

## 中国大陆地区幽门螺杆菌对常用抗生素耐药性的临床分析

赵霞<sup>1</sup>, 徐薇薇<sup>1</sup>, 刘益萌<sup>2</sup>, 索智敏<sup>1\*</sup>

(1. 河南大学淮河医院 消化内科, 河南 开封 475000; 2. 暨南大学国际学院, 广东 广州 510000)

**摘要:**目的 分析近几年中国大陆地区(简称中国大陆)甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林、呋喃唑酮和四环素治疗幽门螺杆菌(Hp)耐药性的变化趋势和地区差异。方法 通过检索多个数据库,收集中国大陆 Hp 对 6 种常用抗生素耐药性的相关文献,并用 Stata15 软件进行分析。回顾并比较目前河南大学淮河医院常用抗生素耐药情况。结果 2013—2020 年中国大陆甲硝唑耐药性最高,克拉霉素次之,阿莫西林耐药性最低。阿莫西林在南方地区的耐药性明显高于北方。甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星和阿莫西林耐药性在 2019—2020 年达到或接近最高值。目前河南大学淮河医院阿莫西林和呋喃唑酮耐药性较低,克拉霉素最高。结论 目前中国大陆 Hp 对常用的抗生素的耐药性均处于较高水平状态,其中对甲硝唑和克拉霉素耐药性较高,对阿莫西林耐药性较低,该状况以南方较为突出。

**关键词:** 幽门螺杆菌, 抗生素, 耐药性

中图分类号: R573.9 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2022.07.1077

## Clinical analysis of the resistance of *Helicobacter pylori* to commonly prescribed antibiotics in Chinese mainland

ZHAO Xia<sup>1</sup>, XU Wei-wei<sup>1</sup>, LIU Yi-meng<sup>2</sup>, SUO Zhi-min<sup>1\*</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000;

2. International School, Jinan University, Guangzhou 510000, China)

**Abstract: Objective** To find the trends and regional differences of the resistance of *Helicobacter pylori* (Hp) to metronidazole, clarithromycin, levofloxacin, amoxicillin, furazolidone and tetracycline in recent years in the mainland of China. **Methods** By searching several databases, the literatures on the resistance of Hp to six commonly prescribed antibiotics in mainland of China were collected and analyzed with Stata15 software. The antibiotic resistance in Huaihe Hospital of Henan University was reviewed and compared. **Results** The investigation results from 2013 to 2020 showed that rate of Hp metronidazole resistance was the highest and the clarithromycin was the second, while the rate of resistance to amoxicillin was the lowest one. The amoxicillin resistance in the south of China was significantly higher than that in the north of China. The resistance to metronidazole, clarithromycin, levofloxacin and amoxicillin reached (or closed to) the highest level from 2019 to 2020. At present, the resistance to amoxicillin and furazolidone was low and the resistance to clarithromycin was the highest in Huaihe Hospital of Henan University. **Conclusions** The resistance of Hp to antibiotics in the mainland of China was at a relatively

收稿日期: 2022-02-25 修回日期: 2022-04-27

基金项目: 河南省医学教育研究项目 (Wjlx2021378)

\* 通信作者 (corresponding author): zhimin55555@163.com

high level. The resistance rate to metronidazole and clarithromycin was high, while that to amoxicillin was low. The antibiotic resistance of HP was more popular in the south of China.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; antibiotics; drug resistance

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*, HP)是一种革兰氏阴性微需氧螺旋形细菌,与人类胃肠道疾病密切相关。筛查和根除 Hp 是治疗和预防胃肠道疾病的有效方式。然而,由于治疗 Hp 的常用抗生素耐药性逐渐增加,其根除率正在逐年下降。有些研究报道了中国部分地区 Hp 的抗生素耐药性情况,但不同年份、地理区域的耐药性报告差异很大,且并不全面。因此,有必要分析中国 Hp 对几种常用抗生素耐药性的趋势和地区差异。本研究通过检索文献分析了中国大陆地区(简称中国大陆)Hp 对甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林、呋喃唑酮和四环素耐药性时间变化趋势和地区差异,并回顾和比较河南大学淮河医院常用抗生素耐药情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 文献检索

本文根据系统性评价与荟萃分析的优先报告条目(the preferred items for systematic reviews and meta-analysis, PRISMA)的要求制定检索策略,系统地检索了 PubMed、Embase、Cochrane、中国期刊全文数据库、万方数据库、维普中文科技期刊全文数据库等,收集了2013年1月1日至2020年8月8日发表的中国大陆幽门螺旋杆菌对主要抗生素耐药性的相关观察性研究和随机对照试验,并查阅了所纳入文献的参考文献。在外文数据库中,检索“*Helicobacter pylori*”和“resistance”;在中文数据库中,以题名或关键词“幽门螺旋杆菌”和“耐药性”进行模糊匹配检索,并下载相关文章全文。

### 1.2 纳入及排除标准

本文纳入符合如下标准的研究:1)至少进行一种标准幽门螺旋杆菌药敏试验:包括 E-test、制片琼脂扩增法、琼脂稀释法、折点敏感实验法、临界点浓度法;2)患者无任何幽门螺旋杆菌根除治疗史且未使用任何抗生素;3)提供足够的能够计算出相对风险或风险比以及95%置信区间(95% confidence interval, 95% CI);4)患者接受主要抗生素(甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林、呋喃唑酮、四

环素)的治疗。同时排除如下研究:1)不符合上述纳入标准的研究;2)系统分析、荟萃分析、评论、信件、报道、摘要、社论以及重复的研究;3)集中于特殊人群如儿童、糖尿病患者等的相关研究;4)患者来自非中国大陆地区。如果有两篇或以上的文献使用的数据来源相同,则纳入质量评分较高的文献;如果质量评分相同,则纳入具有较大样本量的文献。由两名研究者独立评价纳入研究质量,当观点不一致时请第3名研究者决定。

### 1.3 数据提取与质量评分

以 Cochrane 协作网推荐的系统评价中诊断准确性研究的质量鉴定(QUADAS)评价诊断试验的标准,共14条。每一条标准按照“是”“否”“不清楚”,分别计1和0分,总分14分。本研究将从所纳入的文献中提取出如下数据:第一作者姓名、出版年份、研究开始和结束日期、研究地区、地域、Hp 阳性患者数量和药敏试验诊断方法,对不同抗生素产生耐药性的患者数。当对同一类别的不同抗生素进行评估时,将把它们对应的结果相结合进而分析抗生素耐药性。

### 1.4 数据分析与统计

本研究对检索到的文献采用 Excel 2018 整理基础数据,同时使用随机效应模型来合成不同抗生素的耐药性最终的效应值以及95% CI。若纳入文献未检测某种抗生素的耐药性,则将该对应的数据表示为“No report (NR)”,在统计该抗生素耐药性时不纳入此文献。为了检验纳入文献之间是否存在异质性以及异质性程度,本文使用统计量  $I^2$  来表示异质性。当异质性较大( $I^2 > 25%$ )时,将使用 Stata15 进行亚组分析探究异质性来源。本文将秦岭淮河线作为南北方的分界,进行与地域相关的亚组分析,并通过  $t$  检验分析各个抗生素在南北方耐药性的差异。本文还将文献调查时间分为4个时间段(2013—2014年,2015—2016年,2017—2018年,2019—2020年)进行亚组分析。对于未提供样本收集期的文献,将出版年份定为调查时间;而对于调查时间跨越两个时期的文献,以大部分研究发生的时

期作为调查时间段。

## 1.5 回顾并比较河南大学淮河医院抗生素耐药情况

本研究涉及内容、过程、预期结果均呈报于河南大学淮河医院伦理委员会并获得批准(批准文号:2020177),研究前均获得患者及家属知情同意书。本研究选取了2020年6月—2022年3月河南大学淮河医院治疗的1 415例Hp患者。纳入标准:1)C<sup>13</sup>呼气试验结果为阳性者;2)临床病历清楚完整,具一定治疗依从性者。抽取患者血液进行血液培养,采用自动化仪器法结合纸片扩散法进行药敏试验,然后统计克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林和呋喃唑酮的耐药性。

## 2 结果

### 2.1 文献检索

通过检索PubMed、Embase、Cochrane、中国期刊全文数据库、万方数据库、维普中文科技期刊全文数据库,本研究检索出3 783篇文献,使用EndNote软件去除重复文献以及阅读文献的标题、摘要后,发现有91篇文献可能被纳入,通过进一步阅读全文以及参考文献,排除综述、病例报告、评论、信、只有摘要无全文的论文后,最终纳入13篇报道中国大陆Hp患者

的主要抗生素耐药性的文献进行荟萃分析<sup>[1-13]</sup>。

### 2.2 纳入文献的特征

本研究所纳入的文献是研究中国大陆Hp对主要抗生素的耐药性,通过比例回归风险模型(COX回归)计算出RR值或HR值。纳入13篇研究均为全文,其中3篇英文,10篇中文,各研究组间基线(如:性别、年龄)一致,样本量在45~3 203例,共分离、检测主要抗生素耐药性的Hp阳性菌株6 233株,分布于中国10个省市(表1)。

### 2.3 中国大陆Hp对主要抗生素的耐药性分析

2.3.1 Hp对6种抗生素耐药性:共检索到12篇关于Hp对甲硝唑耐药性的研究,耐药率为69.4%(95% CI:58.9%~80.0%),研究间异质性较高( $I^2=99.2%$ , $P<0.001$ )。2013—2020年Hp对克拉霉素耐药率均值为30.1%(95% CI:20.6%~39.6%),研究间异质性较高( $I^2=98.6%$ , $P<0.001$ )。共12篇关于Hp对左氧氟沙星耐药性的研究,耐药率均值为29.7%(95% CI:15.4%~44.1%),研究间异质性较高( $I^2=99.6%$ , $P<0.001$ )。11篇关于Hp对阿莫西林耐药性的研究显示阿莫西林平均耐药率为9.3%(95% CI:2.2%~16.4%),研究间异质性较高( $I^2=98.8%$ , $P<0.001$ )。共检索到5篇关于Hp对呋喃唑酮耐药性的研究,耐药率为10.1%(95% CI:

表1 中国大陆不同时间和不同省市Hp对6种抗生素耐药率

Table 1 Resistance rate of Hp to six antibiotics at different times in different provinces and cities of Chinese mainland

REF	area	RGN	period	patients( <i>n</i> )	test	MTZ/%	CLA/%	LEV/%	AMO/%	FRZ/%	TET/%
[1]	Chaozhou	S	2018—2020	126	5	80.16	35.71	28.57	19.05	10.32	8.73
[2]	Wuhan	S	2018—2019	430	2	80.70	34.42	26.51	5.81	2.09	1.40
[3]	Huaian	S	2017—2018	49	3	44.90	24.49	NR	22.45	NR	2.04
[4]	Shenzhen	S	2020	3 203	2	99.59	10.65	0.06	30.53	NR	NR
[5]	Gansu	N	2019	70	1	74.29	54.72	72.86	2.86	NR	48.57
[6]	Shanxi	N	2016—2017	119	5	28.57	10.08	14.29	1.68	NR	NR
[7]	Shenzhen	S	2015—2017	244	4	NR	25.00	5.33	NR	NR	NR
[8]	Hebei	N	2014—2015	155	2	94.19	21.29	5.81	2.58	1.94	NR
[9]	Chongqing	S	2015—2015	325	4	93.85	20.20	23.69	NR	NR	NR
[10]	Changchun	N	2014—2017	69	3	30.40	52.20	37.70	5.80	30.40	33.30
[11]	Shanghai	S	2014—2014	45	1	53.33	40.00	55.56	4.44	NR	NR
[12]	Chengde	N	2014—2016	448	2	80.49	10.04	10.94	5.13	14.51	8.26
[13]	Beijing	N	2013—2014	950	1	63.40	52.60	54.80	4.40	NR	7.30

REF. reference; RGN. region; S. the south of China; N. the north of China; MTZ. metronidazole; CLA. clarithromycin; LEV. levofloxacin; AMO. amoxicillin; FRZ. furazolidone; TET. tetracycline; NR. no report; 1. E-test; 2. disc diffusion test; 3. agar test; 4. microarray analysis; 5. rapid culture method.

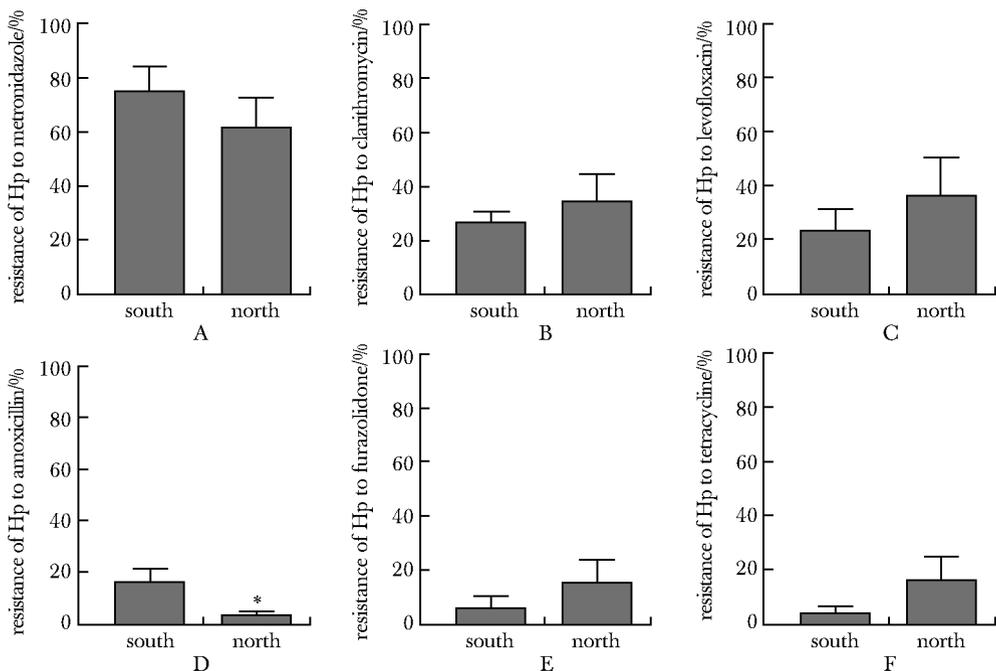
4.2%~16%),研究间异质性较高( $I^2=94.9%$ ,  $P<0.001$ )。检索到7篇关于Hp对四环素耐药性的研究,耐药率为11.9%(95% CI:6.9%~16.9%),研究间异质性较高( $I^2=95.5%$ ,  $P<0.001$ )。其中,甲硝唑在2013—2020年平均耐药率最高,克拉霉素次之,而阿莫西林的耐药率最低。

2.3.2 Hp对6种抗生素耐药性在南北方的差异:亚组分析显示中国南方和北方甲硝唑耐药率分别为78.2%(95% CI:68.6%~87.8%)和62.2%(95% CI:45.2%~79.2%)(图1A)。南方和北方克拉霉素耐药率分别为26.3%(95% CI:16.8%~35.8%)和34.6%(95% CI:14.6%~54.5%)(图1B)。南方和北方左氧氟沙星耐药率分别为22.0%(95% CI:10.5%~33.4%)和36.6%(95% CI:9.3%~63.9%)(图1C)。南方和北方阿莫西林耐药率分别为16.4%(95% CI:2.1%~30.7%)和3.7%(95% CI:2.5%~4.9%),南方阿莫西林耐药率显著高于北方( $P<0.05$ )(图1D)。南方和北方呋喃唑酮耐药率分别为5.8%(95% CI:-2.2%~13.8%)和10.1%(95% CI:4.2%~16.0%)(图1E)。南方和北方四环素耐药率分别为3.5%(95% CI:-0.3%~7.3%)和21.1%(95% CI:12.2%~30.1%)(图1F)。

2.3.3 Hp对甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林耐药性与时间段的关系:时间段亚组分析结果显示,2013—2014年甲硝唑耐药率较高,然后逐年下降;2017—2018年耐药性最低;然后2019—2020年耐药率回升到最高值(表2)。2013—2014年克拉霉素耐药率最高,然后逐年下降;2017—2018年耐药性最低;而2019—2020年耐药率再次升高(表2)。2013—2016年左氧氟沙星耐药率逐渐下降至最低水平;然后逐年上升,2019—2020年耐药性最高(表2)。2013—2014年阿莫西林耐药率逐年上升,2019—2020年耐药率升高到最高值(表2)。由于纳入研究数目少,样本量少且调查时间不连续,难以分析呋喃唑酮、四环素耐药性和年份的关系。

## 2.4 河南大学淮河医院 Hp 患者对主要抗生素的耐药性分析

本研究统计了2020年6月至2022年3月河南大学淮河医院Hp患者对常见抗生素的耐药率,结果发现,克拉霉素耐药率最高,左氧氟沙星次之,而阿莫西林和呋喃唑酮耐药性较低(表3)。由于河南大学淮河医院已经停止使用甲硝唑治疗Hp,故未统计甲硝唑耐药率。



A. metronidazole; B. clarithromycin; C. levofloxacin; D. amoxicillin; E. furazolidone; F. tetracycline; \* $P<0.05$  compared with south

图1 中国大陆6种抗生素对Hp耐药性的南北差异

Fig 1 Difference of the resistance of Hp to six antibiotics between the south and the north of Chinese mainland

表2 中国大陆不同时间段 Hp 对 4 种抗生素耐药性的变化

Table 2 Changes of the resistance of Hp to four antibiotics at different times in Chinese mainland

antibiotics	2013—2014		2015—2016		2017—2018		2019—2020	
	RR/%	95%CI/%	RR/%	95%CI/%	RR/%	95%CI/%	RR/%	95%CI/%
MTZ	70.9	46.1-95.6	69.1	48.1-90.2	51.6	13.5-89.6	85.2	67.8-102.5
CLA	38.0	14.8-61.3	27.1	14.2-40.0	23.0	5.3-40.7	33.0	7.6-58.4
LEV	38.5	0.1-76.8	18.0	8.5-27.5	20.6	8.7-32.6	41.6	-24.1-107.3
AMO	4.0	2.9-5.2	5.2	3.3-7.1	6.6	1.0-12.1	17.5	-2.1-37.1

RR. resistance rate; MTZ. metronidazole; CLA. clarithromycin; LEV. levofloxacin; AMO. amoxicillin.

表3 河南大学淮河医院 Hp 对 5 种抗生素的耐药率

Table 3 Resistance rate of Hp to five antibiotics in Huaihe Hospital of Henan University

antibiotics	resistance (n)	total (n)	RR/%
AMO	86	466	18.5
LEV	205	407	50.4
TET	111	353	31.4
CLA	75	101	74.3
FRZ	7	88	7.95

RR. resistance rate; AMO. amoxicillin; LEV. levofloxacin; TET. tetracycline; CLA. clarithromycin; FRZ. furazolidone.

### 3 讨论

Hp 患者根除治疗方案中最常用的抗生素为甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星、阿莫西林、呋喃唑酮等。然而,随着 Hp 对主要抗生素耐药率增加,中国大陆地区 Hp 根除率逐渐下降,治疗失败的比例不断增加。本研究发现目前中国大陆地区 Hp 对主要抗生素耐药性均处于较高水平,2013—2020 年对甲硝唑平均耐药率最高,而对阿莫西林的耐药率最低。对甲硝唑的高耐药性可能与临床上常用甲硝唑药物治疗厌氧菌、原虫感染和妇科感染,所用剂量又不足以清除 Hp 有关。河南大学淮河医院已经停止使用甲硝唑治疗 Hp。

不同国家和地区中 Hp 对同一种抗生素的耐药率可能存在一定的差异。2006—2015 年亚太地区 Hp 对甲硝唑、阿莫西林和四环素耐药率分别为 47%、3%、3%,欧洲地区分别为 35%、1%、1%,拉丁美洲地区为 50%、4%和 5%<sup>[18]</sup>。经济较为发达的澳大利亚和新西兰 Hp 对甲硝唑平均耐药率为 50%,相对较低<sup>[19]</sup>。而发展中国家的伊朗 Hp 对甲硝唑

平均耐药率为 62%,且不同地区有所差异,比如阿尔达比勒为 32%,伊拉姆为 88%<sup>[20]</sup>。这可能与甲硝唑价格较低、发展中国家应用较多有关。本研究发现中国大陆北方地区 Hp 对克拉霉素、左氧氟沙星、呋喃唑酮、四环素平均耐药率有高于南方地区的趋势;南方地区 Hp 对甲硝唑平均耐药率有高于北方地区的趋势;然而南方地区 Hp 对阿莫西林耐药率显著高于北方地区。这些地区耐药性差异可能与该地区的用药习惯不同有关。

即使同一地区 Hp 对抗菌药物的耐药性也可随着时间推移而改变<sup>[14]</sup>;在亚太地区,甲硝唑耐药性从 2000 年以前的 36%增加到 2011—2015 年的 45%,克拉霉素耐药性从 2000 年以前的 7%显著增加到 2011—2015 年的 21%,左氧氟沙星耐药性显著上升,从 2000 年以前的 2%上升到 2011—2015 年的 27%。现阶段世界大多数地区 Hp 对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的耐药性都很高,超过了国际指南确定的 15%阈值,其中大多数国家已经不再将克拉霉素纳入 Hp 感染的一线经验性方案,因为根除率不足 80%<sup>[15-16]</sup>。本研究分析了抗 Hp 药物的耐药性与时间的关系,发现甲硝唑、克拉霉素、左氧氟沙星的耐药性在 2013 年—2020 年呈先下降后回升的趋势,在 2019—2020 年达到或接近最高值,而阿莫西林耐药性最低,但也呈逐年上升的趋势,在 2019—2020 年达到最高值。中国大陆地区最常见的对 Hp 的多重耐药是对克拉霉素、甲硝唑和氟喹诺酮类药物的三重耐药。河南大学淮河医院克拉霉素耐药率最高,左氧氟沙星次之,而阿莫西林和呋喃唑酮耐药性较低。本研究结果提示,克拉霉素、甲硝唑和氟喹诺酮联合用药失败后或可选择耐药率低的阿莫西林、呋喃唑酮

和四环素。但由于它们耐药性也在逐年升高, 未来或可考虑联用其他抗生素和/或质子泵抑制剂, 进而提高 Hp 的根除率。

综上所述, 中国大陆地区 Hp 对常用抗生素耐药率处于较高水平, 并且有南北差异性, 在临床使用

抗生素时应注意个体化原则, 防止抗生素滥用, 从而有效控制耐药率的升高, 并减少根除失败的发生。同时, 积极寻找其他新的治疗方法如抗生物膜、疫苗等也可以在未来有效防治 Hp 感染和抗生素耐药率的升高。

## 参考文献:

- [1] 谢彬, 孙光裕, 张俊钊, 等. 潮州地区幽门螺杆菌的感染率及耐药性临床研究[J]. 汕头大学医学院学报, 2021, 34: 14-17+21.
- [2] 苏成霞, 章茜, 聂璐, 等. 武汉地区 2018—2019 年幽门螺杆菌菌株耐药性分析[J]. 中国现代医生, 2021, 59: 23-26+31.
- [3] 韦军. 幽门螺杆菌对 6 种抗生素的耐药性研究[J]. 中国社区医师, 2020, 36: 125+127.
- [4] 叶珊珊, 李俊达, 周应生, 等. 幽门螺杆菌对抗生素耐药性的多中心前瞻性分析[J]. 基础医学与临床, 2020, 40: 1661-1665.
- [5] 尚琪, 赵阳, 吴正奇, 等. 甘肃省幽门螺杆菌耐药分析[J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45: 47-51.
- [6] 顾勇, 杨艳, 陈星如, 等. 陕西地区武警官兵幽门螺杆菌感染及抗生素耐药情况分析[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44: 968-972.
- [7] 邹傲, 刘振宇, 杨莉丽, 等. 深圳地区幽门螺旋杆菌耐药性检测及状况分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28: 5-7.
- [8] 孟霞, 刘改芳, 吴婧, 等. 河北地区幽门螺杆菌临床分离株的耐药性分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96: 270-272.
- [9] Han R, Lu H, Jiang MW, *et al.* Multicenter study of antibiotic resistance profile of *H. pylori* and distribution of CYP2C19 gene polymorphism in rural population of Chongqing, China[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016: 8547686. doi:10.1155/2016/8547686.
- [10] 铁丹丹, 赵春燕, 范聪聪, 等. 长春地区幽门螺杆菌耐药性和克拉霉素耐药基因突变位点分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019: 264-269.
- [11] Dong F, Ji D, Huang R, *et al.* Multiple genetic analysis system-based antibiotic susceptibility testing in *Helicobacter pylori* and high eradication rate with phenotypic resistance-guided quadruple therapy[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94: e2056. doi:10.1097/md.0000000000002056.
- [12] 郝欣, 李建辉. 2014 年至 2016 年承德地区幽门螺旋杆菌耐药性监测[J]. 河北医学, 2017, 23: 498-500.
- [13] Zhang YX, Zhou LY, Song ZQ, *et al.* Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 2786-2792.
- [14] Savoldi A, Carrara E, Graham DY, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization Regions[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155: 1372-1382. e17.
- [15] Midolo PD, Lambert JR, Turnidge J. Metronidazole resistance: a predictor of failure of *Helicobacter pylori* eradication by triple therapy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 11: 290-292.
- [16] Fraser AG, Moore L, Hackett M, *et al.* *Helicobacter pylori* treatment and antibiotic susceptibility: results of a five-year audit[J]. *Aust N Z J Med*, 1999, 29: 512-516.