: ketoconazol e itraconazol,  $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ ; fluconazol,  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ .

K=ketoconazol; I=itraconazol; F=fluconazol.

especie, obtenido de un paciente con tiña plantar recidivante tratada previamente con miconazol tópico y 100 mg de itraconazol por día durante siete días, mostró valores elevados de concentración mínima inhibitoria para los tres azólicos (ketoconazol e itraconazol >32 µg/ml; fluconazol >256 µg/ml). La única cepa de *T. tonsurans* resistente a fluconazol fue obtenida de un caso de tiña de la cabeza.

De los 40 aislamientos obtenidos de pacientes con candidiasis, en 11 (27.5%) se demostró resistencia a uno o varios compuestos azólicos. Los tres aislamientos de *C. glabrata* mostraron resistencia a ketoconazol e itraconazol; además, uno fue también resistente a voriconazol y fluconazol. Esta resistencia mostrada por *C. glabrata* contrasta con la observada en *C. albicans*, donde sólo tres de las 16 cepas aisladas mostraron resistencia a ketoconazol e itraconazol. Una de las dos cepas de *C. famata* aislada de un líquido de lavado bronquial fue resistente a ketoconazol e itraconazol; esta cepa correspondió a un paciente con sida que había recibido itraconazol por más de seis meses como profilaxis.

Ninguno de los 12 aislamientos obtenidos de hemocultivos mostró resistencia a los antimicóticos probados. Los 40 aislamientos de levaduras estudiados fueron sensibles *in vitro* a anfotericina B (Cuadro II).

## Discusión

Mientras que algunas patologías virales o parasitarias han disminuido su frecuencia, las infecciones micóticas han registrado un incremento constante. U.S. National Center for Health Statistics informa que del total de infecciones, las micosis ocupan el séptimo lugar como causa de muerte; también se hace mención que de 1980 a la fecha el número de decesos por infecciones fúngicas se ha triplicado,<sup>15</sup>

**Cuadro II. Respuesta de resistencia de especies de *Candida* a compuestos azólicos\***

Especie y forma clínica	Sensibilidad dosis dependiente	Resistente
<i>C. glabrata</i> (intertrigo)	V, F	K, I
<i>C. glabrata</i> (bucal)	V, F	K, I
<i>C. glabrata</i> (onícomicosis)	-	K, I, V, F
<i>C. albicans</i> (bucal)	-	K, I
<i>C. albicans</i> (bucal)	-	K, I
<i>C. albicans</i> (bucal)	-	K
<i>C. famata</i> (bronquial)	F	K, I
<i>C. famata</i> (onícomicosis)	-	I
<i>C. guilliermondii</i> (onícomicosis)	-	I
<i>C. dubliniensis</i> (bucal)	-	K, I, V, F
<i>C. parapsilosis</i> (onícomicosis)	-	I

\*Puntos de corte tomados del documento M27-A2 del Clinical Laboratory Standards Institute.<sup>14</sup> Resistencia: ketoconazol ≥1 µg/ml; itraconazol ≥1 µg/ml; fluconazol ≥64 µg/ml; voriconazol ≥4 µg/ml. Sensibilidad dosis-dependiente: ketoconazol, 0.25-0.5 µg/ml; itraconazol, 0.25-0.5 µg/ml; fluconazol, 16-32 µg/ml; voriconazol, 2 µg/ml.

K=ketoconazol; I=itraconazol; F=fluconazol; V=voriconazol.

siendo las principales causas la candidiasis y la aspergilosis.<sup>16</sup> Mundialmente, este incremento se ha relacionado con diversos factores entre los que sobresalen el aumento de población con diabetes mellitus, el número de padecimientos oncológicos, corticoterapia, trasplantes y sida.

El advenimiento de los compuestos azólicos para aplicación tópica como el clotrimazol, econazol y miconazol se dio entre 1959 y 1960. En 1967 apareció el ketoconazol de administración tópica y bucal, convirtiéndose en el estándar de oro terapéutico durante varios años. Finalmente, los triazólicos como el itraconazol, fluconazol y voriconazol (estos últimos disponibles para aplicación endovenosa), aunados a su amplio espectro y baja toxicidad, motivó a muchos investigadores a suponer que el problema de las infecciones micóticas tendían a desaparecer.<sup>17</sup>

Debido al uso profiláctico de antimicóticos durante largos períodos en pacientes con inmunosupresión, Evans<sup>18</sup> manifestó el riesgo de aparición de cepas resistentes en hongos causantes de micosis sistémicas, como ya se había demostrado, y también en agentes de micosis superficiales como las onícomicosis.

Recientemente, Silva Barros y Hamdan<sup>19</sup> estudiaron la sensibilidad de cepas de *T. mentagrophytes* aisladas de onícomicosis y encontraron que esta especie tenía baja sensibilidad a fluconazol, siendo las mejores alternativas de tratamiento la terbinafina y el itraconazol. En 2006, Santos y Hamdan<sup>20</sup> ampliaron los estudios de sensibilidad e incluyeron, además de *T. mentagrophytes*, a *T. rubrum*; los resultados de este estudio confirmaron que el fluconazol tiene menor actividad que otros azoles. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, donde de las siete cepas resistentes de dermatófitos, tres de *T. mentagrophytes* mostraron resistencia a fluconazol.

La candidiasis es la infección oportunista más frecuente en los pacientes hospitalizados. En Estados Unidos de América, las infecciones nosocomiales ocupan el primer lugar como causa de muerte entre las micosis.<sup>16</sup> En el Hospital de Especialidades donde se llevó a cabo este estudio no se tiene contabilizado el número de decesos por candidiasis. Sin embargo, en un estudio realizado durante 2005 en pacientes con síndrome febril, 10% de los hemocultivos fueron positivos a *Candida sp.* (datos de la encuesta epidemiológica del hospital, no publicados); por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento oportuno de estas infecciones es de suma importancia.

En las infecciones por levaduras, en repetidas ocasiones se ha demostrado resistencia a uno o varios antifúngicos; algunas especies como *C. krusei* presentan resistencia intrínseca a fluconazol;<sup>21</sup> en otras especies parece cumplirse la suposición de Evans<sup>18</sup> acerca del desarrollo de resistencia secundaria. Los mecanismos postulados para explicar la resistencia son varios: alteración en la penetración de la droga causada por genes como CDR1 y CDR2, modificación de la molécula blanco (desmetilasa del lanosterol) asociada a genes como ERG11 y alteración de Δ<sup>5,6</sup> esterol desaturasa.<sup>22</sup> A pesar de que son pocas las observaciones registradas, una cepa podría presentar más de uno de estos mecanismos, lo que explicaría la multirresistencia desarrollada en algunos hongos.<sup>23</sup>

En pocos hospitales de Latinoamérica se documenta la causa de la falla terapéutica;<sup>24</sup> sin embargo, es un hecho de observación clínica cada vez más frecuente que algunos pacientes con micosis superficiales o sistémicas no responden al tratamiento antimicótico a pesar de que los esquemas de tratamiento son correctos. Aunque los resultados de resistencia/sensibilidad *in vitro* no correlacionan totalmente con las observaciones clínicas, los datos obtenidos en este trabajo muestran la relevancia actual de este fenómeno en pacientes mexicanos, ya que se observó resistencia en casi 20% de los dermatófitos estudiados y en 27.5% de las cepas de *Candida*. Lo anterior resalta la importancia de realizar estudios de sensibilidad en todos los aislamientos fúngicos obtenidos de pacientes con micosis superficiales asociadas a falla terapéutica, y, por su gravedad, en todos los casos de micosis sistémicas.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT, con número de registro IN215302, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

## Referencias

- Hudson MM. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: a current perspective. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:345-350.
- Vesell ES. On the significance of host factors that affect drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 1982;31:1-7.
- Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003;36:S31-S41.
- Bradley MC, Leidich S, Isham N, Elewski BE, Ghannoum MA. Antifungal susceptibilities and genetic relatedness of serial *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis of the toenail. *Mycoses* 1999;42:S105-S110.
- Chapman SW, Cleary JD, Rogers PD. Amphotericin B. En: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical mycology*. Philadelphia, EUA: Oxford University Press; 2003. pp. 33-48.
- Fromting RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:187-217.
- Horsburgh CR, Kirkpatrick CH. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. *Am J Med* 1983;74:23-29.
- Fox R, Neal KR, Leen CL, Ellis ME, Mandal BK. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J Infect* 1991;22:201-204.
- Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C, et al. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:196-199.
- Méndez-Tovar LJ, Serrano-Jaén L, Almeida-Arvizu VM. Cefotaxima más amikacina asociadas a inmunomodulación en el tratamiento de actinomicetoma resistente a tratamiento convencional. *Gac Med Mex* 1999;135:517-521.
- Serrano-Jaén L, Méndez-Tovar LJ, Almeida-Arvizu V, Manzano-Gayoso P, Córdoba-Martínez E, Bazán-Mora E, et al. Dermatofitosis diseminada crónica asociada a fagocitosis deficiente tratada con antimicóticos e inmunostimulación fagocitaria. *Gac Med Mex* 2006;142:415-417.
- Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* 1999;37:1480-1483.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
- Pinner RW, Teutsch SM, Simonsen L, Klug LA, Gruber JM, Clarke MJ, et al. Trends in infectious diseases mortality in the United States. *JAMA* 1996;275: 189-193.
- McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001;33:641-647.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:40-79.
- Evans EG. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:S32-S36.
- Da Silva-Barros ME, Hamdan JS. Determination of susceptibility/resistance to antifungal drugs of *Trichophyton mentagrophytes* isolates by a macrodilution method. *Can J Microbiol* 2005;51:983-987.
- Santos DA, Hamdan JS. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. *Med Mycol* 2006;44:357-362.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis *in vitro*-*in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997;24:235-247.
- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-517.
- Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Estivill D, Montserrat L, Carceller A, Hernández-Molina JM, et al. Resistencia *in vitro* al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:50-54.
- Silva VV, Díaz JMC, Febré N, Red de Diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infec* 2002;19:S149-S156.