



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Staphylococcus lugdunensis: un estafilococo coagulasa negativo diferente de los demás

Staphylococcus lugdunensis: a unique coagulase-negative staphylococcus

Emilia Cercenado

Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

On-line el 25 de febrero de 2009

Los estafilococos coagulasa negativos (SCoN) se encuentran entre los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología. Su significado clínico en muchas situaciones es difícil de establecer, ya que son comensales de la piel y de las mucosas y generalmente se han considerado inoos o patógenos oportunistas con escasa virulencia¹. Sin embargo, en los últimos tiempos el protagonismo de los SCoN como patógenos es creciente, especialmente como agentes causales de bacteriemia y de infecciones asociadas a dispositivos médicos, a lo que hay que añadir su resistencia a múltiples clases de antimicrobianos^{2,3}. A pesar de ello, las infecciones causadas por SCoN, a diferencia de las producidas por *Staphylococcus aureus*, se manifiestan como enfermedades menos graves o subagudas que raramente se asocian a una elevada mortalidad³. La excepción a esta regla entre los SCoN es la especie *Staphylococcus lugdunensis*. Las especiales características de virulencia, microbiológicas, clínicas y de sensibilidad a antimicrobianos de esta especie la hacen única y diferente de otros SCoN. *S. lugdunensis*, descrito por algunos autores como “un lobo con piel de cordero”⁴, se comporta más como *S. aureus* que como un típico SCoN en muchos aspectos, especialmente por su gran virulencia y por su capacidad para producir infecciones supuradas.

La especie *S. lugdunensis* fue descrita por Freney et al⁵ en 1988; el término *lugdunensis* deriva de Lugdunum, nombre latino de Lyon, ciudad donde se aisló por primera vez. *S. lugdunensis* forma parte de la microbiota de la piel y además es un patógeno humano infrecuente pero no raro. Aunque se ha descrito con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades de base o en los que reciben terapias inmunosupresoras, también puede causar tanto infecciones superficiales como profundas en individuos sanos^{6,7}. La diabetes, la inmunodepresión, las neoplasias, la insuficiencia renal crónica, los traumatismos y la cirugía previa son los factores de riesgo que se describen con más frecuencia en las infecciones

producidas por *S. lugdunensis*^{4,8,9}. La piel, y especialmente las abrasiones cutáneas, son la puerta de entrada más frecuente. Este microorganismo principalmente coloniza la región perineal, aunque también se ha encontrado en las fosas nasales de pacientes en hemodiálisis o de individuos sanos^{4,9}. Como patógeno es causante de infecciones nosocomiales y comunitarias que se pueden desarrollar con agresividad y con gravedad. Tal es el caso de la endocarditis, principalmente sobre válvula nativa, pero también sobre válvula protésica, que suele tener una evolución clínica fulminante, cursa con destrucción de la válvula y formación de abscesos y recuerda a las infecciones producidas por *S. aureus*^{1,4,8,10}. Aunque *S. lugdunensis* no causa infección con la misma frecuencia que *S. aureus* o *S. epidermidis*, su potencial patógeno no se debe subestimar y se ha asociado, con mayor frecuencia que a la endocarditis, a un amplio espectro de infecciones más leves, como son las infecciones de piel y de tejidos blandos (celulitis, abscesos subcutáneos, mastitis) y las de huesos y articulaciones (osteomielitis crónica, artritis). También se ha descrito como agente causal de bacteriemia, infecciones asociadas a catéter y a prótesis intravasculares, infecciones del sistema nervioso central, peritonitis asociadas a diálisis peritoneal ambulatoria, infecciones del tracto urinario, endoftalmitis posquirúrgicas, infecciones oculares, óticas, orales e infección del tracto urinario, entre otras^{4,11}. A estas diferencias entre la virulencia de *S. lugdunensis* y la de otros SCoN hay que añadir una característica sorprendente de esta especie y es que la mayoría de las cepas de *S. lugdunensis* son sensibles a un gran número de antimicrobianos^{4,8,9}. La relativa ausencia de diversidad genética observada entre las distintas cepas de esta especie y la alta prevalencia de sensibilidad a múltiples agentes antimicrobianos sugieren que la evolución de *S. lugdunensis* se ha producido por una vía distinta de la de otras especies patógenas de SCoN. Dadas estas diferencias, siempre que se aisle *S. lugdunensis* a partir de muestras clínicas debe considerarse como un patógeno, y sólo ocasionalmente se puede considerar como contaminante o colonizador¹¹.

Correo electrónico: ecercenado@terra.es

La virulencia de *S. lugdunensis* se debe a múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentra la producción de proteínas de superficie adherentes, que le permiten fijarse a los tejidos y proteínas del huésped, así como a las superficies de cuerpos extraños. La capacidad de *S. lugdunensis* para unirse al fibrinógeno, a la fibronectina y al factor de von Willebrand (glucoproteína involucrada en la coagulación) mediante la *vWf-binding protein* pueden contribuir a su éxito para producir endocarditis⁴. Otro mecanismo de virulencia que utilizan algunas cepas de *S. lugdunensis* es la formación de biofilm, que presenta diferencias importantes con otros SCoN en cuanto a la composición de la matriz del biofilm y a la organización genómica del locus *ica*, lo que sirve como ejemplo de las características diferenciales que este microorganismo ha adquirido durante su evolución⁴. Además, *S. lugdunensis* es resistente a altas concentraciones de lisozima y produce una hemolisina δ -like estable al calor y similar a la δ -hemolisina de *S. aureus*. Esta hemolisina produce sinergia con la β -hemolisina de *S. aureus*, característica que permite detectar su presencia en el laboratorio mediante la observación del fenotipo de sinergia hemolítica (hemólisis completa de los hematíes) en una prueba de aproximación de las dos especies en medio de agar sangre. En *S. aureus* la toxina δ está codificada por el gen *hld*, y en *S. lugdunensis* se ha demostrado la presencia de una secuencia similar a la del gen *hld* codificada en un locus denominado *slush* (*S. lugdunensis synergistic hemolysin*)^{4,12}.

La presencia en el genoma de *S. lugdunensis* de secuencias relacionadas con las del gen regulador accesorio (*agr*) de *S. aureus* contribuye también a la virulencia de este microorganismo. El *agr* (*accessory gene regulator*) estafilocócico es un sistema de *quorum-sensing* que actúa como regulador global de factores de virulencia, particularmente de exoproteínas, incluidas enterotoxinas, hemolisinas y numerosas enzimas modificadoras de proteínas del huésped (lipasas, esterasas, proteasas). En *S. lugdunensis* se han identificado regiones homólogas con el *agr* de *S. aureus* que se transcriben muy activamente. La regulación transcripcional del locus *slush* probablemente está también bajo el control del locus *agr*⁴.

La gran virulencia y la naturaleza destructiva de *S. lugdunensis* son razones suficientes para la rápida identificación de este microorganismo a nivel de especie cuando se sospecha su presencia en una infección y especialmente cuando se aísla de un sitio estéril. Desde su descripción inicial, *S. lugdunensis* ha pasado de ser un hallazgo ocasional como agente causal de patología humana a ser cada vez más frecuente, lo que puede deberse tanto a un mejor conocimiento de sus características microbiológicas, como a un mayor índice de sospecha clínica. Sin embargo, es posible que su incidencia siga aún subestimada si no se efectúa una búsqueda activa de este microorganismo, ya que la identificación de los estafilococos coagulasa negativos a nivel de especie no es una práctica habitual en muchos laboratorios de microbiología, a lo que hay que añadir que esta especie puede confundirse con *S. aureus* en algunas ocasiones debido a la producción del factor de afinidad por el fibrinógeno o *clumping factor*. A diferencia de *S. aureus*, *S. lugdunensis* no posee coagulasa libre (prueba de coagulasa en tubo negativa), pero el 60-80% de las cepas producen una forma de la enzima ligada a la membrana (el denominado *clumping factor*) que da un resultado positivo tanto en la prueba de coagulasa en portaobjetos con plasma humano, como en las pruebas rápidas comerciales de aglutinación con látex, lo que puede conducir a errores de identificación en el laboratorio. No obstante, se debe destacar que la reacción producida por *S. lugdunensis* es más tardía y más débil que la producida por *S. aureus*¹²⁻¹⁴.

A pesar de estas dificultades, *S. lugdunensis* es una especie que se puede identificar en el laboratorio con bastante facilidad. A las 18-24 h de incubación en agar sangre, *S. lugdunensis* presenta distintos morfotipos de colonias con pigmentación variable (desde

color crema o no pigmentadas hasta amarillas o doradas) y con β -hemólisis débil y de expresión variable. Es característico el olor a fuet de estas colonias. A las 48-72 h de incubación, las colonias son más homogéneas y la hemólisis más clara, debido a la producción de la hemolisina δ -like. Como se indicó anteriormente, esta hemolisina, producida por la mayoría de las cepas de *S. lugdunensis*, actúa de modo sinérgico con la β -lisina de *S. aureus* y produce lisis total de los hematíes. En el laboratorio se puede detectar sembrando en una estría la cepa de *S. aureus* y perpendicularmente a 4 mm de separación y en otra estría la cepa de *S. lugdunensis* en medio de agar sangre. Tras 18-24 h de incubación, se observará una zona de hemólisis completa en forma de flecha en el área en la que han difundido las dos hemolisinas. La identificación bioquímica de *S. lugdunensis* solamente requiere la realización de dos pruebas fundamentales para diferenciarlo del resto de los SCoN: la producción de ornitina descarboxilasa (ODC), principal característica siempre presente en esta especie, y la positividad de la prueba de la pirrolidoniil-arilamidasa (PYR). *S. lugdunensis* produce ácido a partir de trehalosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no a partir de manitol. La prueba de la acidificación de la manosa permite diferenciar esta especie de otras que también son PYR positivas. La mayoría de los sistemas comerciales de identificación no incluyen la prueba de ODC en su panel, por lo que si se utilizan estos sistemas es necesario realizar esta prueba adicionalmente para la correcta identificación de *S. lugdunensis*. Otras características que ayudan a la identificación de esta especie son su sensibilidad a la novobiocina y a la polimixina B, aunque algunos autores han indicado que la sensibilidad a este último antimicrobiano puede ser variable¹²⁻¹⁴.

La sensibilidad de *S. lugdunensis* a múltiples clases de antimicrobianos, incluidas las penicilinas, es otra de las características que diferencia a esta especie del resto de los SCoN. Esta sensibilidad se mantiene independientemente del origen del aislamiento. La mayoría de las cepas de *S. lugdunensis* no producen β -lactamasa, principalmente las de origen europeo. Se ha comunicado que la frecuencia de producción de β -lactamasa en esta especie oscila entre el 7 y el 24% en Francia^{4,15}, el 15% en Suecia¹¹, y entre el 12 y el 14% en España^{14,16,17}. En EE. UU., las cifras son superiores a las europeas, y se han descrito tasas entre el 24 y el 40% en diferentes estudios^{9,12}. En un estudio realizado en Singapur, la resistencia fue del 27%¹⁸. Por tanto, sorprende la elevada cifra de resistencia a penicilina (40%) presentada en el trabajo de Batista Díaz et al¹⁹ en este número de ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, que es muy superior a las previamente publicadas en Europa y en el mundo. Los autores no analizan genéticamente las cepas estudiadas, aunque sí indican que las 60 cepas estudiadas se recogieron durante un período de 8 años, por lo que es probable que no exista relación clonal entre ellas. Otro aspecto llamativo de este estudio es el elevado porcentaje de cepas β -lactamasa negativas pero clasificadas como resistentes a penicilina (CMI $\geq 0,25$ mg/l) según el sistema automatizado Vitek 2 (17%), lo que apunta a la necesidad de realizar siempre una prueba de detección de β -lactamasa antes de identificar a un aislado como resistente a penicilina si se utiliza este sistema automatizado.

Si la producción de β -lactamasa en las cepas de *S. lugdunensis* es muy poco frecuente, todavía es menos frecuente la resistencia a la oxacilina. Existen muy pocos casos descritos en la literatura científica de cepas de esta especie con resistencia a la oxacilina mediada por el gen *mecA*, y en el peor de los casos la resistencia no supera el 5%^{18,20,21}. En el estudio de Batista Díaz et al¹⁹ ninguna de las cepas fue resistente a la oxacilina, como tampoco lo fue ninguna de las cepas publicadas en otras series españolas^{14,16,17}. Sin embargo, es interesante analizar los resultados obtenidos con diferentes métodos de detección, objetivo del estudio de Batista

Díaz et al¹⁹. Si bien ninguna de las cepas estudiadas presentaba el gen *mecA* y todas fueron sensibles con el método comercial de microdilución en caldo (Wider), el de Etest y el de difusión con disco de cefoxitina de 30 µg, hubo 2 cepas que se clasificaron como resistentes a la oxacilina (CMI ≥ 4 mg/l) con el sistema Vitek 2. Estos resultados nuevamente indican que no todos los sistemas automatizados detectan correctamente la sensibilidad a oxacilina en *S. lugdunensis* y que siempre que se obtenga una cepa resistente con alguno de estos sistemas se debe confirmar tanto la identidad de la especie, como la resistencia a la oxacilina mediante un método de referencia, como son la detección del gen *mecA* mediante PCR o de la PBP2a mediante aglutinación con látex. En 1999, el Clinical Laboratory and Standards Institute bajó los puntos de corte de resistencia a oxacilina en los SCoN de ≥ 4 mg/l a $\geq 0,5$ mg/l, con el fin de mejorar la sensibilidad en la identificación de las cepas *mecA*-positivas como resistentes a oxacilina²², pero posteriormente se demostró que mientras que los puntos de corte revisados identificaban correctamente diferentes especies de SCoN *mecA*-positivas como resistentes a oxacilina, no ocurría así con *S. lugdunensis*, ya que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de oxacilina frente a muchas cepas eran de 0,5 a 2 mg/l, y éstas no presentaban el gen *mecA* y se categorizaban como falsamente resistentes²³. En 2005, se revisaron los puntos de corte de resistencia a la oxacilina para *S. lugdunensis* y se implantaron los mismos criterios que para *S. aureus*, que son los que se deben considerar: son sensibles las cepas de *S. lugdunensis* frente a las cuales la CMI de oxacilina es ≤ 2 mg/l y resistentes cuando la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/l²⁴. Actualmente, la utilización del disco de cefoxitina de 30 µg ha facilitado enormemente la clasificación de las cepas de *S. lugdunensis* como resistentes (≤ 21 mm de halo de inhibición) o sensibles (≥ 22 mm) a la oxacilina, ya que además de ser de fácil realización existe una excelente correlación entre este método y la detección del gen *mecA* por PCR. Es necesario precisar que en otras especies de SCoN la interpretación de los halos de inhibición con el disco de cefoxitina es diferente (resistente ≤ 24 mm; sensible ≥ 25 mm), y que en *S. lugdunensis*, a diferencia de otros SCoN (con la excepción de *S. saprophyticus*), no se debe utilizar la difusión con disco de oxacilina para determinar si este microorganismo es sensible o resistente a este antimicrobiano. La utilización del agar Mueller-Hinton, suplementado con 4% NaCl y con 6 mg/l de oxacilina, es un método alternativo para la detección de la resistencia a la oxacilina en *S. lugdunensis*²⁴.

En consonancia con la sensibilidad a β -lactámicos de *S. lugdunensis*, este microorganismo también se ha mantenido generalmente sensible a otros antimicrobianos. En diferentes estudios se han descrito cepas resistentes a macrólidos, lincosamidas, cotrimoxazol, fosfomicina, rifampicina y fluoroquinolonas^{6,11,14,16,17,25}, pero es excepcional, al menos hasta el momento actual, la multiresistencia. Solamente se ha comunicado una observación donde las cepas de *S. lugdunensis* eran resistentes a múltiples antibióticos, incluidas oxacilina, clindamicina, gentamicina y eritromicina²⁶. Finalmente, otra característica descrita en esta especie, y que no es muy infrecuente, es la tolerancia a la vancomicina y/o a la teicoplanina, es decir, cepas frente a las cuales la CMI de los glucopéptidos está en el rango de sensibilidad, pero en las que el cociente entre la concentración mínima bactericida (CMB)/CMI es de ≥ 32 mg/l. En algunas cepas, la CMB de vancomicina puede alcanzar hasta > 128 mg/l^{4,27}.

En definitiva, *S. lugdunensis* es un SCoN atípico en comparación con el resto de los SCoN, tanto por sus características especiales de virulencia como por su llamativa sensibilidad a múltiples antimicrobianos, incluida en muchos casos la sensibilidad a la penicilina. Su identificación en el laboratorio es muy sencilla, y ante la sospecha de esta especie (*clumping factor* positivo y/o pruebas de aglutinación con látex positivas y coagulasa en tubo

negativa) se debe realizar una identificación completa (pruebas de ODC y PYR positivas), principalmente si el microorganismo se aísla de un sitio estéril, ya que rara vez es un contaminante. Siempre se debe realizar una prueba de detección de β -lactamasa mediante nitrocefina. La determinación de la sensibilidad a oxacilina mediante sistemas automatizados puede dar resultados falsamente resistentes en *S. lugdunensis*, mientras que el método de difusión con disco de cefoxitina de 30 µg es una alternativa sencilla y fiable, como demuestra el estudio de Batista Díaz et al¹⁹ presentado en este número de ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

Bibliografía

- Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 1999;50:223–36.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML, et al. Survey of blood stream infections attributable to grampositive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;33:283–97.
- Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:117–40.
- Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:111–33.
- Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1988;38:168–72.
- Rodríguez-Gascón M, Roig P, Montagud JB, Merino J. Acute *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis with septic cerebral and pulmonary emboli, showing favorable evolution. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21:465–7.
- Llinares P, Moure R, Cerqueiro J, Albalde M, Míguez E, Echaniz A, et al. Endocarditis por *Staphylococcus lugdunensis*. Incidencia hospitalaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1998;16:233–6.
- Vandenesch F, Etienne J, Reverdy ME, Eykyn SJ. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis.* 1993;17:871–6.
- Herchline TE, Ayers LW. Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J Clin Microbiol.* 1991;29:419–21.
- Anguera I, Del Río A, Miró JM, Martínez-Lacasa X, Marco F, Gumá JR, et al. Hospital Clin Endocarditis Study Group, et al. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart.* 2005;91:e10.
- Hellbacher C, Tornqvist E, Soderquist B. *Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:43–9.
- Hébert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2425–31.
- Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *micrococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed., Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 264–282.
- Verdaguer R. *Staphylococcus lugdunensis*. *Boletín del Control de Calidad SEIMC.* 2000;12(3):7–13.
- Fleurette J, Bes M, Brun Y, Freney J, Forey F, Coulet M, et al. Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. *Res Microbiol.* 1989;140:107–18.
- Cercenado E, Cuevas O, Vindel A, Sánchez-Conde M, Pérez-Olaso O, Bouza E. Molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and comparison of different methods to determine the susceptibility to oxacillin. Abstracts del 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA. Septiembre de 2003. Poster D-1897, p. 196.
- Mateo M, Maestre JR, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sánchez P, et al. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:287–91.
- Yen Tan T, Yong Ng S, He J. Microbiological characteristics, presumptive identification and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2393–5.
- Batista Díaz N, Fernández Sarratea P, Lara Pérez M, Laich F, Méndez Álvarez S. Evaluación de métodos para el estudio de la sensibilidad a oxacilina y penicilina en 60 aislamientos de *Staphylococcus lugdunensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27: doi:10.1016/j.eimc.2008.04.005.
- Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, et al. Does nasal colonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur

- frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? J Clin Microbiol. 2006; 44:229–31.
21. Tee WS, Soh SY, Lin R, Loo LH. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. J. Clin Microbiol. 2003;41:519–20.
 22. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999, Wayne: PA.
 23. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2000;38:752–4.
 24. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. M100–S18. Clinical Laboratory Standards Institute, 2008, Wayne: PA.
 25. Ros MJ, Ramírez A, Arteaga E, Alberto C, Gil J, Reina J. Infección por *Staphylococcus lugdunensis*: caracterización clínico-microbiológica de 25 casos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1999;17:223–6.
 26. You YO, Kim KJ, Min BM, Chung CP. *Staphylococcus lugdunensis*—a potential pathogen in oral infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88:297–302.
 27. Bourgeois I, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL, Caron F. Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:740–3.