

Peran Berbagai Jenis Gen

by Wani D Gunardi

Submission date: 09-Aug-2021 03:03PM (UTC+0700)

Submission ID: 1629489487

File name: Peran_Berbagai_Jenis_Gen.pdf (354.43K)

Word count: 2555

Character count: 16112



Peran Berbagai Jenis Gen Virulensi *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) dalam Pembentukan Biofilm

Wani Devita Gunardi

Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Krida Wacana
Alamat korespondensi: wani.gunardi@ukrida.ac.id

Abstrak

Bakteri *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) merupakan bakteri penyebab tersering infeksi saluran kemih (ISK). Bakteri UPEC mempunyai gen virulensi yang memudahkan timbulnya ISK seperti *P fimbriae* (*papC*), type 1 *fimbriae* (*fimA*), *afimbrial adhesin* (*afaI*), *hemolisin* (*hlyA*), *cytotoxic necrotizing factor* (*cnf 1*), *aerobactin* (*aer*), *S fimbriae* (*sfaS*). Masing-masing dari gen virulensi ini memiliki perannya masing-masing dalam patogenesis ISK yaitu sistitis dan pielonefritis. Saat ini, banyak penelitian yang juga membahas hubungan faktor gen virulensi ini dengan kemampuannya membentuk biofilm, terutama pada bakteri UPEC penyebab ISK. Adanya kemampuan pembentukan biofilm dari bakteri UPEC pada ISK akan meningkatkan virulensi bakteri, sehingga terjadi peningkatan angka morbiditas dan kesulitan dalam terapi antibiotika dalam penatalaksanaannya.

Kata kunci: *Escherichia coli*, UPEC, biofilm, gen virulensi

The Role of Virulence Genes of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) on the Biofilm Formation

Abstract

Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) is one of the most common etiology in urinary tract infections. There are some virulence genes which cause urinary tract infections happen more easily, like *P fimbriae* (*papC*), type 1 *fimbriae* (*fimA*), *afimbrial adhesin* (*afaI*), *hemolisin* (*hlyA*), *cytotoxic necrotizing factor* (*cnf 1*), *aerobactin* (*aer*), *S fimbriae* (*sfaS*). Each of these genes has its own role in the pathogenesis of the urinary tract infection, in particular cystitis and pyelonephritis. Nowadays, many studies have reported the relationship between the virulence genes and the biofilm formation, especially on UPEC. UPEC was reportedly able to form the biofilm which increased the virulence of bacteria causing the rise of morbidity rate and failure of antimicrobial therapy.

Key words : *Escherichia coli*, UPEC, biofilm, virulence genes

Pendahuluan

Infeksi Saluran Kemih (ISK) yang disebabkan oleh *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) merupakan salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi pada masyarakat saat ini. Secara global, prevalensi ISK dengan etiologi UPEC adalah 75% - 95%. Manifestasi klinis dari ISK dapat berupa sistitis yang merupakan radang pada kandung kemih

sampai dengan pielonefritis yang merupakan radang pada sistem pelvis dan ginjal.¹

Dari beberapa penelitian diketahui, kejadian ISK rekuren disebabkan oleh UPEC yang mempunyai kemampuan untuk membentuk biofilm.² Faktor virulensi *Escherichia coli* sangat erat hubungannya dengan patogenesis *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih. Kolonisasi bakteri pada traktus urinarius merupakan tahap awal pada



proses infeksi. Tanpa berikatan dengan epitel-epitel pejamu, bakteri dalam traktus urinarius dapat hanyut terbawa secara mekanis oleh aliran urin.

Beberapa gen virulen yang paling penting dari galur UPEC dan berhubungan dengan infeksi saluran kemih berat adalah *P fimbriae* (*pap*), *type 1 fimbriae* (*fimA*), *afimbrial adhesin* (*afaI*), *hemolysin* (*hly*), *cytotoxic necrotizing factor* (*cnf 1*), *aerobactin* (*aer*), *S fimbriae* (*sfaS*). *P fimbriae* penting untuk kolonisasi dan ketahanan *E. coli* di kolon serta memungkinkan penyebaran ke traktus urinarius.³ Penelitian Fattahi et al (2015) memperlihatkan adanya hubungan antara gen virulensi *fimA*, *papC*, dan *hly* dengan pembentukan biofilm secara in vitro dari bakteri UPEC.⁴ Gen virulensi *papC* juga berperan sebagai alat transpor berupa kanal untuk pembentukan pili yang digunakan untuk melekat pada sel hospes atau bahan kateter.⁴

Kebanyakan kasus ISK merupakan penyakit yang didapat pada komunitas. *Uropathogenic Escherichia coli* berkolonisasi pada kandung kemih akan menyebabkan sistitis, dan dapat bermigrasi ke ginjal menjadi pielonefritis. *Uropathogenic Escherichia coli* sendiri memiliki beberapa faktor virulensi yang menimbulkan beberapa kerusakan jaringan maupun manifestasi klinis lainnya. Bakteri *Escherichia coli* yang mempunyai beberapa faktor virulensi antara lain *adhesins*, *α-hemolysin* (Hly), *cytotoxic necrotizing factor*, *fimbriae*, *aerobactin-mediated iron uptake*, *K1 capsular polysaccharide* yang menyebabkan ISK disebut *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC).^{1,4}

Berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri dan jamur dapat membentuk biofilm, dan komunitas dalam biofilm ini dapat terdiri atas satu atau lebih mikroorganisme. Dalam prosesnya, ternyata komunitas bakteri ini dapat saling bertukar materi genetik melalui plasmid dan mengubah fenotip bakteri dalam biofilm, akibatnya mikroorganisme yang tumbuh dalam biofilm menunjukkan sifat yang berbeda dibandingkan dengan bakteri planktonik asalnya.⁵

Tujuan dari penulisan makalah ini adalah untuk memperlihatkan berbagai jenis gen virulensi dari bakteri UPEC yang berperan dalam mekanisme pembentukan biofilm, dan dampak klinis dari pembentukan biofilm pada pasien-pasien ISK.

Mekanisme Pembentukan Biofilm

Baik bakteri maupun jamur dapat menyebabkan terjadinya pembentukan biofilm dan biofilm itu sendiri dapat terdiri atas satu atau lebih mikroorganisme.² Biofilm memiliki ciri fisiologis dan biokimiawi yang bervariasi seperti nutrisi, oksigen, laju pertumbuhan, dan genetik yang akan mempengaruhi pembentukannya. Mikroorganisme yang tumbuh dalam biofilm menunjukkan sifat yang berbeda dibandingkan dengan bakteri planktonik. Pada umumnya, biofilm dapat menyebabkan infeksi kronik, artinya infeksi menjadi persisten atau menetap meskipun telah diberikan terapi antibiotik adekuat dan kebal terhadap mekanisme pertahanan sistem imun tubuh. (6)

Kemampuan biofilm mencakup tiga komponen, yaitu kemampuan adhesi mikroorganisme baik ke permukaan kateter atau antar mikroorganisme satu dengan yang lainnya, perubahan ekspresi gen yang memberikan dampak pada perubahan fenotipe bakteri planktonik, dan membuat matriks ekstraseluler yang terdiri dari komponen-komponen pejamu dan sekresi dari produk-produk bakteri. (7) Pentingnya peranan biofilm dalam patogenesis ISK terkait kateter uretra (CAUTI), menjadikan biofilm sebagai target utama untuk dihambat pembentukannya.

Fungsi biofilm adalah dasar untuk melekatnya bakteri dan pertahanan bakteri terhadap tenaga aliran yang akan melepaskan bakteri dari permukaan sel target. Fungsi ini sangat berperan pada patofisiologi infeksi yang persisten karena sulit untuk dieradikasi dengan terapi antimikroba. Pada saat biofilm tersebut sudah menjadi matang sempurna, maka bakteri di dalamnya akan kebal terhadap sistem imun tubuh dan kerja antimikroba.⁸ Peningkatan ketebalan bakteri dalam biofilm terhadap antimikroba mencapai 100-1.000 kali dibandingkan dengan bakteri planktonik.^{8,9} Biofilm memungkinkan bakteri untuk hidup terlindung dari kondisi buruk atau berfluktuasi seperti faktor stres suhu ekstrem, pH, dan pajanan terhadap sinar UV.^{8,10}

Patogenesis Pembentukan Biofilm

Di dalam biofilm, bakteri dilindungi di dalam lapisan matriks ekstraseluler. Matriks ekstraseluler ini membentuk kira-kira 90% dari biomassa. Matriks ini terbentuk dari *extracellular polymeric substance* (EPS)



bersama-sama dengan karbohidrat yang berikatan dengan protein, dan saling melekat satu sama lain. Enzim yang dikeluarkan oleh bakteri akan memodifikasi komposisi struktur EPS pada keadaan lingkungan yang berubah-ubah. Hal ini memungkinkan struktur biofilm bertahan pada segala jenis keadaan lingkungan. Sifat-sifat komponen dari matriks ini memberikan kelembapan yang tinggi dan struktur yang kuat sehingga membuat bakteri tetap bertahan berdekatan satu sama lain, dan memungkinkan interaksi dari satu sel ke sel yang lainnya serta melakukan pertukaran materi DNA. Struktur ini juga yang akan melindungi bakteri dari proses desikasi, oksidasi, radiasi, dan materi lain yang dapat merusak bakteri.⁹

Biofilm terbentuk melalui lima tahapan yaitu tahap pertama adalah perlekatan bakteri planktonik ke permukaan lapisan kateter urin, tahap kedua adalah perlekatan yang sifatnya menetap (*irreversible*), tahap ketiga adalah pembentukan lapisan kompleks biomolekul dan matriks *extracellular polymeric substances* (EPS), dan membentuk mikrokoloni, tahap keempat adalah pematangan biofilm, dan tahap kelima terjadi pelepasan bakteri biofilm lagi untuk dapat kembali membentuk lapisan biofilm lainnya.^{2,11} Tahap yang paling sulit untuk antibiotika bekerja adalah pada saat biofilm sudah memasuki tahap keempat yaitu maturasi dari biofilm yang terjadi pada hari pertama sampai hari keempat.¹²

Pada tahapan biofilm matur, pelepasan bakteri dapat terjadi. Pelepasan ini memungkinkan sel-sel bakteri dalam biofilm menjadi bakteri planktonik dan dapat membentuk biofilm kembali di area atau tempat lain. Pelepasan bakteri ini dapat disebabkan oleh mekanisme aktif melalui bakteri itu sendiri, seperti degradasi enzimatik dari matriks biofilm dan tidak terjadinya *quorum sensing* sebagai respons terhadap perubahan lingkungan akibat berkurangnya oksigen dan nutrisi serta oleh mekanisme pasif yang disebabkan oleh tahanan luar dan erosi. Peluruhan biofilm memungkinkan bakteri migrasi dari lingkungan ke pejamu, antar-pejamu, dan dalam pejamu itu sendiri. Peranan c-di-GMP pada peluruhan biofilm adalah sebagai regulator utama dari bakteri, dan komunitasnya yaitu sebagai pembawa pesan kedua dalam transduksi sinyal pada sebagian besar spesies bakteri. Tingginya tingkat c-di-GMP dapat memertahankan kondisi bakteri yang non-aktif dan komunitas biofilm, sebaliknya tingkat c-di-GMP yang rendah akan

meningkatkan motilitas dan aktivitas dari bakteri.¹³ Kerja c-di-GMP sendiri diaktivasi oleh enzim *Diguanylate Monophosphate*. Rendahnya tingkat c-di-GMP akan memudahkan terjadinya proses dispersi, atau luruhnya biofilmnya serta lepasnya bakteri biofilm menjadi bakteri planktonik.^{5,9,13}

Faktor Gen Virulensi *Escherichia coli* Pembentuk Biofilm

Kebanyakan infeksi yang disebabkan oleh *E.coli* sangat berkaitan erat dengan faktor virulensi dari galur dan dari faktor pejamu, yaitu jika pejamu memiliki penyakit yang berhubungan dengan sistem traktus urinarius. Faktor virulensi sangat erat hubungannya dengan patogenesis *E.coli* pada infeksi saluran kemih.¹⁴ Beberapa gen virulen yang penting dari galur UPEC, dan berhubungan dengan infeksi saluran kemih berat adalah *P fimbriae (pap)*, *type 1 fimbriae (fimA)*, *afimbrial adhesin (afal)*, *hemolysin (hly)*, *cytotoxic necrotizing factor (cnf 1)*, *aerobactin (aer)*, *S fimbriae (sfa)*. *P fimbriae* ini penting untuk kolonisasi dan ketahanan *E. coli* di kolon, serta memungkinkan penyebaran ke traktus urinarius.³

Gen *papC* mengkode protein membran luar yang penting untuk regulasi biogenesis *P fimbriae*. Gen *papC* yang terdeteksi berhubungan dengan pielonefritis dan ditemukan pada 60% galur *E.coli*. Adanya gen ini diketahui berhubungan dengan kemampuan kolonisasi di epitel traktus urinarius. Gen virulensi lainnya yang juga banyak terdapat adalah *fimH*. Kedua gen virulensi ini memegang peranan penting dalam proses perlekatan bakteri pada sel hospes atau materi inorganik.¹⁵

Faktor-faktor virulensi ini membantu organisme untuk berkolonisasi pada permukaan pejamu, menghindari dan atau mengganggu mekanisme pertahanan pejamu, melukai dan atau menginvasi sel-sel pejamu dan jaringan sekitarnya, serta menginisiasi respons inflamasi, sehingga menyebabkan munculnya gejala-gejala klinis. *P fimbriae* ini penting untuk kolonisasi dan ketahanan *E. coli* di kolon serta memungkinkan penyebaran ke traktus urinarius.³

Type 1 fimbriae (fim A) memegang peranan penting dalam proses kolonisasi pertama kali pada kandung kemih. Sementara itu, *fimH adhesin* memediasi proses perlekatan ke epitelium kandung kemih dan sel-sel *mast*, yang memungkinkan bakteri untuk terlindung dari

imunitas pejamu dan serangan antibiotika. *S fimbriae E. coli* berikatan dengan reseptor yang mengandung asam sialat. Kompleks adhesin *S fimbriae* ini terdiri atas empat protein yaitu *SfaA* yang mewakili protein fimbriin utama, dan *SfaG*, *SfaS*, dan *SfaH*, yang merupakan subunit minor. Gen *sfaS* paling banyak ditemukan secara eksklusif pada isolat-isolat yang juga memiliki faktor virulen *hlyA* dan *cnf-1* yang berhubungan dengan kasus sistitis.¹⁵ Tipe I *fimbriae* berhubungan erat dengan terjadinya kasus pielonefritis.⁴

Seperti yang sudah diketahui bahwa terdapat gen-gen khusus dalam pembentukan biofilm yang memiliki sifat virulensi yang menyebabkan ISK. Berdasarkan hasil penelitian Fattahi, isolat *E. coli* yang memiliki gen *fimA* dan *papC* memiliki hubungan dengan pembentukan biofilm, diikuti oleh gen *hlyA*. Gen *papC* berkorelasi dalam meningkatkan terjadinya pembentukan biofilm.⁴

Beberapa hasil penelitian menunjukkan hubungan yang bermakna antara ekspresi gen virulensi dalam UPEC dengan pembentukan biofilm. Hal ini memperlihatkan juga bahwa bakteri pembentuk biofilm bersifat lebih patogen dari bentuk planktonik dalam patogenesis ISK. Biofilm sendiri juga meningkatkan faktor virulensi bakteri sehingga dapat meningkatkan komplikasi dari ISK itu sendiri dan membuat sulit untuk diobati.⁴

Dampak Klinis Biofilm

Biofilm menyebabkan peningkatan virulensi suatu penyakit. Selain sistitis dan pielonefritis, biofilm pada saluran kemih dapat menyebabkan prostatitis, asimtomatik bakteriuria, dan juga uretrolitiasis (yang terjadi akibat kolonisasi berkepanjangan). Menurut beberapa studi, biofilm juga menyebabkan obstruksi pada pemakaian *device* saluran kemih seperti pada pemasangan *stent*. Akibat dari obstruksi ini dapat terjadi sepsis yang tentu saja dapat berakibat fatal.^{16,17}

Biofilm juga dapat menimbulkan ISK berulang dan menjadi kronik. Proses penyembuhan menjadi lebih lama serta menimbulkan resistensi terhadap beberapa antibiotika juga sering dialami. Ada peningkatan resistensi bakteri pembentuk biofilm terhadap antibiotika dibandingkan dengan bakteri planktonik, serta memungkinkan terjadinya perubahan sifat genetik bakteri yang terdapat dalam biofilm, menjadi lebih virulen¹⁸

Kesimpulan

Terdapat beberapa gen virulensi pada bakteri UPEC seperti *papC*, *fim A*, *hlyA*, dan *sfaS* yang memiliki perannya masing-masing dalam mekanisme pembentukan biofilm. Infeksi Saluran Kemih (ISK) adalah salah satu penyakit infeksi yang banyak menyerang manusia. *Escherichia coli* adalah bakteri penyebab tersering terjadinya ISK. Faktor virulensi pada bakteri UPEC dan terjadinya pembentukan biofilm dapat menurunkan tingkat kesembuhan dari ISK karena peningkatan resistensi, sehingga lebih sulit diterapi dan menyebabkan dampak klinis berupa ISK berulang.

Daftar Pustaka

1. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinant of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4):1–32.
2. Soto SM, Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Adv Biol [Internet]*. 2014:1–13.
3. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5(1):11.
4. Fattahi, S; Kafil, H. S., Nahai, M. S., Asgharzadeh, M., Aghazadeh M, Nori R. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran 2015;10(August):1–7.
5. Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015;7(July 2014):1–7.
6. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of bio film infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;1–25.
7. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of*



8. Infection Control. 2010;32(3):177–83.
8. Murugan K, Selvanayaki K, Al-Sohaibani S. Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. *Saudi J Biol Sci.* 2016;23(1):150–9.
9. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013.
10. Amalaradjou MAR, Venkitanarayanan K. Role of Bacterial Biofilms in Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTI) and Strategies for Their Control. In: *Recent Advances in the Field of Urinary Tract Infections.* USA: INTECH; 2013. p. 1–31.
11. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):20983–1005.
12. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res Int [Internet].* 2015;2015:1–17.
13. Cole SJ, Lee VT. Cyclic Di-GMP Signaling Contributes to *Pseudomonas aeruginosa* - Mediated Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *J Bacteriol.* 2016;198(1):91–7.
14. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens.* 2014;(3):596–632.
15. Rijavec M, Miller-Premru M, Zakotnik B, Ilgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol.* 2008;57(11):1329–34.
16. Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *J Urol.* 2007;177(1):365–8.
17. Maheswari UB, Palvai S, Anuradha PR, Kammili N. Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian J Urol.* 2013;29(4):277–81.
18. Rossi E, Cimdins A, Lüthje P, Brauner A, Sjöling Å, Landini P, et al. “It’s a gut feeling” – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol.* 2017;7828(May):1–30.

Peran Berbagai Jenis Gen

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

19%

INTERNET SOURCES

19%

PUBLICATIONS

16%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1 mlj.goums.ac.ir Internet Source 1%

2 cdn.neoscriber.org Internet Source 1%

3 Rehab Mahmoud Abd El-Baky, Reham Ali Ibrahim, Doaa Safwat Mohamed, Eman Farouk Ahmed, Zeinab Shawky Hashem. "

Prevalence of Virulence Genes and Their Association with Antimicrobial Resistance Among Pathogenic *E. coli* Isolated from Egyptian Patients with Different Clinical Infections

", Infection and Drug Resistance, 2020

Publication

4 jmw.jia.ac.ir Internet Source 1%

5 repositorio.unicamp.br Internet Source 1%

6	Magda Ferreira, Sandra Aguiar, Ana Bettencourt, Maria Manuela Gaspar. "Lipid-based nanosystems for targeting bone implant-associated infections: current approaches and future endeavors", Drug Delivery and Translational Research, 2020 Publication	1 %
7	lume.ufrgs.br Internet Source	1 %
8	bmcinfectdis.biomedcentral.com Internet Source	1 %
9	Angela Ma, Norman Neumann, Linda Chui. "Phenotypic and Genetic Determination of Biofilm Formation in Heat Resistant Escherichia coli Possessing the Locus of Heat Resistance", Microorganisms, 2021 Publication	1 %
10	etd.adm.unipi.it Internet Source	1 %
11	bmcbgenomics.biomedcentral.com Internet Source	1 %
12	publicatio.bibl.u-szeged.hu Internet Source	1 %
13	www.elsevier.es Internet Source	1 %

14	Maryam Banar, Mohammad Emaneini, Reza Beigverdi, Rima Fanaei Pirlar et al. "The efficacy of lyticase and β -glucosidase enzymes on biofilm degradation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains with different gene profiles", BMC Microbiology, 2019 Publication	1 %
15	fjfsdata01prod.blob.core.windows.net Internet Source	1 %
16	www.scribd.com Internet Source	1 %
17	ijpsr.com Internet Source	1 %
18	www.produccioncientificaluz.org Internet Source	1 %
19	Maryam Haghghatpanah, Ali Mojtahedi. " Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of <i>Escherichia coli</i> strains isolated from Iranian inpatients with urinary tract infections ", Infection and Drug Resistance, 2019 Publication	1 %
20	sinta3.ristekdikti.go.id Internet Source	<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On

Peran Berbagai Jenis Gen

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5
