

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LARA LANDIM LEITÃO

**PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM
COPROCULTURAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM UM LABORATÓRIO
PARTICULAR DE CRATO- CE**

Juazeiro do Norte – CE
2020

LARA LANDIM LEITÃO

**PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM
COPROCULTURAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM UM LABORATÓRIO
PARTICULAR DE CRATO- CE**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof. Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

LARA LANDIM LEITÃO

**PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM
COPROCULTURAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM UM LABORATÓRIO
PARTICULAR DE CRATO- CE**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof. Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

Data da aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva
Orientador (a)

Prof^ª Ma. Tássia Thais Al Yafawi
1º Examinador (a)

Prof^ª Esp. Francisca Janielle Barros Nachabe
2º Examinador (a)

PREVALÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM COPROCULTURAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM UM LABORATÓRIO PARTICULAR DE CRATO- CE

Lara Landim Leitão¹, Rakel Olinda Macedo da Silva²

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a resistência dos micro-organismos em coproculturas realizadas em um laboratório particular do município de Crato– CE. Trata-se de uma pesquisa retrospectiva, longitudinal e de caráter qualitativo e quantitativo, realizada através de uma coleta de dados referentes às coproculturas de pacientes atendidos em um laboratório da rede privada no município de Crato-CE, no período de Janeiro de 2019 a dezembro de 2019. Os parâmetros avaliados foram: idade, sexo, presença ou ausência de crescimento bacteriano, identificação dos micro-organismos e resistência à antibióticos. Após a análise, os dados foram organizados em gráficos e tabelas. Dentre o crescimento de bactérias *E. coli* (16,70%), *Salmonella* sp (9,94%), *Shigella* sp (0,41%) e micro-organismo compatíveis com a flora (72,95%). O gênero que apresentou maior índice de crescimento bacteriano foi o do sexo feminino com (53,79%) e a faixa etária com predomínio de bactérias enteropatógenicas foi de 19-59 anos com (29,76%). Todas as bactérias testadas apresentaram maior taxa de resistência ao Sulfametoxazol, no entanto *E. coli* e *Salmonella* sp também apresentaram alta resistência para Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina, Levofloxacina. Embora tenha tido um predomínio de bactérias compatíveis com a flora em relação a bactérias enteropatógenicas, as taxas de resistência aos antibióticos citados foram significativas, ficando clara a importância do antibiograma antes de qualquer intervenção medicamentosa.

Palavras – chave: Coproculturas. Infecções. Resistência.

PREVALENCE OF MICRO-ORGANISMS ISOLATED IN COPROCULTURES AND RESISTANCE PROFILE IN A PRIVATE LABORATORY IN CRATO-CE

Lara Landim Leitão¹, Rakel Olinda Macedo da Silva²

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the resistance of microorganisms in co-cultures carried out in a private laboratory in the municipality of Crato - CE. This is a retrospective, longitudinal and qualitative and quantitative research, carried out through a collection of data referring to the co-cultures of patients seen in a private laboratory in the municipality of Crato-CE, from January 2019 to December 2019. The parameters evaluated were: age, sex, presence or absence of bacterial growth, identification of microorganisms and resistance to antibiotics. After the analysis, the data were organized into graphs and tables. Among the growth of *E. coli* bacteria (16.70%), *Salmonella* (9.94%), *Shigella* (0.41%)

¹ Discente do curso de Biomedicina, laralandim31@outlook.com Centro Universitário Dr Leão Sampaio.

² Docente do curso de Biomedicina, rakelolinda@leaosampaio.edu.br Centro Universitário Dr Leão Sampaio.

and microorganisms compatible with flora (72.95%). The gender with the highest rate of bacterial growth was female with (53.79%) and the age group with a predominance of enteropathogenic bacteria was 19-59 years with (29.76%). All bacteria tested showed a higher rate of resistance to Sulfamethoxazole, however *E. coli* and *Salmonella* also showed high resistance to nalidixic acid, Ciprofloxacin, Levofloxacin. Although there was a predominance of flora-compatible bacteria over enteropathogenic bacteria, the rates of resistance to the antibiotics mentioned were significant, making the importance of the antibiogram clear before any drug intervention.

Keywords: Coprocultures. Infections. Resistance.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são seres unicelulares e procariontes sendo compostas por citoplasma e uma membrana com uma parede celular composta de glicopeptídeo, encontrando-se também um citoplasma abundante de ribossomos que atuam na célula realizando síntese de proteínas. São capazes de obter uma grande diversidade de vias metabólicas, como utilização de energia solar e oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos para obter energia. Podem desenvolver-se em numerosos lugares do mundo (PRATS, 2006).

Estes micro-organismos podem causar infecção no trato gastrointestinal através de diversos alimentos, como carne bovina, ovos crus e verduras, causando sintomas de febre, diarreias, dores abdominais e náuseas (DE OLIVEIRA et al., 2013).

As principais bactérias causadoras de gastroenterites são *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp.. Estes causam sintomas parecidos como também podem variar conforme a quantidade de micro-organismo, produção de toxinas e resistência do organismo de um hospedeiro, principalmente em populações vulneráveis que pode levar a um quadro mais grave (DA CAMERA FLORES; DE MELO, 2015).

Estas bactérias podem apresentar resistência bacteriana em casos de uso indiscriminado de antibióticos, uso excessivo e interrupção precoce do tratamento, precisando da conscientização de pacientes e uma correta análise médica para obter uma baixa significativa de resistência bacteriana e obter tratamento adequado (ROJAS; PANDOLFI; RAMÍREZ, 2008).

A coprocultura é um exame que irá pesquisar bactérias nas fezes onde é necessário uma coleta satisfatória para um bom isolamento de micro-organismo com a finalidade de um resultado fidedigno, onde irá levar o paciente a fazer um tratamento correto evitando que ocorra uma resistência bacteriana e a piora de seu quadro (BAESSE, 2006).

Além da coprocultura, o teste antibiograma é de baixo custo, considerado importante pois auxilia na escolha de um antimicrobiano, a metodologia mais utilizada é por disco-difusão fornecendo resultados qualitativos, este apresenta alta sensibilidade tornando-se confiável. A falta da utilização deste teste pode levar a uma série de problemas de morbidade e mortalidade decorrente da infecção (DAMACENO et al., 2012).

A infecção intestinal é classificada como problema de saúde pública, originando-se de contaminação por alimento e água. Devido à resistência bacteriana, essas infecções pode tornar-se uma situação potencialmente grave, dessa forma, é importante esta avaliação para alertar sobre possíveis micro-organismos que podem vir a causar enfermidades, bem como a presença de cepas que apresentam resistência a múltiplos antibióticos.

Diante disso, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a resistência dos micro-organismos frequentemente encontrados em coproculturas comparando com a prevalência do mesmo em relação a idade e sexo do paciente.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo, longitudinal e de caráter qualitativo e quantitativo realizada através de uma coleta de dados referentes às coproculturas de pacientes atendidos em um laboratório particular de Crato- CE.

2.2 LOCAL DA COLETA

A coleta de dados foi realizada em um laboratório da rede privada no município de Crato - CE. Onde foram avaliados laudos de pacientes atendidos no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019.

2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão para o presente estudo foram os laudos dos pacientes atendidos que realizaram coproculturas e estão na faixa etária de 0 a 100 anos no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019.

2.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pessoas que embora realizaram coprocultura não estão na idade determinada como também aquelas que realizaram este exame em outra data fora do período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019.

2.5 INSTRUMENTO DE COLETA

Os dados coletados foram obtidos a partir do sistema interno de dados laboratoriais onde foi gerada uma planilha no Excel para preenchimento dos parâmetros avaliados, que foram: presença ou ausência de crescimento bacteriano, idade, sexo e a resistência a antibióticos.

2.6 TABULAÇÃO DOS DADOS

Os dados e informações colhidas foram organizados em gráficos e tabelas utilizando o programa *Microsoft Office Excel 2010* para melhor compreensão.

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

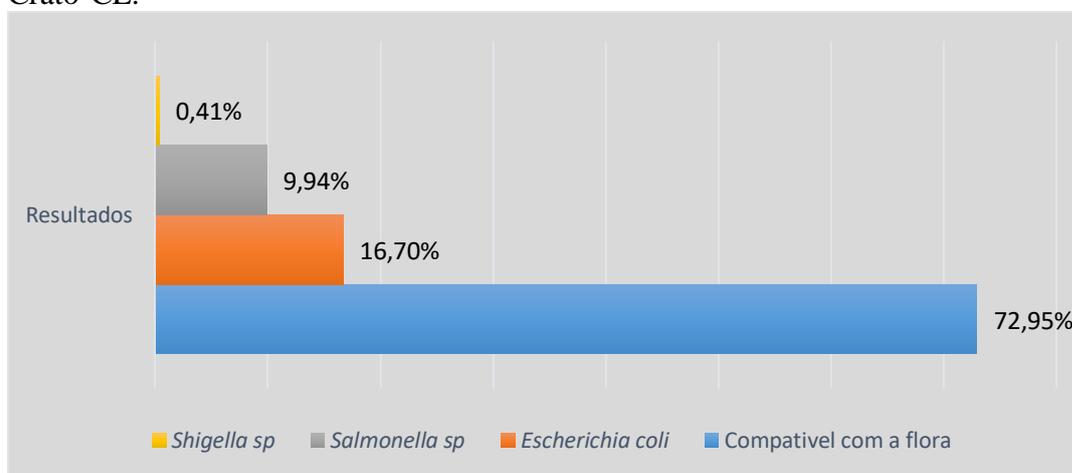
Todas as informações pessoais presentes nos laudos (nome, endereço, entre outras) foram ignoradas e não farão parte do estudo, que foi realizada dentro dos preceitos éticos estabelecidos pela RDC 510/16. Foi emitido ofício para obtenção de carta de anuência e termo de fiel depositário para posterior submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Leão Sampaio (ANVISA, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após coleta e avaliação, os dados foram organizados e dispostos em tabelas e gráficos contendo: presença ou ausência de crescimento bacteriano, idade, sexo e a resistência a antibióticos.

Foram recolhidos dados de 976 pessoas que realizaram exame de coprocultura. Os resultados apresentaram positividade para bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Shigella sp*, mas 72,95% das amostras continham bactérias consideradas compatíveis com a flora. Conforme observado no gráfico 01.

Gráfico 01: Porcentagem de micro-organismos isolados em coproculturas realizadas no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019 por um laboratório particular de Crato-CE.



Fonte: Laboratório particular de Crato- CE

Moura et al. (2012) em pesquisa de caráter prospectivo tipo corte transversal, objetivou identificar a incidência de *Escherichia coli* diarreiogênica, bem como o perfil de sensibilidade à antibióticos em crianças. A coleta foi feita por meio de swab retal, submetendo em seguida o material à coprocultura e sorotipagem. As análises apontaram 99 micro-organismos, dos quais 66,4% eram *Escherichia coli*, 2,1%, *Shigella spp* e 2,1% de *Salmonella spp*.

Escherichia coli é o micro-organismo que mais provoca infecções entéricas provocado por alimentos e água contaminadas, com maior relevância em um público que não possui saneamento básico, ou estão mais frágeis como idosos e crianças com um sistema imune comprometido, conhecido também como um indicador de contaminação fecal mais usado, pois está em grande número na microbiota intestinal (VASCONCELOS et al., 2010).

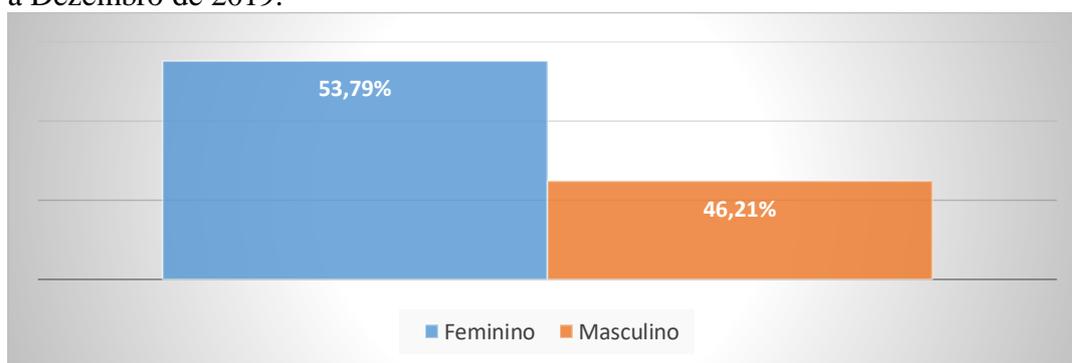
Simões et al. (2010) após avaliar os surtos de *Salmonella enteritidis* no período de 1995 a 2008, identificou 167 casos positivos. No entanto, 28,7% foram reconhecidos após análise de alimentos contaminados, 15% diagnosticados após coprocultura e pesquisa nos alimentos e 56,3% somente com coprocultura.

Salmonella sp. possui cepas como *S. typhi* e *S. taratyphi* extremamente adaptadas aos seres humanos e causadores das febres entéricas (tifóide e paratifóide). Existindo também uma classe que contém a maioria de sorotipos que atingem o homem, denominada *Salmonelas* zoonóticas, principal causadora de gastroenterite (enterocolite) como também por doenças disseminadas de alimentos contaminados, principalmente aqueles de origem animal, como ovos, aves e carnes. Estas causam um grande índice de morbidade e mortalidade, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos (BRASIL, 2011).

Shigella sp. causadora de Doença Vinculada a Alimentos (DVA) é a responsável por causar shigelose caracterizada por uma infecção gastrointestinal, tendo características e manifestações parecidas como a *Salmonella* sp. Dispõe de quatro espécies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonne*. A mais frequente causadora em países que ainda estão em desenvolvimento é *S. flexner*, em países desenvolvidos a *S. sonnei* e a *S. dysenteriae* está associado à forma mais forte da doença (CUNHA et al., 2017).

No gráfico 02 está representado a porcentagem de coproculturas positivas em ambos os sexos, sendo predominante no sexo feminino.

Gráfico 02: Distribuição de resultados positivos por sexo no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019.



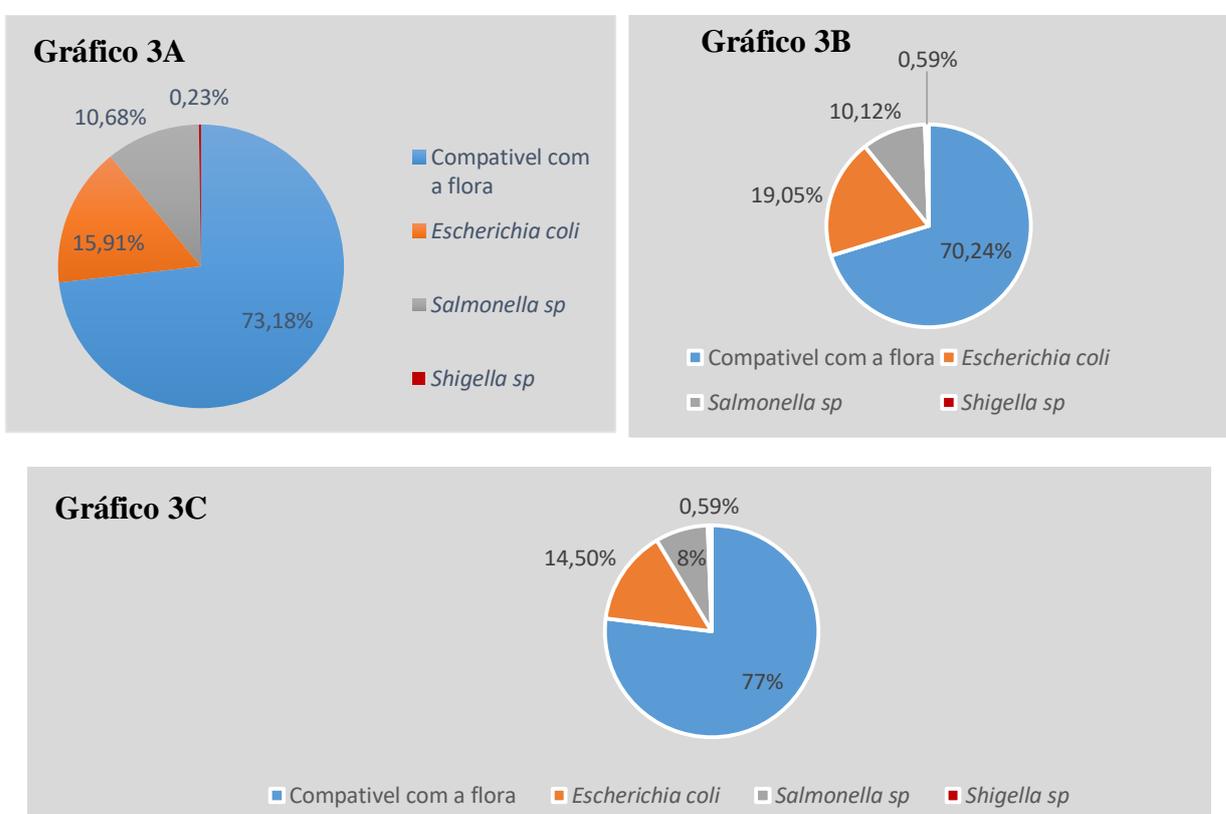
Fonte: Laboratório particular de Crato- CE

Alencar (2014) após coleta de dados no período de 2 anos, identificou 12.715 amostras positivas para coprocultura com prevalência de pessoas do sexo masculino (55,8%). Diferente da pesquisa em questão. No entanto, existem diversos fatores associados ao perfil de propagação de determinado patógeno em uma população, como

condições ambientais, situação demográfica, estado socioeconômico e políticas de saúde (COSTA; JUNIOR, 2017)

Em relação a faixa etária, dos dados recolhidos, 440 pessoas continham idades entre 0 – 18 anos, 336 de 19-59 anos e 200 de 60-100 anos. Comparandos os índices do gráfico 03 foi visto que em relação à compatibilidade com a flora, o grupo de 60-100 anos obteve um resultado superior aos demais grupos. Das bactérias patogênicas, a faixa etária com maior prevalência foi a de 19-59 anos com 29,76%.

Gráfico 03: Seguimento dos grupos específicos por faixa etária no período de Janeiro de 2019 a Dezembro de 2019. A: Resultado do grupo de 0-18 anos. B: Resultado do grupo de 19- 59 anos. C: Resultado do grupo de 60-100 anos.



Fonte: Laboratório particular de Crato- CE.

Almeida et al. (2012) buscou verificar a prevalência de bactérias enteropatogênicas em crianças atendidas com gastroenterite aguda em uma unidade pediátrica. Foram encontrados 8.195 casos, no entanto somente 2,66% eram oriundas de *Salmonella*. Já no presente trabalho foram verificados 10,68% de amostras positivas para o mesmo patógeno com faixa etária de 0-18 anos.

Alencar (2014) em estudo similar, avaliou a prevalência de infecções bacterianas nos diferentes perfis etários: 0-2 anos, 3-10 anos, 11-18 anos, 18-60 anos e 60 anos ou

mais. Obtendo uma maior ocorrência, 50% dos casos positivos, no grupo de 18-60 anos, com predomínio de *E. coli* (52,2%). Em concordância com a presente pesquisa também foi visto superioridade da mesma bactéria isolada com a mesma faixa etária.

Em trabalho semelhante a este, Silveira, Pista, Machado (2018) com o intuito de classificar os tipos de *Shigella* sp. de 53 indivíduos infectados, identificou: *Sh. Sonnei* com 70%, *Sh. flexneri tipo 2* com 13%, *Sh. flexneri tipo 3* com 5%, *Sh. flexneri tipo 1* 4%, *Sh. Boydii tipo 5* com 4%, *Sh. Boydii tipo 2* com 2% e *Sh. Dysenteriae tipo 3* com 2%. E o predomínio de faixa etária foi de 15-64 anos.

Além da pesquisa nas amostras dos patógenos, também se faz necessária a análise dos antibióticos, bem como sua eficiência frente ao micro-organismo. Sendo assim, a tabela 01 compreende o perfil de resistência observado no antibiograma.

Tabela 01: Porcentagem de resistência das bactérias identificadas aos antibióticos testados no antibiograma.

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Shigella</i> sp.
Amicacina	6,13%	3,09%	0%
Amoxicilina	1,23%	3,09%	0%
Ampicilina	11,66%	3,09%	0%
Cefazolina	0%	3,09%	0%
Cefepima	6,75%	4,12%	0%
Cefoxitina	3,07%	3,09%	0%
Ceftazidima	4,91%	5,15%	0%
Ceftnixona	1,84%	3,09%	0%
Cefuroxima	0%	3,09%	0%
Ciprofloxacina	17,79%	16,49%	0%
Ertapenem	1,84%	4,12%	0%
Gentamicina	5,52%	3,09%	0%
Imipenem	0,61%	3,09%	0%
Levofloxacina	16,56%	11,34%	0%
Meropenem	0%	4,12%	0%
Piperaciclina	0%	4,12%	0%
Tetraciclina	7,98%	3,09%	0%
Sulfametoxazol	53,99%	43,30%	25%
Acido nalidíxico	48,47%	37,11%	0%

Fonte: Laboratório particular de Crato- CE

Dentre os antibióticos testados frente às bactérias, o único que as cepas apresentaram uma maior porcentagem de resistência foi o Sulfametoxazol. Assim como apresentado na pesquisa de Moreira et al. (2015), que ao analisar o perfil sensibilidade a antibióticos para *E.coli* em 37 amostras de fezes, verificou que todas apresentaram resistência para Sulfametoxazol.

Já Burduniuc et al. (2013) após avaliar o perfil de resistência a antibióticos de coprocultura positivas para *E.coli*, identificou com maior prevalência a ticarcilina / ácido clavulânico com 64,2% e Cotrimoxazol com 47,3%.

Nunes et al. (2012) destacaram resistência bacteriana em 77,1% de amostras positivas para *Shigella*, isoladas de crianças com diarreia. A maioria das cepas foram resistentes ao sulfametoxazol. No entanto, mostraram-se sensíveis a ceftriaxona, ciprofloxacina e ácido nalidíxico. Assim como na presente pesquisa.

Peixoto (2016) após testes de resistência a antibióticos de diferentes cepas de *Salmonella* encontradas em coproculturas de crianças, verificou com maior prevalência a ampicilina e cotrimoxazol. Com porcentagem maior para ampicilina (50%). Diferente do presente estudo que apresentou apenas 3,09%. No entanto, houve maior resistência para os antibióticos: Sulfametoxazol, Acido nalidíxico, Ciprofloxacina, Levofloxacina.

Moura et al. (2012) após avaliação da sensibilidade de alguns antibióticos frente as cepas de *E.coli*, *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., identificou um perfil de sensibilidade para maioria dos fármacos com exceção de Ampicilina e Sulfametoxazol para *E.coli*, Ampicilina para *Salmonella* sp. e Ceftriaxona para *Shigella* sp. Havendo semelhança com o presente trabalho por existir resistência aos mesmos antibióticos, com exceção do Ceftriaxona, pois o mesmo não foi incluído na pesquisa.

4 CONCLUSÃO

Após a organização e análise dos dados foi visto a presença das principais bacteriais causadoras de gastroenterites nos grupos pesquisados. No entanto, houve destaques com relação aos resultados no sexo feminino e predomínio na faixa etária de 19-59 anos.

Em relação as bactérias pesquisadas *Escherichia coli* obteve predomínio, no entanto em todos os grupos pesquisados, houve crescimento de bactérias compatíveis com a flora.

De acordo com a pesquisa em questão, é notória a importância da realização da coprocultura, já que esta influencia consideravelmente no tratamento eficiente e no processo de resistência bacteriana., pois a determinação de cada patógeno frente ao antimicrobiano não é uma prática comum, colaborando para a utilização incorreta do medicamento.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, B. M. D. **Avaliação da frequência de bactérias causadoras de gastroenterite em pacientes ambulatoriais do Distrito Federal.** Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, 2014.
- ALMEIDA, C. et al. Gastroenterite a Salmonella em Idade Pediátrica. **Acta Medica Portuguesa**, v.25, n.4, 2012.
- ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução nº 510 de 07 de Abril de 2016**, 2016.
- BAESSE, J. M. S. **A implantação do manual de boas práticas: dificuldades, desafios e vantagem.** 2006. Trabalho de conclusão de curso (pós graduação em gastronomia e segurança alimentar) - Centro de Excelência em Turismo, 2006.
- BURDUNIUC, O. et al. The diversity and spread of genes encoding extended spectrum beta-lactamase enzymes in the strains of *Escherichia coli*. **Revista Curierul medical**, v.56, n. 6, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**, 2011.
- COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, v.7, n. 2, 2017.
- CUNHA, F. P. L. et al. *Shigella* sp.: Um problema de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 31, n., 2017.
- DA CÂMARA FLORES, A. M. P.; DE MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.37, n.1, 2015.
- DAMACENO L, et al. IV ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DA UFC NO CARIRI. A resistência bacteriana e a importância do antibiograma nessa problemática. **Ciências da Saúde**. Juazeiro do Norte-CE, 2012.
- DE OLIVEIRA, A. et al. *Salmonella* enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia biosfera-centro científico conhecer**, v. 9, n. 16, 2013.
- MOREIRA, V. M. et al. Incidência bacteriana da *Escherichia coli* e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes de um hospital oncológico. **Revista Científica da Faminas**, v.11, n.1, 2015.
- MOURA, M. R. S. et al. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Revista Brasileira de Saude Materno Infantil**, v. 12, n. 2, 2012
- NUNES, M. R. C. M. et al. Diarrhea associated with Shigella in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 2, 2012.

PEIXOTO, A, M, M. **Gastrenterite aguda bacteriana num serviço de urgência pediátrico**. Dissertação de mestrado apresentado a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2016.

PRATS, G. **Microbiología clínica**. Editora Médica Panamericana, 1ª Ed. 2006.

ROJAS, E. L. P.; PANDOLFI, D. L.; RAMÍREZ, P. R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: departamento de cuidados críticos, servicio de cuidados intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, **Acta Médica Peruana**, v.25, n.3, 2008.

SILVEIRA, L., PISTA, Â., MACHADO, J. Caracterização fenotípica de isolados de *Shigella* sp. entre 2015 e 2017. **Boletim Epidemiológico Observações**, v.7, n.21, 2018.

SIMOES, M. et al. *Salmonella Enteritidis*: importância do inquérito epidemiológico, análise de alimentos e coprocultura na elucidação de 167 surtos alimentares. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, 2010.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, 2010.