

Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso

Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida¹, Renata Pereira Faria¹,
Maria Fernanda Aranega Pimentel¹, Magyda Arabia Araji Dahroug¹,
Nívea Clarice Monteiro Rocha Turbino¹ e Valéria Régia Franco Sousa¹

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses em expansão no Brasil, tendo o cão importância na transmissão e dispersão da doença, principalmente em áreas de leishmaniose visceral. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá. Para a pesquisa foram selecionados quatro bairros de Cuiabá, sendo um em cada regional administrativa. A amostragem canina foi definida estatisticamente, considerando-se a prevalência de 8,4%. Dos 468 cães analisados, 16 foram reagentes na imunofluorescência indireta, obtendo-se uma prevalência geral de 3,4%. Não foi observada predisposição racial, sexual e etária para a ocorrência da leishmaniose canina. Os principais fatores de risco identificados na ocorrência da infecção canina na Cidade de Cuiabá, foram a localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências de matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano.

Palavras-chaves: Epidemiologia. Cão. *Leishmania* spp. Cuiabá.

ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonoses that are undergoing expansion in Brazil. Dogs are of importance regarding transmission and dispersion of the disease, especially in areas presenting visceral leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the seroprevalence of leishmaniasis among domestic dogs in the urban area of Cuiabá. For this investigation, four districts of Cuiabá were selected, one in each administrative region. The dog sampling was defined statistically, taking the prevalence to be 8.4%. Among the 468 dogs examined, 16 presented an indirect immunofluorescence reaction, thus resulting in an overall prevalence of 3.4%. There was no predisposition towards canine leishmaniasis occurrences in relation to breed, sex or age. The main risk factors for occurrences of canine infection identified in the city of Cuiabá were the presence of dogs living in areas surrounding homes and the proximity of homes to forests. Thus, there have been changes in leishmaniasis occurrences within the urban environment.

Key-words: Epidemiology. Dog. *Leishmania* spp. Cuiabá.

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). É endêmica em 88 países, infectando cerca de 12 milhões de pessoas em todo mundo, e 350 milhões estão sob risco de adquirir a doença, com incidência anual de um a 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos da forma visceral, muitas vezes fatal. Nas Américas, o Brasil é o país com mais registros de casos, tanto da forma cutânea como visceral²⁸.

O cão está frequentemente envolvido no ciclo urbano da leishmaniose. Baseado em estudo de soroprevalência na Espanha,

França, Itália e Portugal tem-se estimado que cerca de 2,5 milhões de cães nesses países estejam infectados com leishmaniose visceral. Nas Américas, estima-se também que milhões de cães tenham a infecção, principalmente no Brasil⁴. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente sadios a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença com intenso parasitismo cutâneo. Assim, o cão representa uma fonte de infecção para o vetor, precedendo a maioria dos casos no homem⁵ e promovendo a dispersão da doença para áreas não-endêmicas^{3 15}.

Os estudos de prevalência da doença canina em diversas cidades do Brasil têm detectado índices de 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais⁹ e 40,3% em Paulista, Pernambuco⁶. Em Cuiabá, estudos de prevalência determinaram valores altos (64%), no período de 1997 a 1998¹⁶, enquanto estudos mais recentes demonstraram índice de 8,4%¹⁴. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em extensas áreas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e

1. Departamento de Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

Apoio financeiro: CNPq/DECIT – MS, FAPEMAT e CAPES

Endereço para correspondência: Dra. Valéria Régia Franco Sousa. Dept^o de Clínica Médica Veterinária/UFMT. Av. Fernando Corrêa da Costa s/n, HOVET, Campus UFMT, 78060-900 Cuiabá, MT.

Tel: 55 65 3615-8664; Fax: 55 65 3615-8664

e-mail: regia@ufmt.br

Recebido para publicação em 02/10/2008

Aceito em 05/03/2009

na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária¹¹.

Baseando-se neste fato, este trabalho teve como finalidade avaliar a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá, Mato Grosso, correlacionando os principais fatores de risco.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo transversal foi realizado em Cuiabá, Mato Grosso, no período de setembro de 2007 a março de 2008, situada no bioma cerrado e cercada pelo pantanal e floresta amazônica, incluindo os seguintes bairros: Jardim Universitário (15° 36' 40.17 S e 56° 02' 35.03 O); Morada do Ouro (15° 34' 32.93 S e 56° 03' 20.38 O); CoopHEMA (15° 38' 05.36 S e 56° 03' 57.89 O), e o bairro Cidade Alta (15° 36' 28.14 S e 56° 07' 21.34 O), totalizando 19.104 habitantes²⁰.

Descrição dos animais. No inquérito sorológico, analisaram-se 468 cães. Estes, de ambos os sexos e idade igual ou superior a seis meses, foram examinados clinicamente e agrupados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos¹³ e as informações anotadas em fichas individuais. Durante a visita, aplicou-se um questionário aos proprietários a fim de se obter dados sobre: origem do cão, tempo de residência na casa, acesso do cão à rua e zona rural, ambiente de permanência do animal na casa (peri ou intradomiciliar), convívio com outros cães, e a presença de caracteres ambientais visando estabelecer os possíveis fatores de risco da doença nas distintas regiões de Cuiabá.

Coleta de amostras e análise sorológica. As amostras sanguíneas coletadas por venopunção jugular foram armazenadas em recipiente térmico com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Leishmanioses do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, sendo centrifugadas por 10 minutos a 800g. Posteriormente, os soros obtidos foram acondicionados em microtubos identificados e congelados a -20°C até a realização da prova sorológica. A imunofluorescência indireta foi executada através de *kit* comercial (BioManguinhos®/FIOCRUZ) seguindo recomendação do fabricante. Na reação, considerou-se reagente titulação igual ou superior a 1:40, tomando como referência os soros controle positivo e negativo incluídos em cada lâmina.

Análise estatística. A amostragem canina e a análise estatística foram definidas pelo programa Epi info 3.3.2 (CDC, EUA), considerando a proporção de cães em relação ao

homem de 7:1²², prevalência de 8,4%¹⁴, intervalo de confiança de 95% e erro aceitável de 2%, através do teste de qui-quadrado para comparar a soroprevalência ao gênero, faixa etária, quadro clínico e localização geográfica dos cães examinados, sendo considerado estatisticamente significativo valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

No inquérito sorológico, foram pesquisados 468 cães, encontrando 16 cães reagentes para leishmaniose. A prevalência estimada nos quatros bairros estudados foi de 3,4%, variando em decorrência do bairro analisado (**Tabela 1**). Dentre as 468 amostras, não houve predominância sexual, etária, nem racial ($p \geq 0,05$), encontrando-se anticorpos em cães mestiços (10) e de raça pura (6), como *rottweiler*, *fox paulistinha*, *boxer*, *pit bull*, *poodle* e *cocker spaniel*.

Nove cães não apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença, enquanto quatro foram oligossintomáticos e três sintomáticos, ocorrendo diferença significativa entre o primeiro e os outros dois grupos, não sendo observada tal diferença entre os oligossintomáticos e os assintomáticos. Os sinais clínicos observados nos cães sororeagentes foram os dermatológicos, principalmente alopecia, úlcera de ponta de orelha e descamação, seguidos de linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e distúrbios oftálmicos como conjuntivite. Em relação ao título de anticorpos, cinco apresentavam fluorescência na diluição de 1:40, dois na de 1:80, três 1:160, cinco 1:320 e um na diluição de 1:640. No grupo dos cães soronegativos para leishmaniose, 340 encontravam-se assintomáticos, 102 oligossintomáticos e 10 sintomáticos.

Analisando os dados informados pelos proprietários dos cães pesquisados não se obteve diferença estatística significativa $p \geq 0,05$ quanto ao acesso dos cães à rua ou a ambiente rural, nem quanto ao local de origem destes animais, o tempo de residência dos mesmos na casa e a convivência com outros cães.

Os principais fatores de risco identificados para infecção canina foram a permanência em ambiente peridomiciliar, com 100% (16) dos cães sororeagentes e a proximidade das residências da mata, entretanto tal significância foi observada também nas residências com ausência de todos os fatores ambientais analisados (**Tabela 2**). Enquanto a proximidade a terreno baldio, rio, represa ou córrego analisados isoladamente não foram determinantes para a ocorrência de leishmaniose canina.

TABELA 1

Soroprevalência para leishmaniose em cães domiciliados em Cuiabá, Mato Grosso.

Bairros	Total de cães	Cães positivos (n ^o)	Prevalência de LVC (%)
Jardim Universitário	192	3	1,5
Morada do Ouro	88	5	5,7
Cidade Alta	111	8	7,7
CoopHEMA	74	0	0,0
Total	468	16	3,4

LVC: leishmaniose visceral canina.

TABELA 2

Relação do ambiente à soroprevalência para leishmaniose dos cães domiciliados em Cuiabá, Mato Grosso.

Variáveis Ambientais	Cães (n ^o)	Positivos		χ^2	p
		n ^o	%		
Ausência de fatores ambientais					
sim	77	6	7,8	3,87	0,049*
não	391	10	2,6		
Presença de mata					
sim	225	2	0,9	6,99	0,008*
não	243	14	5,8		
Terreno baldio					
sim	134	6	4,5	0,27	0,60
não	334	10	3,0		
Rio/córrego/represa					
sim	14	2	14,3	2,33	0,12
não	454	14	3,1		

*significativo em nível de 5% de probabilidade estatística.

DISCUSSÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral tem passado por uma mudança na sua epidemiologia, com inúmeros casos da doença no ambiente urbano, tendo o cão papel fundamental nessa expansão, principalmente em áreas endêmicas⁹. A soroprevalência da doença apresenta-se bastante variável, dependente da região^{9,17}. Cuiabá apresentou prevalência superior à encontrada^{14,16}. De acordo com a literatura, a distribuição da frequência da doença sugere uma variação sazonal que pode estar relacionada com os picos de abundância e redução populacional do vetor²¹, justificando a ocorrência de dados divergentes sobre a prevalência canina em Cuiabá e no Brasil.

A taxa de prevalência média de áreas de risco e a taxa de prevalência geral de um determinado município podem variar em decorrência do teste diagnóstico, da forma de localização dos cães soropositivos e da definição da população adotada¹¹. Para este estudo, as áreas foram selecionadas com base em dados de ocorrência prévia da doença canina obtidos da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, dados este que ajudam no monitoramento e controle da leishmaniose visceral canina, devendo ser buscados pelos órgãos de saúde¹¹.

A alta carga parasitária presente na pele dos cães tem levado ao desenvolvimento de diversas pesquisas com este reservatório, já que muitos desses animais não desenvolvem alterações clínicas ou o fazem tardiamente^{6,24,25}. A presença de 50 a 70% de cães assintomáticos em áreas endêmicas, potencialmente infectantes para o vetor¹², denota a importância dos inquéritos sorológicos caninos para que se antecipem as ações profiláticas, já que os casos caninos precedem a doença no homem¹⁸. Nesta investigação, a porcentagem obtida de cães assintomáticos foi de 56,2%, não divergindo do cenário encontrado no país.

Pelos dados epidemiológicos dos cães pesquisados, não foi observada predisposição sexual, concordando com outros estudos realizados^{9,17}. Entretanto, autores¹¹ observaram diferença

significativa entre sexos para a infecção por *Leishmania* sp, sendo os machos os mais frequentemente parasitados, todavia, estudo desenvolvido em 2003², ao analisar a variável gênero em associação com a moradia rural ou urbana, obteve uma maior infecção das fêmeas que viviam em ambiente rural.

Estudos demonstram uma predisposição dos cães adultos em adquirirem a doença, associada provavelmente ao longo período de incubação³. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os cães, referente à faixa etária^{11,17}, demonstrando não predisposição etária à infecção, apesar de maior número de cães sororreagentes terem sido encontrados com mais de seis anos de idade, discordante de resultados onde se observaram uma positividade sorológica estatisticamente significativa nos cães jovens^{6,25}. Nenhuma raça foi determinada como predisposta a infecção por *Leishmania* sp. Trabalhos descrevem as raças Boxer e Cocker spaniel como susceptíveis a adquirirem a doença⁹, bem como resistência da raça Ibizan hound²⁶. De acordo com os dados obtidos se observa que as variáveis, raça, sexo e idade não são considerados fatores de risco da leishmaniose canina na Cidade de Cuiabá, MT. Estes aspectos variam de acordo com o município estudado, tendo em vista as características ecoepidemiológicas da doença em diferentes regiões.

Trabalhos apontam a escolha dos testes sorológicos como de extrema importância para um bom inquérito epidemiológico^{6,8}. A imunofluorescência indireta é a técnica sorológica preconizada pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência, juntamente com o ensaio imunoenzimático (ELISA), por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e fácil execução²³. Falhas na detecção da infecção por estes testes podem ocorrer nos animais que se apresentam no período de incubação da doença ou soroconversão⁸.

A titulação apresentada nos animais assintomáticos pode variar, como observado neste estudo, onde nove cães sem alterações clínicas no momento da pesquisa apresentaram titulação de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, sendo a primeira mais frequente, com três animais. No entanto, os cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram a mesma variação, sendo apenas um sintomático com título maior ou igual a 1:640. Entretanto, alguns autores¹ descrevem os dois últimos grupos com maior potencial de infecção para os flebotomíneos, por apresentarem um parasitismo disseminado em vários órgãos e também uma maior concentração de amastigotas na pele²⁵.

As manifestações clínicas observadas nos cães sororreagentes, como alterações dermatológicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e oftalmopatias, são similares às observadas em outros estudos^{7,21,24}. As alterações cutâneas são os sinais clínicos mais comumente observados na leishmaniose visceral canina^{7,10}. Tal característica foi observada neste estudo onde todos os cães com manifestações clínicas da doença apresentavam alguma alteração cutânea, como alopecia, descamação e úlcera de ponta de orelha.

A observação dos cães reagentes em ambiente peridomiciliar condiz com a literatura², sendo tal fato associado ao maior contato destes com o vetor. Entretanto, pesquisadores^{17,19} observaram uma maior exposição dos cães, com livre acesso a rua, à infecção do

que aqueles com permanência exclusiva no ambiente domiciliar. Tal fato não foi observado no presente estudo, nem por Julião e cols¹¹, indicando que o acesso à rua não influencia na ocorrência da infecção em cães de Cuiabá.

Estudos elucidam a proximidade da moradia dos cães da mata e vegetação abundante como fatores de risco para a infecção por *Leishmania* sp^{21 25 27}, evento evidenciado nesta pesquisa (**Tabela 2**). Este fato pode estar associado a um ambiente de modificação ambiental recente, com matéria orgânica em quantidade favorável ao desenvolvimento vetorial e conseqüente manutenção da doença^{7 21}.

A observação de seis cães reagentes em casas com ausência de mata, terreno baldio ou rio, dado este significativo (**Tabela 2**), bem como 93,7% e 75% dos cães se originarem de Cuiabá e residirem há mais de um ano na região pesquisada, respectivamente, apesar de não serem estatisticamente significativos, reforça o processo de urbanização da leishmaniose visceral^{15 23} nos últimos anos e as mudanças nos aspectos com compõem a cadeia de transmissão, bem como a ocorrência de casos caninos autóctones na capital de Mato Grosso.

Por ter um importante papel na epidemiologia da leishmaniose visceral urbana, os inquéritos caninos são de extrema importância. Entretanto, o estudo das espécies de *Leishmania* circulantes, outros possíveis hospedeiros e os vetores são imprescindíveis para um bom entendimento da doença e controle.

REFERÊNCIAS

- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology* 127: 227-232, 2005.
- Amóra SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, Rocha MFG. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural* 36:1854-1859, 2006.
- Arias JR, Monteiro P, Zicker F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2:145-146, 1996.
- Baneth G. Leishmaniasis. In: Greene CE (ed) *Infectious Diseases of the dog and cat*. 3rd edition, Saunders Elsevier, Saint Louis, p.685-698, 2006.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48:151-156, 2006.
- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 140:54-60, 2006.
- Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária* 28:36-44, 2000.
- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CME. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology* 146:235-241, 2007.
- França-Silva JC, Costa T, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 111:161-173, 2003.
- Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. *Review Scientific and Technical Office International des Epizooties* 23:661-676, 2004.
- Julião FS, Souza BMPS, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG, Souza VMM, Barrouin-Melo SM, Moreira Jr ED, Paule BJA, Franke CR. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27:319-324, 2007.
- Madeira ME, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases* 8:440-444, 2004.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:566-567, 1998.
- Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40:42-48, 2007.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:147-152, 2005.
- Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Silva RR. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 36:101-102, 1999.
- Naveda LAB, Moreira EC, Machado JG, Moraes JRC, Marcelino AP. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58:988-993, 2006.
- Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1231-123, 2001.
- Oliveira SS, Araújo TM. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cadernos de Saúde Pública* 19:1681-1690, 2003.
- Prefeitura Municipal de Cuiabá. Perfil Socioeconômico de Cuiabá, volume II. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Urbano. Cuiabá, 2004.
- Rondon FCM, Bevilacqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, Diniz AT. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 155:24-31, 2008.
- Savani ESM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'áuria SRN. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 37:260-262, 2003.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Brasília, 2003.
- Silva ES, Gontijo CME, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:285-291, 2001.
- Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cadernos de Saúde Pública* 21:324-328, 2005.
- Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 90:37-45, 2000.
- Vanzeli AC, Kanamura HY. Estudo dos fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Revista Panamericana de Infectologia* 9:20-25, 2005.
- World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível na Web-site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 25/06/2008.