



ORIGINAL

Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina



Camila Sosa^a, Liliana Tirante^b, Javier Chaves^b, Martín Pol^b, Arnaldo Ambrogi^a, José Angel Giraud^a y Pablo Tamiozzo^{a,*}

^a Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, República Argentina

^b Laboratorio Lactodiagnóstico Sur Sociedad Responsabilidad Limitada (SRL), Olivos, Buenos Aires, República Argentina

Recibido el 28 de septiembre de 2016; aceptado el 22 de febrero de 2017

Disponible en Internet el 28 de septiembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Ganado lechero;
Mycoplasma bovis; *Mycoplasma bovirhinis*; *Mycoplasma alkalescens*; *Mycoplasma arginini*; *Mycoplasma bovirhinis*; *Ureaplasma diversum*; PCR; Argentina

Resumen Varias especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma diversum* pueden causar enfermedades en el ganado bovino lechero, asociadas o no a manifestaciones clínicas. En nuestro país, ha sido detectada la presencia de solo tres especies de este grupo hasta el momento: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma canadense*. El objetivo del presente trabajo fue identificar otras especies de la familia *Mycoplasmataceae*. Se estudiaron treinta y cinco aislamientos compatibles con *Mycoplasma* spp. obtenidos a partir de diferentes muestras de bovinos, con o sin sintomatología clínica, provenientes de ocho rodeos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y San Luis. Mediante el uso de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) específicas de especie se identificaron *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovirhinis* y *U. diversum*, y mediante la amplificación y posterior secuenciación del espacio intergénico 16-23S ARNr se identificaron *Mycoplasma arginini* y *M. californicum*. La identificación de estas especies por primera vez en nuestro país es un hecho de relevancia, que representa un importante avance en el conocimiento para incluir estos patógenos en el diagnóstico diferencial de determinadas entidades clínico-patológicas de los bovinos de Argentina.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Dairy cattle
Mycoplasma bovirhinis;

Identification of species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma diversum* from Argentinian dairy herds

Abstract Several species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma diversum* can cause diseases in dairy

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar (P. Tamiozzo).

Mycoplasma
alkalescens;
Mycoplasma
arginini;
Mycoplasma
bovirhinis;
Ureaplasma
diversum;
PCR;
Argentina

cattle, which can be associated or not with clinical manifestations. In our country, the presence of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma canadense* has been detected, being the only mycoplasma species identified so far. The objective of this study was to identify other species of the *Mycoplasmataceae* family. Thirty-five *Mycoplasma* spp.-like isolates obtained from different samples from cattle, with or without clinical symptoms, from eight herds located in the provinces of Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires and San Luis were utilized in the present study. Through the use of species-specific polymerase chain reactions (PCR) *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma bovirhinis* and *U. diversum* were identified and through amplification and further sequencing of the 16-23S rRNA intergenic spacer regions, *Mycoplasma arginine* and *M. californicum* were identified. The identification of these species represents an important advance in knowledge in order to include these pathogens in the differential diagnosis of certain clinical and pathological entities of cattle from Argentina. © 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La familia *Mycoplasmataceae* comprende dos géneros de significación como patógenos para el hombre y los animales domésticos, que son *Mycoplasma* y *Ureaplasma*¹⁷. Algunos miembros de esta familia pueden causar en el ganado bovino lechero enfermedades con manifestaciones clínicas como neumonías, conjuntivitis, poliartritis, otitis, mastitis, agalactia, aborto e infertilidad¹⁴.

Si bien *Mycoplasma bovis* es el agente responsable más importante de brotes de mastitis causados por *Mycoplasma*, otras especies como *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma alkalescens* también han sido aisladas de leche⁵ y asociadas con algunas de las enfermedades mencionadas¹⁴. En nuestro país, se informó la presencia de *M. bovis* en un brote de mastitis en la provincia de Buenos Aires⁴ y posteriormente se detectó *M. californicum* y *M. canadense* a partir de muestras de leche de tanque de enfriado en dos tambos de esa misma provincia¹⁹; estas son, hasta el momento, las únicas especies de *Mycoplasma* informadas.

El otro miembro de la familia *Mycoplasmataceae* que puede afectar al ganado bovino lechero es *Ureaplasma diversum*. Inicialmente se la consideró una especie no patógena, dado que es un comensal de la mucosa genital y su aislamiento no es prueba suficiente de enfermedad; sin embargo, varios estudios han demostrado que puede causar fallas reproductivas^{8,11}. En nuestro país no ha sido informada su presencia hasta el momento.

El conocimiento de la presencia y la circulación de estos patógenos en rodeos lecheros de nuestro país es importante para los profesionales veterinarios encargados de controlar su sanidad, y también para los laboratorios de diagnóstico, que deberían ofrecer alternativas para la detección certera de estos agentes, con el objeto de contribuir a optimizar el tratamiento y el control de las enfermedades que estos organismos producen.

El objetivo del presente estudio fue identificar a nivel de especie 35 aislamientos compatibles con *Mycoplasma* spp. obtenidos de muestras de bovinos con o sin sintomatología clínica.

Materiales y métodos

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina), de acuerdo con las normas internacionales del Consejo Internacional de Organizaciones de las Ciencias Médicas (CIOMS).

Origen de los aislamientos

Un total de 35 aislamientos provenientes de vacas, terneros y toros de 8 rodeos lecheros ubicados en las provincias de Córdoba, San Luis, Santa Fe y Buenos Aires fueron utilizados en el presente estudio. Los aislamientos habían sido obtenidos a partir de los siguientes tipos de muestras: 5 muestras de lavado bronquio-alveolar (LBA) de terneros con problemas respiratorios del rodeo A; 5 muestras de leche de cuartos mamarios de vacas con mastitis clínica y 17 muestras de raspado prepucial (RP) de toros sanos del rodeo B; 2 muestras de leche de vacas con mastitis subclínica del rodeo c; una muestra de LBA de ternero con problemas respiratorios del rodeo D; 2 muestras de leche de cuartos mamarios de vacas con mastitis clínica del rodeo E; una muestra de leche de tanque del rodeo F; una muestra de leche de cuarto mamario de vaca con mastitis clínica del rodeo G, y una muestra de leche de cuarto mamario de vaca con mastitis clínica del rodeo H (tabla 1).

Cultivo y determinación de especie

Los aislamientos se obtuvieron cultivando las muestras en placas de medio de Hayflick modificado durante al menos 7 días a 36 (± 1) °C con 10% CO₂. Las colonias sospechosas fueron identificadas por examen diario de las placas utilizando lupa estereoscópica. Finalmente, las colonias fueron repicadas en caldo de Hayflick modificado e incubadas por 48 h bajo iguales condiciones.

Para la extracción del ADN, 1 ml del caldo fue centrifugado a 8.000 g durante 10 min, el sedimento fue lavado 2 veces con solución salina bufferada, luego resuspendido en

Tabla 1 Cantidad de muestras positivas a cada especie de *Mycoplasma* y *U. diversum* según tipo de muestra, historia clínica de los animales y ubicación de los establecimientos

Rodeo	Ubicación	Historia clínica	Tipo de muestra	Cantidad de muestras analizadas	Cantidad de muestras positivas a cada especie
A	Santa Fe	Terneros con problemas respiratorios	LBA	5	5/5 <i>M. bovirhinis</i>
B	Buenos Aires	Vacas con mastitis clínica	Leche de cuarto mamario	5	1/5 <i>M. bovirhinis</i> 2/5 <i>M. californicum</i>
		Control de venéreas	RP	17	11/17 <i>U. diversum</i> 1/17 <i>M. bovigentalum</i>
C	Córdoba	Vacas con mastitis subclínica	Leche de cuarto mamario	2	2/2 <i>M. alkalescens</i>
D	Buenos Aires	Ternero con problemas respiratorios	LBA	1	1/1 <i>M. arginini</i>
E	Buenos Aires	Vacas con mastitis clínica	Leche de cuarto mamario	2	1/2 <i>M. bovirhinis</i> 1/2 <i>M. alkalescens</i>
F	San Luis	Tambo con antecedentes de mastitis	Leche de tanque	1	1/1 <i>M. bovirhinis</i>
G	Córdoba	Vaca con mastitis clínica	Leche de cuarto mamario	1	1/1 <i>M. bovirhinis</i>
H	Buenos Aires	Vaca con mastitis clínica	Leche de cuarto mamario	1	1/1 <i>M. bovirhinis</i>

150 µl de agua bidestilada estéril, hervido en bloque seco a 100 °C durante 10 min y centrifugado a 12.000 g por 2 min. Se reservaron alícuotas de 100 µl de sobrenadante para conservar a -20 °C hasta el procesamiento.

En primera instancia, se comenzó con la identificación de *M. bovigentalum* y *M. bovirhinis*, de modo que el ADN de los 35 aislamientos fue procesado utilizando cebadores y condiciones previamente descritas⁹. Dado que 4 aislamientos del rodeo B, los 2 del rodeo C, el único del rodeo D y uno del rodeo E no fueron identificados como *M. bovigentalum* ni como *M. bovirhinis*, el ADN de esos aislamientos fue amplificado en una segunda instancia bajo las condiciones previamente descritas, pero utilizando los cebadores correspondientes a *M. alkalescens*⁹.

Debido a que 2 aislamientos obtenidos de leche de vacas con mastitis clínica del rodeo B y el único aislamiento del rodeo D tampoco fueron identificados como *M. alkalescens*, el ADN de esos aislamientos fue amplificado en una tercera instancia utilizando los cebadores y condiciones descritas por Harasawa et al.⁷, para su posterior identificación mediante la secuenciación del espacio intergénico 16S-23S ARNr. Una vez amplificados, los productos de PCR fueron purificados (Puriprep-GP Kit, Inbio Highway, Tandil, Argentina), cuantificados y secuenciados (ABI 3130xl; Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.) utilizando los cebadores descriptos previamente⁷. Las secuencias fueron visualizadas utilizando el programa BioEdit⁶ y luego alineadas contra la base de datos BLAST¹. Para eliminar las regiones flanqueantes correspondientes a las secuencias parciales de los genes 16S ARNr y 23S ARNr, las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalW¹².

Solamente a las muestras de ADN correspondientes a los 17 aislamientos obtenidos de RP de toros del rodeo B se les realizó la PCR anidada previamente descrita²⁰ para la identificación de *U. diversum*.

Resultados

Veintiocho de los 35 aislamientos fueron positivos a alguna especie de *Mycoplasma* o a *U. diversum*. Mediante la utilización de las PCR específicas de especie, 10 aislamientos resultaron positivos para *M. bovirhinis*, en 6 rodeos (A, B, E, F, G y H) de las 4 provincias, por lo que resultó el *Mycoplasma* más frecuentemente encontrado. Tres aislamientos de los rodeos C y E, de Córdoba y Buenos Aires, respectivamente, resultaron positivos a *M. alkalescens*, mientras que 11 de los 17 aislamientos obtenidos de muestras de RP de toros del rodeo B (Buenos Aires) resultaron positivos a *U. diversum* (tabla 1).

Respecto de las muestras que fueron secuenciadas, la secuencia del espacio intergénico 16S-23S ARNr de la muestra de la granja D (Buenos Aires) mostró un 100% de similitud con la misma región de las siguientes cepas de *M. arginini*: HAZ145_1 (AP014657.1); ATCC 23243 (JN935883.1); EF-Hungary (HM179556.1) y *M. arginini* (AY737013.1; AF443604.1). Las secuencias del mismo segmento de las dos muestras del rodeo B mostraron 100% de similitud con la misma región de las siguientes cepas de *M. californicum*: ST6 (DQ847428.1) y ATCC 33461 (AY736031.1).

En un aislamiento de RP de toros del rodeo B se identificó *U. diversum* y *M. bovigentalum* (tabla 1).

Discusión

En el presente estudio se identificaron 4 especies de *Mycoplasma* y *U. diversum* mediante técnicas moleculares a partir del cultivo de muestras provenientes de 8 rodeos lecheros de las provincias de Córdoba, Santa Fe, San Luis y Buenos Aires, y dado que la presencia de algunas de ellas no había sido informada antes, este dato genera un precedente que debería ser considerado en el momento del diagnóstico diferencial de patologías donde puedan estar involucrados estos agentes etiológicos.

M. bovirhinis fue la especie más encontrada en el presente estudio, ya que se identificó en 6 rodeos ubicados en las 4 provincias. Los aislamientos en los que se identificó *M. bovirhinis* fueron obtenidos de terneros con problemas respiratorios y de leche de vacas con mastitis clínica, en coincidencia con lo que informan estudios realizados en otras partes del mundo¹⁴. En este sentido, sería muy oportuno realizar estudios para estimar la prevalencia de este agente, a fin de determinar el impacto de las enfermedades que produce.

M. alkalescens fue detectado a partir de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica. Cabe señalar que, según datos previos, es este un importante agente causal de mastitis⁵, pero su aislamiento también se ha asociado con casos graves de artritis² y de neumonía en terneros¹⁰.

La detección de *M. arginini* se enmarca en un escenario controvertido, ya que a pesar de estar asociado con patologías de los ruminantes¹⁴ se conoce poco de su patogenicidad y de su implicancia real en el desarrollo clínico-patológico de la enfermedad. Es preciso recalcar que se ha informado zoonosis por *M. arginini* en pacientes inmunocoprometidos^{21,22}, por lo que este microorganismo debería ser especialmente considerado en el diagnóstico.

En el presente estudio se identificó *M. bovigentalum* en una de las muestras de RP tomadas del rodeo B, de toros aparentemente sanos. El papel de esta especie en enfermedades reproductivas no es del todo claro, puesto que se la ha asociado a epididimitis, orquitis, uretritis y vesiculitis seminal en toros, y a vulvitis granulomatosa en terneras¹⁴, así como también con neumonía, artritis y mastitis. En este sentido, cabe destacar que aparentemente su distribución se limita a Europa, África del Norte y Estados Unidos de América¹⁴, por lo que este constituiría el primer informe de su presencia en Latinoamérica. Respecto de la identificación de *M. californicum* en las muestras de leche del rodeo B, este agente había sido detectado recientemente en un tambo de la misma provincia¹⁹.

En el presente trabajo se informa la presencia de *M. arginini*, *M. bovigentalum*, *M. bovirhinis*, *M. alkalescens* y *M. californicum*. Dado que *M. bovis*, *M. canadense* y *M. californicum* ya habían sido identificados antes^{4,19}, puede afirmarse ahora que en nuestro país están presentes las 7 principales especies de *Mycoplasma* causantes de mastitis en bovinos. Si bien en la práctica diaria y ante casos sospechosos de mastitis causadas por *Mycoplasmas*, no es necesario determinar la especie involucrada, puesto que con la sola identificación del género pueden tomarse las medidas pertinentes para el control de la enfermedad, la determinación de especie es importante para analizar los potenciales cuadros clínicos que diferentes especies de *Mycoplasma* pueden causar.

En los últimos años se han realizado estudios moleculares tendientes a asociar la presencia de determinadas especies o genotipos de *Mycoplasma* con la presentación de diferentes cuadros clínico-patológicos^{3,15,16,18}; no obstante, existe escasa información en lo referente a la evolución de tales cuadros clínicos. En este sentido, la determinación de la especie de *Mycoplasma* constituiría un paso necesario para profundizar en ese tipo de estudios.

Finalmente, cabe señalar que *U. diversum* fue identificado en muestras que provenían de toros sanos. En este sentido, ya se ha señalado que la infección de los toros es frecuentemente asintomática¹³. Debido a que la presencia de *U. diversum* ha sido asociada con infertilidad en vacas, placentitis, aborto y terneros nacidos débiles^{8,11}, es importante reconocer la presencia de este agente en el país, puesto que debería ser considerado en el diagnóstico diferencial de otras enfermedades venéreas, como infecciones por *Campylobacter* spp., *Trichomonas* y *Herpesvirus* bovino tipo 1. Lamentablemente, no se obtuvieron datos reproductivos del rodeo del cual provenían las muestras; sin embargo, revelar su presencia es importante. El aislamiento de *U. diversum* fue un hallazgo afortunado, ya que existen medios de cultivo específicos, adicionados con urea, que favorecen el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, el aislamiento de este agente ha sido informado también en medios no específicos, con y sin urea¹⁴.

El hecho de haber identificado distintas especies de la familia *Mycoplasmataceae*, algunas de ellas asociadas a patologías del ganado lechero, representa un importante avance en el conocimiento, de gran relevancia para investigadores y profesionales veterinarios. Este hallazgo debería llevar a incluir a estas especies en el diagnóstico diferencial de determinados cuadros clínico-patológicos. Esto, sumado al hecho de que las especies identificadas podrían afectar también a los bovinos de carne, a otras especies de animales domésticos e incluso al hombre, debería conducir a la intensificación de esfuerzos tendientes a estudiar la circulación de estos patógenos en los rodeos del país y de su eventual impacto productivo que ocasionan para así mejorar las medidas de control de las enfermedades que estos producen.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por los PPI 2016-2018 18/A349 y 18/A354 SeCyT-UNRC. C. Sosa posee una beca de Ayudantía de Investigación, SeCyT-UNRC.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403–10.
2. Bennett RH, Jasper DE. *Mycoplasma alkalescens*-induced arthritis in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172:484–8.
3. Biddle MK, Fox LK, Evans MA, Gay CC. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycoplasma* isolates from various body sites in dairy cattle with *Mycoplasma mastitis*. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:455–9.
4. Cerdá R, Xavier J, Sansalone P, de la Sota R, Rosenbush R. Isolation of *Mycoplasma bovis* during an outbreak of bovine mastitis at a dairy farm in the province of Buenos Aires. 1st report in the Republic of Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;42:7–11.
5. González RN, Wilson DJ. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19:199–221.
6. Hall T. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP [Internet]. Website last modified on June 27, 2007 [consultado 1 Dic 2015]. Disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
7. Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res Microbiol.* 1993;144:489–93.
8. Howard CJ, Gourlay RN, Brownlie J. The virulence of T-mycoplasmas, isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. *J Hyg.* 1973;71:163–70.
9. Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. *J Vet Med Sci.* 1998;60:1299–303.
10. Kokotovic B, Friis NF, Ahrens P. *Mycoplasma alkalescens* demonstrated in bronchoalveolar lavage of cattle in Denmark. *Acta Vet Scand.* 2007;49:2.
11. Kreplin CM, Ruhnke HL, Miller RB, Doig PA. The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility. *Can J Vet Res.* 1987;51:440–3.
12. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mc Gettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatic.* 2007;23:2947–8.
13. Mulira GL, Saunders JR, Barth AD. Isolation of *Ureaplasma diversum* and mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J.* 1992;33:46–9.
14. Nicholas R, Ayling R, Mc Auliffe L. Bovine respiratory disease. En: International C.A.B., editor. *Mycoplasma diseases of ruminants.* 1st ed. Oxfordshire, UK: Biddles Ltd press; 2007. p. 132–54.
15. Punyapornwithaya V, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Alldredge JR. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: A case study from Idaho, USA. *Prev Vet Med.* 2010;93:66–70.
16. Punyapornwithaya V, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Wenz JR, Alldredge JR. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. *Prev Vet Med.* 2011;98:74–8.
17. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Micoplasmas. En: Editorial Acribia, editor. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias.* 1ª ed. español Zaragoza, España: Editorial Acribia SA; 2008. p. 231–40.
18. Roy JP, Francoz D, Labrecque O. Mastitis in a 7-week old calf caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. *Vet J.* 2008;176:403–4.
19. Tamiozzo PJ, Estanguet AA, Maito J, Tirante L, Pol M, Giraud JA. Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:119–21.
20. Vasconcellos Cardoso M, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, Florio da Cunha RA. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet Microbiol.* 2000;72:241–50.
21. Watanabe M, Hitomi S, Goto M, Hasegawa Y. Bloodstream infection due to *Mycoplasma arginini* in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3133–5.
22. Yechouron A, Lefebvre J, Robson HG, Rose DL, Tully JG. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: A new human zoonosis. *Clin Infect Dis.* 1992;15:434–8.