



Revista de Investigaciones Veterinarias  
del Perú, RIVEP

ISSN: 1682-3419

rivepsm@gmail.com

Universidad Nacional Mayor de San  
Marcos  
Perú

Sierralta Chichizola, Verónica; Mayta Huatuco, Egma; Quispe, Jorge León  
Primer Registro de *Plesiomonas shigelloides* como Patógeno Oportunista de Tilapia  
*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una Piscigranja de Lima, Perú  
Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP, vol. 27, núm. 3, 2016, pp. 565-  
572

Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371847509017>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## Primer Registro de *Plesiomonas shigelloides* como Patógeno Oportunista de Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una Piscigranja de Lima, Perú

FIRST REPORT OF *Plesiomonas shigelloides* AS OPPORTUNISTIC PATHOGEN IN TILAPIA *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) IN A FISH FARM IN LIMA, PERU

Verónica Sierralta Chichizola<sup>1,3</sup>, Egma Mayta Huatuco<sup>2</sup>, Jorge León Quispe<sup>1</sup>

### RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la presencia de *Plesiomonas shigelloides* causando un cuadro patológico entérico en tilapia *Oreochromis niloticus* en una piscigranja de la región Lima, Perú. Las bacterias fueron aisladas e identificadas por técnicas bioquímicas convencionales y confirmadas por el sistema API 20NE (perfil numérico 7162744 que ratifica a *P. shigelloides* al 99.3%). Las cepas evaluadas (n=4) presentaron un metabolismo fermentativo de glucosa, positividad en las pruebas de citocromo oxidasa, indol, Voges-Proskauer y rojo de metilo. Los signos externos más frecuentes de la enfermedad fueron eritema en el vientre y las aletas pectorales, ano prominente y enrojecido con descarga sanguinolenta. Internamente se observó el intestino inflamado y la presencia de líquido ascítico en la cavidad visceral. El estudio histopatológico reveló edema de la lámina propia y necrosis epitelial del tejido gástrico e intestinal, y necrosis en el riñón anterior y gónadas.

**Palabras clave:** acuicultura, ictiopatología, tilapia, *Plesiomonas shigelloides*, Perú

### ABSTRACT

The presence of *Plesiomonas shigelloides* causing enteric disease in tilapia *Oreochromis niloticus* in a fish farm in Lima region, Peru is reported. The bacteria were isolated and identified as *Plesiomonas shigelloides* by conventional biochemical techniques and confirmed by the API 20NE system (numerical profile 7162744 that ratifies 99.3% *P. shigelloides*). Strains evaluated (n=4) had a fermentative metabolism of glucose,

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, <sup>2</sup> Laboratorio de Virología Clínica Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: vsierralta.saniaqua@gmail.com

Recibido: 8 de diciembre de 2015

Aceptado para publicación: 26 de abril de 2016

test positive to cytochrome oxidase, indole, Voges-Proskauer and methyl red. The most frequent external signs were erythema in abdomen and pectoral fins, and prominent and reddened anus with bloody discharge. Internally, ascites in visceral cavity and gut inflammation were detected. Histopathology studies revealed edema of the lamina propria and epithelial necrosis of gastric and intestinal tissue, and necrosis in anterior kidney and gonad.

**Key words:** aquaculture, fish pathology, tilapia, *Plesiomonas shigelloides*, Peru

## INTRODUCCIÓN

La tilapia *Oreochromis niloticus* es un pez teleosteo del orden Perciforme, perteneciente a la familia Cichlidae, originario de África, que habita en la mayor parte de las regiones tropicales del mundo donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento (El-Sayed, 2006).

Fue introducida al Perú en 1970 con fines de cultivo e investigación. Actualmente constituye una importante actividad dentro de la acuicultura nacional debido, entre otros, a su alta tasa de reproducción en granjas acuícolas (Baltazar, 2009). Su producción anual en 2013 fue de 2069 t, de las cuales 286 t fueron destinadas para exportación, siendo los Estados Unidos de América el principal mercado (Produce, 2015).

Las tilapias son susceptibles a infecciones de etiologías diversas, entre las que destacan especies de bacterias consideradas como patógenos facultativos u oportunistas, ya que son componentes normales de la flora de los peces y de su ambiente acuático (Moreno *et al.*, 2006).

La bacteria *Plesiomonas shigelloides* pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Jagger, 2000) y ha sido descrita como patógeno facultativo en peces, provocando enfermedades en cultivo de especies marinas y de agua dulce (Machado Cruz *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1993). *P. shigelloides* es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas

con presencia de flagelos lofotricos y peritricos que le confieren movilidad variable (Jagger, 2000; Moreno *et al.*, 2006). Esta bacteria es fermentadora de glucosa, oxidasa positiva y productora de indol. Asimismo, sus características bioquímicas son bastante homogéneas, lo cual permite diferenciarla de otras especies (González-Rey, 2003).

La enfermedad causada por *P. shigelloides* en peces de consumo aparece durante la década de los 80, provocando elevada mortandad en piscigranjas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Portugal (Machado Cruz *et al.*, 1986). Desde entonces, este patógeno ha afectado a diversas poblaciones de peces, tales como anguila (*Anguilla anguilla*), bagre africano (*Heterobranchus bidorsalis*), esturión (*Acipenser sturio*), gourami (*Osphronemus gourami*) (Klein *et al.*, 1993), tilapia (*O. niloticus*) (Faisal y Popp, 1987; Sheng y Xue, 2015) y pez lenguihueso malayo (*Scleropages formosus*) (Woo *et al.*, 2011).

Los brotes epizooticos de esta enfermedad están asociados a factores desencadenantes de estrés, como manipulación, deficientes condiciones higiénicas y presencia de gran cantidad de materia orgánica en los estanques, así como incremento de la temperatura del agua (Machado Cruz *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1993).

Por otro lado, la bacteria *P. shigelloides* ha sido aislada de heces de pacientes humanos con gastroenteritis, cuya presencia se relaciona al consumo de productos marinos

como ostras y pescado crudo o mal cocido, provocando diarreas espontáneas e infecciones extraintestinales de elevada mortalidad, tales como septicemias y meningitis del recién nacido (Mendoza y Hernández, 1999). En el Perú hay escasa información sobre esta bacteria, habiéndose reportado 10 casos de diarrea en niños provocada por *P. shigelloides* (Olsvik *et al.*, 1990). Aún no han sido totalmente esclarecidos sus mecanismos de patogenia, atribuyéndosele en parte a la invasividad, enterotoxigenicidad y asociación a plásmidos (Bravo *et al.*, 1998).

En el país, los estudios sobre patologías bacterianas en tilapias son escasos; sin embargo, durante los años 2009 y 2010 se registraron brotes producidos por *Edwardsiella tarda* en una piscigranja de la región Lima (Mateo *et al.*, 2011). En este contexto se decidió ampliar la búsqueda de otros patógenos oportunistas, habiéndose aislado como producto de investigaciones iniciales a *P. shigelloides*, conjuntamente con otros Gram negativos de los géneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Shewanella* y *Vibrio*; a los cuales se les atribuyó como los causantes de mermas en la producción de la tilapia. En el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo aislar y caracterizar el patógeno oportunista *Plesiomonas shigelloides*, así como analizar las lesiones histopatológicas causadas en tilapias con signos aparentes de enfermedad en una piscigranja de la zona norte de Lima, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Muestreo

Se trabajó en una piscigranja ubicada en la provincia de Huaura, departamento de Lima, Perú. El sistema de producción era de tipo intensivo con el uso de tecnología Biofloc (Crab *et al.*, 2009). El rendimiento promedio anual de la piscigranja era de 300 t.

Entre noviembre de 2013 y octubre de 2015 se colectaron tilapias *O. niloticus*, variedad chitralada, con signos aparentes de enfermedad, tales como exoftalmia, oscurecimiento de la piel y nado errático. Se tomaron 85 muestras aleatorias que incluyeron 18 alevines, 25 juveniles y 42 adultos. Estos peces provinieron de los estanques de cultivo y fueron recolectados durante las estaciones de verano (11), otoño (15), invierno (14) y primavera (45).

### Procesamiento de la Muestra y Aislamiento

El análisis bacteriológico inicial se llevó a cabo en el laboratorio de la piscigranja en estudio. Los peces fueron sacrificados mediante el corte de la médula espinal y la desinfección de la zona a disectar se realizó utilizando papel toalla impregnado con alcohol etílico 70°. Una vez efectuada la apertura de la cavidad visceral, se llevó a cabo la siembra a partir de un macerado de bazo y riñón anterior tomado de cada pez. Las muestras fueron sembradas por duplicado en Agar Tripticasa de Soya (TSA) e incubadas a 35 °C por 24 a 48 h.

La caracterización de colonias típicas y las pruebas preliminares de descarte (motilidad en «gota pendiente», coloración Gram y citocromo oxidasa) se realizaron a partir del medio de aislamiento original. Las colonias presuntivas fueron pasadas a ceparios (TSA semisólido con adición de 10% de glicerol) y mantenidas en estado de pureza para su análisis posterior en los laboratorios de Ecología Microbiana y Virología Clínica Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

### Identificación de *Plesiomonas shigelloides*

La identificación confirmativa de las cepas de *P. shigelloides* se realizó a partir de cultivos reactivados bajo las mismas condiciones de incubación de su aislamiento primario. Las pruebas incluyeron la caracte-

rización fenotípica y otras pruebas bioquímicas convencionales, tales como citocromo oxidasa, pruebas de óxido-fermentación de la glucosa, producción de hidrógeno sulfurado, indol, Voges-Proskauer e inositol (González-Rey, 2003).

Además, se efectuaron pruebas bioquímicas del sistema API 20 NE (Biomériux, Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante, realizando la incubación a 35 °C durante 24 a 48 h.

### Histopatología

Una vez concluida la toma de muestra para el análisis bacteriológico, se procedió a preservar los ejemplares en solución de formaldehído al 10% (v/v) y buffer fosfato (pH 7.0) para su posterior análisis histopatológico. Las muestras de tilapia que resultaron positivas para el aislamiento de *P. shigelloides* fueron consideradas para la evaluación histopatológica. Se procesaron branquias y órganos internos como corazón, hígado, bazo, riñón anterior y posterior, estómago, intestino, páncreas y gónadas, utilizando la metodología propuesta por Luna (1968). Los tejidos fueron cortados a 5 µm de espesor, teñidos con hematoxilina y eosina de Harris y observados en un microscopio compuesto (Zeiss, modelo Axio Scope A1).

## RESULTADOS

### Evaluación Microbiológica

Se logró aislar cuatro cepas bacterianas de *P. shigelloides* a partir del homogenizado de órganos internos de cuatro peces de las fases juvenil y adulta. Las colonias presentaron color blanco amarillento en el medio TSA, con bordes enteros y circulares. Microscópicamente, resultaron ser bastones largos Gram negativos y motiles. Las características bioquímicas de las cepas analizadas muestran evidente metabolismo

Cuadro 1. Características bioquímicas según pruebas convencionales de cuatro cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus*. Huaura, Lima-Perú, 2013-2015

Pruebas bioquímicas	Reacción
Citocromo oxidasa	+
Motilidad	+
O/F (glucosa) <sup>1</sup>	F
Producción de H <sub>2</sub> S	-
Indol	+
Citrato	-
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Producción de ácido:	
Glucosa	+
Inositol	+
Lactosa	-
Manitol	-
Sacarosa	-

<sup>1</sup> O: oxidativo; F: fermentativo

fermentativo de la glucosa. Además, todas las cepas fueron positivas a citocromo oxidasa, indol, Voges-Proskauer, rojo de metilo y producción de ácido a partir de inositol. Las cepas fueron ratificadas como negativas a hidrógeno sulfurado, citrato, lactosa, manitol y sacarosa (Cuadro 1).

Las características bioquímicas de las cepas evaluadas correspondieron al perfil de la bacteria *P. shigelloides*.

Mediante el sistema rápido de identificación API 20 NE se logró confirmar la identificación de *P. shigelloides*, obteniendo el perfil numérico 7162744 (Cuadro 2), que corresponde según las indicaciones del fabricante a excelente identificación (99.3%).

Cuadro 2. Características bioquímicas (API 20 NE) de cuatro cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus* de una piscigranja en Huaura, Lima. 2013 – 2015

Pruebas bioquímicas	Reacción
Oxidasa	+
O-F Glucosa	+
Motilidad	+
Reducción de nitratos	+
Producción de indol	+
L-Arginina	+
Beta galactosidasa	+
N Acetil glucosamina	+
Gluconato potásico	+
Ácido cáprico	-
Ácido adípico	-
Ácido málico	+
Ácido fenilacético	-
Citrato	-
Úrea	-
Esculina	-
Gelatina	-
Fermentación de:	
Glucosa	+
Arabinosa	-
Manosa	+
Manitol	-
Maltosa	+

### Signos Patológicos

Los cuatro ejemplares afectados presentaron los siguientes signos externos: eritema en las aletas pectorales y vientre (Figura 1A), ano prominente y enrojecido con descarga de fluido sanguinolento (Figura 1B). Entre los signos internos se encontró intestino inflamado y presencia de líquido ascítico en la cavidad visceral.

### Histopatología

Las lamelas branquiales presentaron congestión focal, ligero edema, necrosis y aneurismas. A nivel del estómago se halló edema severo en la lámina propia (Figura 2A) con reacción inflamatoria y presencia de células granulares eosinofílicas. Asimismo, se apreció necrosis epitelial de la mucosa con desprendimiento hacia el lumen.

En tejido intestinal se visualizó ligero edema en la base de la lámina propia (Figura 2B), congestión focal y necrosis apical de las vellosidades. Además, se observó la presencia de bacterias en la lámina propia y tejido epitelial. A nivel de riñón anterior se observó necrosis del tejido hematopoyético (Figura 2C) y en tejido gonadal se apreció necrosis focal de espermatoцитos.

El corazón, hígado, páncreas, bazo y riñón posterior no presentaron daños tisulares.

### DISCUSIÓN

Se logró obtener 4 cepas bacterianas a partir de órganos internos que, según los resultados presuntivos y luego confirmativos, fueron asignados a la especie *Plesiomonas shigelloides*. Las características culturales de esta bacteria guardan semejanza con lo reportado por Machado Cruz *et al.* (1986) y Gonzáles-Rey (2003), quienes describieron colonias bacterianas de color blanco amarillento, circulares y de bordes enteros.

Las características bioquímicas de las cepas analizadas mediante técnicas convencionales guardan similitud con lo descrito por diversos autores (Machado Cruz *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 2001; Levin, 2008; Jorgensen *et al.*, 2015). Asimismo, los resultados del sistema miniaturizado API 20 NE para la caracterización bioquímica bacteriana muestran una excelente identificación, y en coincidencia con lo reportado por Klein *et al.* (1993).



Figura 1. Signos patológicos externos producidos por *Plesiomonas shigelloides* en tilapia (*Oreochromis niloticus*): eritema en aletas pectorales y vientre (A), ano prominente y enrojecido (B)

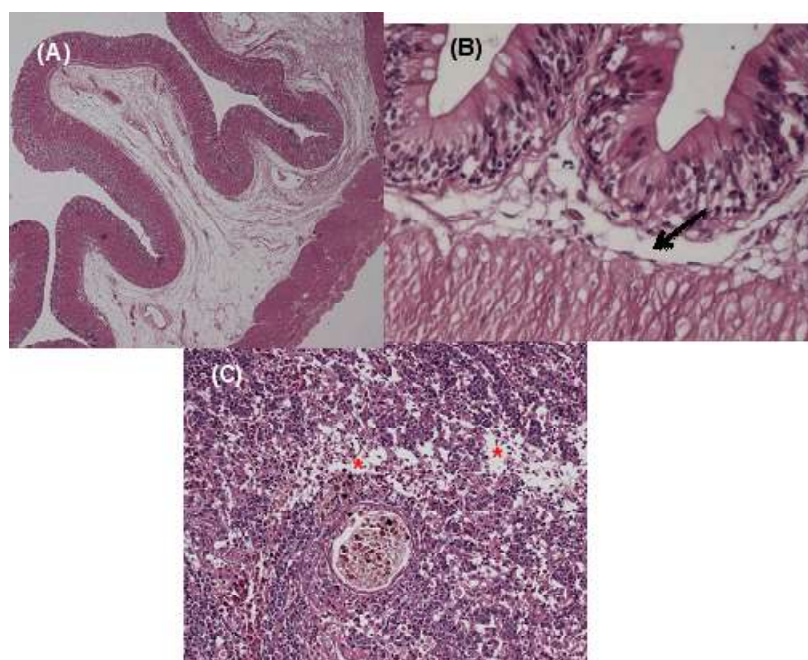


Figura 2. Lesiones histopatológicas producidas por *Plesiomonas shigelloides* en tilapia (*Oreochromis niloticus*): A. Severo edema de la lámina propia del estómago (10X, HE); B. Intestino con edema en la lámina propia (flecha) (60X, HE); C. Necrosis de tejido hematopoyético en riñón anterior (asteriscos) (20X, HE)



La mayoría de los peces en los que se aisló *P. shigelloides* presentaron signos patológicos externos como eritema en las aletas pectorales y ano prominente y enrojecido, los cuales han sido también documentados por Machado Cruz *et al.* (1986) y Jagger (2000). Por otro lado, se apreció descarga sanguinolenta a través del ano, lo cual difiere con el estudio de Machado Cruz *et al.* (1986), quienes describen la presencia de exudado de color amarillento.

Internamente los signos más evidentes fueron intestino inflamado y presencia de líquido ascítico, hallazgos similares a los reportados por Machado Cruz *et al.* (1986) y Jagger (2000).

En cuanto a los hallazgos histopatológicos encontrados en las tilapias analizadas se apreciaron aneurismas, necrosis de tipo focal y edema en las lamelas branquiales, constituyendo alteraciones asociadas a la presencia de contaminantes químicos en el agua de cultivo (Saenphet *et al.*, 2009).

Trabajos en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Machado Cruz *et al.*, 1986; Jagger, 2000) reportan la presencia de necrosis focal de hepatocitos, degeneración hepatopancreática, hemorragia ventricular, vacuolización y picnosis de células epiteliales en túbulos renales. Sin embargo, en el presente estudio, solo se apreció edema en la lámina propia y necrosis del epitelio de la mucosa gástrica e intestinal, así como necrosis del tejido hematopoyético del riñón anterior, siendo el primer reporte de lesiones provocadas por *P. shigelloides* en tilapia en el país.

Cabe destacar que el brote de enfermedad producido por el mencionado patógeno podría estar asociado al estrés (Machado Cruz *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1993), ya que la intensificación del sistema productivo en la piscigranja podría afectar la respuesta del sistema inmune.

## CONCLUSIONES

- La bacteria *Plesiomonas shigelloides* es un patógeno facultativo que provoca una enfermedad sistémica en tilapia, afectando principalmente el tracto gastrointestinal.
- Los hallazgos del presente estudio constituyen el primer reporte de esta enfermedad en tilapia *Oreochromis niloticus* en el Perú.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Blgos. Ronald Tarazona y Adrián Quintana por su apoyo técnico-logístico durante el desarrollo del estudio. Un especial agradecimiento a la Blga. Violeta Flores por su colaboración en la traducción al inglés del presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

1. **Baltazar PM. 2009.** Situación actual de la tilapia en el Perú. En: II Jornada de Actualización en Tilapia. Puerto Vallarta, México.
2. **Bravo L, De Paula O, Maestre J, Ramírez M, García B. 1998.** Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en *Plesiomonas shigelloides*. Rev Cubana Med Trop 50: 203-206.
3. **Chen X, Chen Y, Yang Q, Kong H, Yu F, Han D, Zheng Z, Cui D, Li L. 2013.** *Plesiomonas shigelloides* infection in southeast China. PLoS ONE 8(11): e77877. doi: 10.1371/journal.pone.0077877
4. **Crab R, Kochva M, Verstraete W, Avnimelech Y. 2009.** Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquac Eng 40: 105-112. doi: 10.1016/j.aquaeng.2008.12.004
5. **El-Sayed A-F M. 2006.** Tilapia culture. UK: CABI Publishing. 277 p.



6. **Faisal M, Popp W. 1987.** *Plesiomonas shigelloides* a pathogen for the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. J Egypt Vet Med Ass 47: 63-70.
7. **Gonzales Rey C. 2003.** Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. PhD Thesis. Uppsala, Sweden: Swedish Univ of Agricultural Sciences. 45 p.
8. **Inglis V, Roberts JR, Bromage RN. 2001.** Bacterial diseases of fish. Oxford, UK: Blackwell Science. 312 p.
9. **Jagger DT. 2000.** *Plesiomonas shigelloides* – a veterinary perspective. Infect Dis Rev 2: 199-210.
10. **Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Landry M, Funke G, Ritcher S, Warnock D. 2015.** Manual of clinical microbiology. 11<sup>th</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology. 2730 p.
11. **Klein BU, Kleingeld DW, Bohm KH. 1993.** First isolation of *Plesiomonas shigelloides* from sample of cultured fish in Germany. Bull Eur Assoc Fish Pathol 13: 70-72.
12. **Levin RE. 2008.** *Plesiomonas shigelloides* - An aquatic food borne pathogen: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, and molecular detection. Food Biotechnol 22: 189-202. doi: 10.1080/08905430802043339
13. **Luna LG. 1968.** Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw-Hill. 258 p.
14. **Mateo E, Castro T, Sierralta V. 2011.** Enfermedad bacteriana de tipo granulomatosa en tilapia cultivada en jaulas flotantes. En: III Congreso Nacional de Acuicultura. Lima: Univ Nacional Agraria La Molina.
15. **Machado Cruz J, Saraiva A, Eiras JC, Branco R, Souza JC. 1986.** An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. Bull Eur Ass Fish Pathol 6: 20-22.
16. **Mendoza C, Hernández P. 1999.** Incidencia de *Plesiomonas shigelloides* en tetrahíbridos de tilapias (*Oreochromis* sp). Archiv Latin Nutr 49: 67-71.
17. **Olsvik O, Wachsmuth K, Kay B, Birkness KA, Yi A, Sack B. 1990.** Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains isolated from children with diarrhea in Peru. J Clin Microbiol 28: 886-889.
18. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2013.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2013. Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según ámbito y especie, 2013 (TM). p 78. [Internet]. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/images/stories/Repositorio/estadistica/anuario/anuario-estadistico-pesca-2013.pdf>
19. **Moreno M, Medina LY, Álvarez J, Obregón J, Medina G. 2006.** Detección de *Plesiomonas shigelloides* mediante la PCR en tilapias silvestres (*Oreochromis mossambicus*) y cultivadas (tetrahíbrido *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) en Venezuela. Rev Cient (Maracaibo) 16: 459-465.
20. **Saenphet S, Thaworn W, Saenphet K. 2009.** Histopathological alterations of the gills, liver and kidneys in *Anabas testudineus* (Bloch) fish living in an unused lignite mine, Li district, Lamphun province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 40: 1121-1126.
21. **Zhigang Liu, Xiaoli Ke, Maixin Lu, Fengying Gao, Jianmeng Cao, Huaping Zhu, Miao Wang. 2015.** Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). Acta Microbil Sinica 55(1): 96-106.
22. **Woo J, Hyung J, Choresca C, Phil S, Eun J, Sang D, Chang S. 2011.** Isolation and molecular detection of *Plesiomonas shigelloides* containing *tetA* gene from Asian arowana (*Scleropages formosus*) in a Korean aquarium. Afr J Microbiol Res 5: 5019-5021.