

ARTÍCULOS ORIGINALES

**Tipificación mediante electroforesis de campos pulsantes de cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos presentes en un brote de faringitis en niños**

**Typing by pulsed field gel electrophoresis of beta hemolytic *Streptococcus* strains present in a pharyngitis outbreak in children**

Esperanza Niubó Crespo<sup>I</sup>, Margarita Valdes-Dapena<sup>II</sup>, Viana Manrique-Suárez<sup>I</sup>, Yaumara López-Carballo<sup>I</sup>, Julián Pérez Amarillo<sup>II</sup>, Yigany Vila de Armas<sup>II</sup>, Ana María Riverón Rojas<sup>I</sup>, Lilia Lopez-Canovas<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez". La Habana, Cuba.

---

**RESUMEN**

**Introducción:** en infecciones por *Streptococcus* beta hemolíticos los del grupo A de Lancefield son el principal causante de faringitis en niños, y entre los no A los del Grupo C ocupan un lugar importante.

**Objetivo:** tipificar molecularmente las cepas que participaron en un brote de faringitis en niños y demostrar la utilidad de la técnica de electroforesis de campos pulsantes en la identificación de las cepas circulantes.

**Métodos:** se caracterizaron mediante electroforesis de campos pulsantes 12 aislados de *Streptococcus* beta hemolíticos pertenecientes a niños atendidos en el Hospital Juan Manuel Márquez durante un brote de faringitis aguda en los meses de enero a marzo de 2008.

**Resultados:** mediante el test de seroagrupamiento se encontró que 6 de los aislados, correspondiente al primer periodo del brote, eran *Streptococcus* del grupo C y los otros 6 aislados clasificaron como *Streptococcus pyogenes*, con una mayor presencia en la segunda etapa del brote. La subtipificación mediante la macrorrestricción con Sma I y electroforesis de campos pulsantes mostró la existencia de dos poblaciones clonales consecutivas durante el brote.

**Conclusiones:** los resultados obtenidos demuestran la utilidad que pudiera tener la subtipificación de aislados mediante electroforesis de campos pulsantes durante un brote o una reemergencia facilitando el control epidemiológico, la localización de la fuente y la toma de decisiones cuando esta fuera necesaria.

**Palabras clave:** electroforesis de campos pulsantes, subtipación, macrorrestricción, *Streptococcus* beta hemolíticos, clones, brote de faringitis, seroagrupamiento.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** in the context of infection by beta hemolytic Streptococci, Lancefield group A is the main cause of pharyngitis in children, whereas Streptococci C play an important role in the non group A.

**Aims:** the purpose of the study was to molecularly typify the strains involved in a pharyngitis outbreak in children, and show the usefulness of pulsed field gel electrophoresis technique for identification of circulating strains.

**Methods:** twelve beta hemolytic Streptococcus isolates from children cared for at Juan Manuel Márquez hospital were characterized by pulsed field gel electrophoresis during an acute pharyngitis outbreak from January to March 2008.

**Results:** the serogrouping test found that six of the isolates, corresponding to the first stage of the outbreak, were group C Streptococci, whereas the other six classified as *Streptococcus pyogenes*, with a greater presence in the second stage. Subtyping by Sma I macrorestriction and pulsed field gel electrophoresis revealed the presence of two consecutive clonal populations during the outbreak.

**Conclusions:** results show the potential usefulness of subtyping isolates with pulsed field gel electrophoresis during an outbreak or an instance of re-emergence, thus facilitating epidemiological control, location of the source, and decision making when required.

**Keywords:** pulsed field gel electrophoresis, subtyping, macrorestriction, beta hemolytic Streptococcus, clones, pharyngitis outbreak, serogrouping

---

## INTRODUCCIÓN

Un brote epidémico puede definirse como la ocurrencia de un número significativamente anormal de casos en un periodo corto, en un sector geográfico bien delimitado, ya sea provincia, ciudad o institución. Su demarcación estará dada por las circunstancias epidemiológicas: consumo de determinado alimento, red de agua o características de la población respecto a la propagación de la enfermedad que implique exposición a un riesgo común.<sup>1-3</sup>

Tradicionalmente se ha establecido que el *Streptococcus* del grupo A de Lancefieldes es el patógeno causante de las faringitis agudas en la población infantil. Sin embargo, existen reportes de brotes epidémicos de faringitis en niños en los que el agente etiológico ha sido *Streptococcus dysgalactiae* subespecies *equisimilis* (SDSE), conocidos con el nombre de *Streptococcus* beta hemolíticos de los grupos C y G.<sup>4,5</sup>

El *Streptococcus* del grupo C ha sido reconocido como un importante patógeno bacteriano, con un espectro clínico de enfermedades asociadas muy semejantes a las infecciones por *Streptococcus pyogenes*, incluyendo la ocurrencia de secuelas postestreptocócicas.<sup>4,6,1,3</sup> Las epidemias de faringitis por *Streptococcus* del grupo C se han asociado con la ingesta de productos contaminados, incluyendo huevos y leche.<sup>7,8</sup>

Las faringoamigdalitis por estreptococos beta hemolíticos tiene una incidencia variable en distintos países. Zuazo, Nordet, Perez Amarillo y colaboradores realizaron estudios clínicos, epidemiológicos y bacteriológicos en diferentes provincias de Cuba, hallando que la mayoría de los aislados obtenidos de exudados faríngeos de niños se clasificaron como grupos A, C, G y B. El mayor porcentaje correspondió al grupo A y el menor al B.<sup>9</sup>

Solamente unos pocos laboratorios identifican a los *Streptococcus* de los grupos C y G a nivel de especie; por ello no se conoce el número exacto de infecciones por SDSE en seres humanos.

Los métodos de subtipificación molecular de microorganismos son la base de los programas de vigilancia epidemiológica actuales.<sup>10</sup> Estos métodos comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos patógenos, lo cual facilita su control y la toma de medidas para evitar su diseminación. La Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP) constituye el estándar de oro para la subtipificación molecular bacteriana porque permite analizar el genoma completo de las bacterias en un único experimento.<sup>11</sup> Mediante la ECP es posible separar en forma de un patrón de bandas los macrofragmentos de restricción del ADN genómico de las bacterias. La comparación de los patrones de bandas de diferentes aislados de una misma especie permite determinar las diferencias genéticas entre ellos y clasificarlos en subtipos,<sup>12</sup> así como reconocer la relación epidemiológica entre aislados y, por tanto, si son derivados recientes de un microorganismo ancestral común. A la vez debe diferenciar aislados no relacionados, independientemente de que pertenezcan a la misma especie microbiológica o taxón. Esta técnica explora la organización del ADN cromosómico bacteriano, dando información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A (BHGA) es un patógeno humano de interés epidemiológico que es tipificado comúnmente por ECP.<sup>13</sup>

En el presente estudio se hace un análisis del genotipo en una pequeña muestra de bacterias aisladas en niños atendidos en el hospital pediátrico Juan Manuel Márquez de La Habana durante un brote de faringitis durante los meses de enero a marzo del año 2008. La muestra se tomó al azar entre los cultivos del exudado faríngeo que mostraron ser sensibles a la Bacitracina y presuntivamente clasificados como *Streptococcus* del grupo A.

## MÉTODOS

Se estudiaron 12 cultivos procedentes de niños que fueron atendidos en consulta de otorrinolaringología y en urgencias por presentar una sintomatología que incluyera dolor de garganta u odinofagia y fiebre. Al examen físico presentaban los signos de una faringitis causada por *Streptococcus pyogenes*.

Las muestras fueron tomadas por hisopado de ambas amígdalas y pared posterior de la orofaringe y fueron sembradas directamente en placas de agar sangre de carnero al 5% e incubadas a 37°C durante 24 horas. Las colonias beta hemolíticas fueron aisladas y resembradas en igual medio y sometidas a la prueba diagnóstica de sensibilidad al disco de bacitracina en concentración de 0.04U. Aquellos cultivos que mostraron ser sensibles a la bacitracina se clasificaron presuntivamente como *Streptococcus pyogenes*.<sup>14</sup> De estos cultivos se tomó una asada y se conservó en caldo corazón cerebro con glicerol al 20 % a - 70° C.

Para el estudio del genoma y serotipado se tomaron 100 microlitros de cada cultivo crioconservado, resuspendidos en 5 ml de caldo corazón cerebro y puestas a cultivar durante 18 horas a 37° C. Posteriormente se tomó una asada de este cultivo y se sembró en placa con agar corazón cerebro y sangre de carnero al 5 %, y se comprobaron la hemólisis de tipo beta y las características morfológicas de las colonias.

**Selección de la muestra:** se tomaron al azar 12 muestras de las cepas crioconservadas pertenecientes al 2008 que mostraban viabilidad ([Tabla](#)). Se adicionaron al estudio otras cepas de *Streptococcus pyogenes* para la comparación; entre ellas, una del año 2006, otra del 2007 y la cepa de referencia ATCC 315.

**Seroagrupamiento de las muestras:** todos los cultivos fueron probados con el kit SLIDE Strepto Plus de la marca bioMerieux para clasificar serológicamente a las cepas mediante aglutinación con antisueros específicos a *Streptococcus* de los grupos A, B, C, D y G de Lancefield.

**Preparación de las muestras de ADN para ECP:** se utilizó el tratamiento semienzimático descrito previamente para la liberación del ADN<sup>15-17</sup> modificada en algunos pasos. Una vez solidificada la agarosa con las células enteras, los insertos fueron sometidos a incubación durante 4 h a 37 °C en disolución de lisis compuesta por disolución 5 del Backit (Neuronic S.A.) y lisozima (Sigma) 1 mg/mL. Posteriormente, los minibloques se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se incubaron durante 2 h con disolución 4 del Backit para su desproteización. El ADN contenido en los insertos se sometió a digestión con 10U de enzima de restricción de baja frecuencia de corte Sma I (Sigma) durante 2 horas a 25° C.

**Corrida electroforética de las muestras:** los fragmentos de restricción se resolvieron en un gel de agarosa 1,5 %, disolución reguladora TBE 0,5X (Tris 44,5 mmol/L, ácido bórico 44,5 mmol/L y EDTA 1 mmol/L pH 8,3) a 20° C y aplicando en la minicámara CHEF del Guefast-06 (Neuronic S.A.)<sup>18-20</sup> 10 V/cm y una rampa de tiempos de pulsos discontinua desde 25 hasta 3 seg con una duración total de 4 h 30 min. Finalmente, el gel conteniendo las bandas de ADN fue teñido con Bromuro de etidio 0,5 µg/mL durante 30 min y fotografiado digitalmente.

**Procesamiento de los datos:** las fotos digitales de las corridas fueron introducidas en el programa informático GuefastScan<sup>21</sup> y sus perfiles moleculares fueron comparados mediante el coeficiente de similitud DICE.<sup>3,22</sup> El agrupamiento de las diferentes muestras fue realizado utilizando el algoritmo UPGMA <sup>23</sup>(“unweighedpairgroupmatching análisis”) contenido en el programa GuefastScan.

## RESULTADOS

Las cepas crioconservadas se mantuvieron puras y crecieron bien en los medios enriquecidos, formando colonias mayores de 0,5 mm y mostrando la beta hemólisis característica. La prueba serológica para la identificación de las diferentes cepas identificó a 8 muestras como pertenecientes al grupo A (6 pertenecientes al brote y las 2 controles) y a 6 muestras como pertenecientes al grupo C de Lancefield ([Tabla](#)).

### Tipificación de Strepto Beta Hemolítico mediante ECP

La restricción con Sma I del ADN bacteriano generó patrones con 7 bandas para los *Streptococcus* A y 6 bandas para los *Streptococcus* C. Para analizar la relación clonal entre los aislados mediante el uso de Sma I y los patrones obtenidos mediante electroforesis de campos pulsados, se generó un dendrograma empleando el algoritmo UPGMA con el coeficiente DICE.

Se formaron 2 clusters distintivos (grupo 1 y grupo 2) con 9 de las 12 cepas provenientes del brote, con un coeficiente de similitud de 100 % cada uno. De los 8 aislados de *Streptococcus* del grupo A analizados, 3 compartían el mismo patrón ([Figura 1](#), líneas 3, 6 y 8) conformando el grupo 2 ([Figura 2](#)), los 5 aislados restantes, incluyendo a los 2 controles de los años 2006 y 2007, diferían de este grupo y eran además diferentes entre sí. Los 6 aislados de *Streptococcus* del grupo C mostraron un patrón único ([Figura 1](#), líneas 1, 5 y 7) para todas las muestras, conformando el grupo 1 ([Figura 2](#)).

El rango de los pesos moleculares de las bandas generadas por la SmaI estuvo entre 48 y 436 Kpb lo que permitió que todas las bandas quedaran dentro del gel y se tomaran en su totalidad para el análisis clonal.

## DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo fue la identificación y subtipificación molecular retrospectiva mediante electroforesis de campos pulsantes de las cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos implicados en un brote de faringitis en niños atendidos en los servicios médicos del Hospital Pediátrico Juan M. Márquez en los meses de enero a marzo de 2008. Si bien es importante clínicamente detectar el microorganismo patógeno que está causando un cuadro de faringitis para la elección del tratamiento, no menos importante es conocer qué cepas están circulando en un momento determinado cuando surge un brote en una población o ante la sospecha de infecciones nosocomiales en los servicios hospitalarios.

Todos los pacientes incluidos en esta muestra fueron clasificados clínicamente como faringitis causada por *S. pyogenes*, pero durante este estudio se pudo constatar la presencia de *S. pyogenes* y *S. dysgalactiae*. Existen múltiples agentes causales de faringitis, fundamentalmente relacionados con *Streptococcus* beta hemolíticos y dentro de ellos *S. pyogenes*, pero cada vez se acumulan más evidencias de la participación de *Streptococcus* del grupo C en esta dolencia.<sup>24,25</sup> *Streptococcus* del grupo C es un anaerobio facultativo, capnofílico, catalasa negativo y con propiedades muy similares a otras especies de *Streptococcus*, puede ser bacitracina sensible<sup>26,27</sup> y eleva los niveles de antiestreptolisina O en sangre,<sup>28</sup> por lo que sumado a la semejanza del cuadro clínico ocasionado suele confundirse el diagnóstico sino se clasifican en grupos por estudios serológicos.

Cuando se sospecha la presencia de *Streptococcus* sp es de utilidad disponer de un test serológico para identificar rápidamente con confiabilidad y especificidad aceptables el agente etiológico; pero ello no basta si se desea hacer un estudio epidemiológico de un brote infeccioso o se necesita conocer las cepas circulantes de una especie. Los brotes de enfermedades infecciosas casi siempre resultan de la exposición a una fuente común. Generalmente, el agente etiológico causante del brote se deriva de una sola célula cuya progenie es genéticamente idéntica o está estrechamente relacionada al organismo fuente. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en el brote están clonalmente relacionados o, simplemente, tienen un origen común. En nuestro estudio, mediante electroforesis de campos pulsantes y enzima SmaI, la similitud encontrada intragrupo es del 100 % en cada uno de los dos grupos identificados, lo cual habla de clones de una misma cepa.

Los dos grupos identificados en la muestra estudiada son parentales muy distantes (2 % de similitud). La diferencia encontrada se justifica por pertenecer ambos a grupos de Lancefield diferentes (*Streptococcus* grupos A y C). Las otras 3 cepas del grupo A, no coincidentes entre ellas o con los controles, ni con los grupos 1 y 2 procedieron posiblemente a casos aislados ocasionados por cepas que estaban circulando en esa población antes del brote, sumándose a la estadística del brote.

Partiendo de una pequeña muestra resulta riesgoso emitir aseveraciones categóricas; sin embargo, puede asumirse que nuestros resultados moleculares señalan la existencia de dos brotes secuenciales que comenzaron en el mes de enero con una cepa de *Streptococcus* del grupo C a la que se adicionó posteriormente el brote relacionado a *Streptococcus pyogenes* (ver Tabla). Los hallazgos de este trabajo demuestran que brotes epidémicos pueden ser ocasionados por diferentes clones bacterianos circulantes que difieren en sus rasgos patogénicos. La ECP en mini CHEF de los fragmentos de restricción con Sma I del ADN de *Streptococcus* genera

fragmentos de ADN con un gran poder discriminatorio,<sup>29</sup> brindando información acerca del origen clonal de las muestras que no es posible obtener mediante los métodos fenotípicos disponibles en los laboratorios clínicos de microbiología.

La información obtenida del brote del 2008 fue retrospectiva; pero, de haberse realizado en el momento de su aparición, se habría podido detectar la fuente contaminante del *Streptococcus*C (posiblemente en algún alimento), en el territorio afectado, y la toma de medidas para su control y erradicación.

## Agradecimientos

Al Dr. Rodolfo Notario , CIBIC, Rosario, Argentina, por enriquecer este documento con su revisión. Este trabajo fue financiado en parte por el Centro de Neurociencias de Cuba y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal de México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grein, TW, Kamara KB, Rodier G, Plant AJ, Bovier P, Ryan MJ, et al. Rumors of disease in the global village: outbreak verification. *Emerg. Infect. Dis.* 2000;6:97-102.
2. Van BA, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46.
3. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:2233-2239.
4. Zaoutis T, Attia M, Gross R, Klein J. Papel de los Estreptococos de los grupos C y G en la faringitis aguda en niños. *Clinical Microbiol. Infect.* 2004;10:37-40.
5. Benjamin JT, Perriello VA. Jr. Pharyngitis due to group C hemolytic streptococci in children. *J. Pediatr.* 1976;89:254-256.
6. Efstratiou A. Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 1997;26:72S-79S.
7. Barnham M, Thornton TJ, Lange K. Nephritis caused by *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C). *Lancet* 1983;1:945-948.
8. Ghoneim AT, Cooke EM. Serious infection caused by group C streptococci. *J. Clin. Pathol.* 1980;33:188-190.
9. Llop A, Valdes-Dapena M, Zuaso JL. Microbiología y Parasitología médica; 2001; Vol. 19;165-178.

10. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43: 3095-3100.
11. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz. J. Infect. Dis.* 2003;7:32-43.
12. Thong KL, Ling GY, Kong LW, Theam LC, Ngeow YF. Macrorestriction analysis of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) isolates from Malaysia. *J. Med. Microbiol.* 2004;53: 991-997.
13. Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Boissinot C, Brahimi N, Aujard Y, et al. Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.* 1992;165: 147-150.
14. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis.* 2002;35:113-125.
15. López-Carballo Y, Garrido Y, Niubó E, Diaz N, Riveron Rojas AM, Lopez-Canovas L. Preparación semi-noenzimática del ADN de *Streptococcus pyogenes* y separación de los macrofragmentos de restricción con Sma I mediante Electroforesis de Campos Pulsantes. *CENIC Ciencias Biológicas* 2009;40:125-127.
16. Higginson-Clarke D, Perez-Perez G, Lopez-Canovas L, Riveron Rojas AM. Non-enzymatic deproteinization of immobilized DNA suitable for pulsed field gel electrophoresis. *Analytical Letters* 1994;27:1255-1264.
17. Lopez-Canovas L, Riveron Rojas AM, Higginson-Clarke D, Sanchez-Alonso A, Orozco E, Arencibia O, et al. Process for rapid microorganism typing and associated kit reagent. *Europa EP1350852*, 2003.
18. Niubó E, Lopez-Canovas L, Riveron Rojas AM, Canales E, Coto O, Noa MD. Identification of small nuclear DNA molecules of Cuban sugarcane cultivar Ja60.5 by pulsed field gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology Reporter* 2005;23: 81-82.
19. Riveron Rojas AM, Lopez-Canovas L, Herrera-Isidron J, Ruiz-Esquivel L, Higginson-Clarke D, Noa MD, et al. Molecular weight and kinetic parameters of DNA undergoing pulsed field gel electrophoresis. *Arch. Med. Res.* 1994;25:193-198.
20. Riveron Rojas AM, Herrera-Isidron J, Ruiz-Esquivel L, Baez-Camargo M, Lopez-Canovas L, Noa MD, et al. Hardware and memory resident program for simultaneous control and switching of Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Analytical Letters* 1995;28: 845-860.



21. Corrales F, Lopez-Canovas L, Herrera-Isidron J, Riveron Rojas AM. Procedimiento bioinformático para la subtipación molecular de *Streptococcus pyogenes*. VI Congreso internacional de Química e ingeniería Química. III Simposio Internacional de bioquímica y Biología molecular 2006.
22. Murase T, Suzuki R, Osawa R, Yamai S. Characteristics of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 and M3 isolates from patients in Japan from 1981 to 1997. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:4131-4134.
23. Michener CD, Sokal RR. A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution* 1957;11:490-499.
24. Borda N, Gambande T, Sutich E, Ponessa A, Notario R. Características de la angina debida a *Estreptococos* beta hemolíticos no grupo A. *Rev Med Rosario* 2011;77:138-141.
25. Elizondo A, Salas J, Faingezicht I. *Streptococcus* beta hemolítico grupo C en la microbiología de la faringitis bacteriana. *Hospital de niños. Cost. Cienc. Med.* 1989;10:41-50.
26. Pollock HM, Dahlgren BJ. Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening. *Appl. Microbiol.* 1974;27:141-143.
27. Godmann D, Coobs G. Group C Streptococcal surgical wound infections transmitted by anorectal and nasal carrier. *Pediatrics.* 1978;61:235-237.
28. Kaplan EL, Top FH Jr, Dudding BA, Wannamaker LW. Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. *J. Infect Dis.* 1971;123:490-501.
29. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Curr. Microbiol.* 1997;34:226-229.

Recibido: 10 de enero de 2015.  
Aprobado: 20 de marzo de 2015.

*Esperanza Niubó Crespo* . Investigador auxiliar. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ave. 25 y 158, Cubanacán. La Habana, Cuba. Teléfono: +53 7208 5236.