

Tripanosomiasis bovina en hembra de raza especializada en producción de leche de zona alto andina, Antioquia: presentación de un caso

Bovine trypanosomiasis in female breed dairy cattle of region high Andean, Antioquia: a case report

Richard Zapata S.*, Julián Reyes V.†

RESUMEN

La tripanosomiasis es una enfermedad que históricamente se ha circunscrito como una enfermedad tropical endémica, cuya transmisión se da con mayor frecuencia en ecosistemas cálidos y templados por debajo de los 1.000 msnm. Según Morse, en los últimos años se ha dado un cambio tanto en la adaptación del microorganismo, como de la ampliación de las zonas de riesgo para las enfermedades vectoriales, desencadenada por el cambio ecológico de los nuevos sistemas agrícolas y de la transición climática actual, para el caso de la Tripanosomiasis se ha ampliado su ecología, mediada por estos cambios bioclimáticos y por la movilidad de semovientes entre las diferentes zonas agroclimáticas del país. En el presente trabajo se presenta el caso de un bovino de raza lechera en una zona alto andina en el departamento de Antioquia, Colombia.

PALABRAS CLAVES

Trypanosoma sp. Entrerriós. Ganadería especializada en producción de leche. Tratamiento.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Trypanosomiasis is a tropical endemic disease usually reported in humid-temperate zones up to 1,000 masl. Recently, it has showed changes related to microorganism adaptation and expansion of risk zones triggered by ecological shifts of new

agriculture systems, the current climate change, and animals' mobility among different geographical areas. This paper aims to discuss a case report of Bovine Trypanosomiasis in a dairy producer region in the Andean high of Antioquia, Colombia.

KEY WORDS

Trypanosoma sp. Entrerriós. Dairy cattle. Treatment.

*Microbiólogo y Bioanalista. Magister en Microbiología y bioanálisis, Línea: Microbiología Veterinaria. Profesor Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia. †Médico veterinario. Magister en Epidemiología. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia. *Contacto: microbiolorich@gmail.com Recepción: 04-11-2012. Aceptación: 04-15-2012.

INTRODUCCIÓN

En América latina, se han reconocido dos de las cuatro especies de *Trypanosoma* presentes en el continente (*Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*), como hemoparásitos con importancia económica y médica en producción animal.¹

La tripanosomiasis bovina en América del sur, es una enfermedad hemoparasitaria producida por los protozoos flagelados *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, que afecta la producción bovina y bufalera.² Para el caso suramericano, la transmisión se da de forma mecánica por moscas hematófagas de la familia Tabanidae (*Tabanus*, *Chrysops* y *Cryptotylus*), *Stomoxys calcitrans* (mosca del establo) y con menor frecuencia por la mosca *Haematobia irritans* (mosca de los cuernos), y por el murciélago vampiro *Desmodus rotundus*,^{2,3,4} así también la transmisión iatrogénica por prácticas veterinarias y de manejo animal inadecuado están involucrados en la transmisión.⁵

El cuadro clínico característico generado por *Trypanosoma* sp. en ganado bovino evidencia fiebre y anemia severa con ictericia. Sin embargo, se ha encontrado a *T. vivax* como la especie más patógena en este hospedero, siendo las complicaciones que llevan a la muerte de bovinos infectados con *T. vivax* las combinaciones de alteraciones microcirculatorias, daños cardíacos y anemia⁶ y desde hace unos años se ha descrito en forma detallada como el cuadro nervioso, caracterizado por cojera, temores, parestesias y convulsiones en los casos más severos, y generalmente asociado con la infección por *T. evansi*, se presenta de forma similar en bovinos infectados por *T. vivax*.⁷ Estas condiciones de salud establecen un problema económico en el sistema productivo, como resultado principalmente de abortos, disminución en la producción de leche, pérdida de peso y mala calidad del semen.⁸

La infección experimental por *Trypanosoma* en ganado bovino causa fiebre alta alrededor de los 40.5°C, acompañada de anemia, petequias en las mucosas, sangre oculta en heces, melena y epistaxis. La pérdida crónica de peso sin otros síntomas evidentes, se puede observar. Las anomalías hematológicas y bioquímicas incluyen anemia, hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia e incremento de las proteínas plasmáticas además del aumento de las concentraciones plasmáticas de la aspartato amino transferasa y el nitrógeno ureico.⁹

Los animales infectados en períodos epizoóticos pueden desarrollar trombocitopenia con evidente prolongación del tiempo de protrombina y trombo-plastina, indicando que la coagulación intravascular diseminada es la responsable de los cambios vasculares antes de la muerte. Este cuadro que acompaña la anemia, caracterizada por la disminución en los valores de hemoglobina, se presenta como efecto de la formación de complejos inmunes.⁹

La enfermedad ha sido reportada en diferentes zonas del territorio colombiano, donde regiones del trópico y subtropical representan los ecosistemas con las características óptimas para que reservorios, el *Trypanosoma* sp. y los vectores cohabiten.^{2,10,11}

En Colombia no hay reportes científicos sobre la infección de bovinos de razas especializadas en producción de leche ubicadas en zonas por encima de los 1.000 msnm; zonas ubicadas sobre los 1.000 msnm en Colombia, no son consideradas zonas enzoóticas para la tripanosomiasis bovina, ya que la presencia del parásito está estrechamente relacionada con temporadas con altas infestaciones por moscas de la familia Tabanidae, las cuales no completan su ciclo de vida bajo las condiciones climáticas de estas zonas.^{1,12} El caso que se presenta proviene de una hacienda especializada en producción de leche del municipio de Entrerriós, donde todos los animales corresponden a la especie *Bos taurus* raza Holstein. Este municipio está ubicado en la subregión norte del departamento de Antioquia, principal zona productora de leche del departamento. La hacienda se encuentra en las coordenadas geográficas: 6°37'03.67" N 75°30'58.12" O a 2.486 msnm, territorio según Holdridge clasificado como zona de vida bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), caracterizado por su clima frío con una temperatura promedio de 16°C (mínima 9°C – máxima 24°C), condiciones no habituales para la presentación de esta entidad parasitaria.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN

El caso descrito se presentó en una hacienda dedicada a la producción de leche constituida como un hato cerrado basado en ganadería bovina de raza Holstein, con 1.296 bovinos al momento del evento epizoótico y un promedio de producción de 16.000

litros de leche/día generado por 644 hembras en producción. El sistema de producción se divide en 7 salas de ordeño y 420 potreros distribuidos en un área de 768 hectáreas.

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE ANIMAL

Bovino raza Holstein (*Bos taurus*) nacido en una hacienda del Municipio de Entreríos, con siete años de edad y 550 kg de peso. El paciente animal corresponde a una hembra en producción de leche, con un promedio de 9 litros/día, 261 días en leche y un intervalo entre partos de 353 días. La fecha de su último parto (cuarto parto) fue enero 9 de 2010 y la fecha del último servicio hecho por inseminación artificial fue el 30 de mayo de 2010. Al momento de la evaluación se encuentra vacía.

ANAMNESIS

El paciente animal fue evaluado por el médico veterinario de la hacienda, a raíz de un cuadro clínico caracterizado por inapetencia con pérdida progresiva de peso que llevó a una pérdida de la condición corporal, fiebre y disminución en la producción. No se realizaron tratamientos previos al momento de la consulta.

HALLAZGOS AL EXAMEN FÍSICO

A la evaluación clínica se observaron las mucosas vulvar, esclerótica y bucal ictéricas, temperatura de 40.8°C, 112 latidos por minuto, frecuencia respiratoria de 30 por minuto, disminución de los movimientos ruminales, condición corporal de 2.75 (escala de 1 a 5), pliegue cutáneo de 3". El pulso de la vaca presentó una frecuencia de 120 pulsaciones por minuto, con ritmo sincrónico, intensidad y tono fuerte y amplitud corta.

En la evaluación de cada sistema se encontró sistema nervioso, músculo esquelético, genital, urinario, respiratorio, piel y anexos, linfático y órganos de los sentidos aparentemente normales. Alteración en el sistema cardiovascular y el sistema digestivo con signos de taquicardia, deshidratación y hemodilución respectivamente.

Se propuso como diagnóstico presuntivo una infección por hemoparásitos.

ESTUDIOS PARACLÍNICOS

El médico veterinario solicita evaluación por el laboratorio clínico veterinario, y remite una muestra

de sangre tomada de vena coccígea en tubo estéril vacutainer al vacío con anticoagulante EDTA y una muestra en tubo capilar. Se realizaron la técnica de microhematocrito (método Buffy coat) y extendidos de sangre periférica (ESP) coloreados con hemacolor para identificación de hemoparásitos y cálculo del porcentaje de parasitemia para parásitos intracelulares y cálculo de parasitemia para parásitos extracelulares y se obtuvieron a su vez niveles de hematocrito y hemoglobina, con valores por debajo de los valores de referencia en la primer evaluación (Tabla 1).

En el extendido de sangre periférica realizado por duplicado se identificó *Trypanosoma* sp., (Figura 1) con una parasitemia de 1.575 parásitos/μl. El método Buffy coat evidenció resultados concordantes a los

Tabla 1. Resultados de hemoglobina y hematocrito.

Evaluación	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)
1	22	7
2	18	6
3	46	15
Valores de referencia	24 - 46	8 - 15

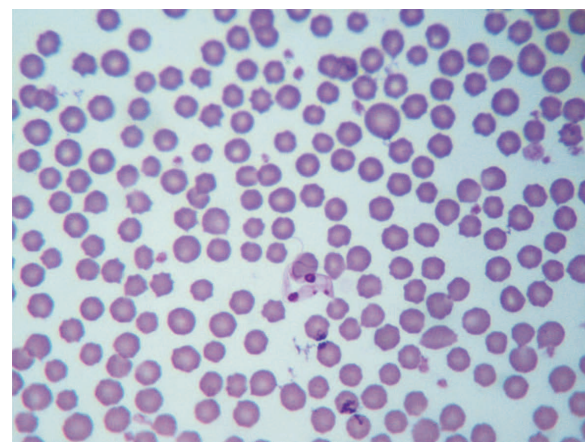


Figura 1. *Trypanosoma* sp., en extendido de sangre periférica. Coloración Hemacolor. Evaluación en Microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400X.

obtenidos por ESP (Figura 2). Además se identificó *Anaplasma marginale* con un porcentaje de parasitemia de 0,014% de glóbulos rojos parasitados.

ENFOQUE DE TRATAMIENTO

Para inhibir el proceso inflamatorio y la fiebre se suministró al bovino un antiinflamatorio no esteroideo, analgésico, antipirético inyectable (Flunixin de meglumine) a una dosis de 1 mg/kg PV. El esquema terapéutico para el tratamiento de hemoparásitos se efectuó con dos medicamentos, el control de *Anaplasma marginale* se realizó con el antibiótico del grupo de las tetraciclinas oxitetraciclina, a una dosis de 20 mg/kg PV y para *Trypanosoma* sp., se utilizó Diaceturato de Diminazene, a una dosis de 3,1 mg/kg PV.

Treinta días después, se realizó una segunda evaluación de laboratorio por las mismas técnicas, encontrando que el bovino persistía positivo para *Anaplasma marginale* con un porcentaje de parasitemia de 0,0069%, y se encontró negativo para *Trypanosoma* sp., sin embargo, los valores de hematocrito y hemoglobina evidenciaban un cuadro anémico mayor que el obtenido en la primer evaluación (Tabla 1).

Una tercera evaluación se realizó 47 días después de la segunda. El bovino se diagnóstica como negativo para hemoparásitos por el método Buffy coat y extendido de sangre periférica, y los parámetros hematológicos evaluados se encuentran dentro de los valores normales (Tabla 1).

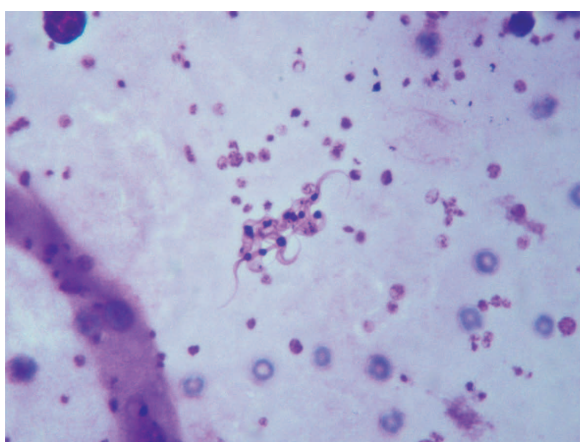


Figura 2. *Trypanosoma* sp. Método Buffy coat. Coloración Hemacolor. Evaluación en Microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400X.

DISCUSIÓN

Este se presenta como el primer reporte científico en Colombia de tripanosomiasis bovina en ganadería especializada en producción de leche de una zona ubicada a 2.486 msnm. Este caso, confirmado en Entreríos, zona norte del departamento de Antioquia, contrasta con la típica epizootiología de la tripanosomiasis bovina en Suramérica. En el caso Colombiano se ha reportado la presencia del parásito en ganadería bovina en otras regiones del país que por sus características ecológicas favorecen la coexistencia del vector, el parásito y el hospedero. Los primeros reportes de tripanosomiasis en Colombia se hicieron en 1931 cuando se generó una epizootia con alta mortalidad en la Costa Atlántica, al parecer después de la importación de ganado infectado proveniente de Apure, Venezuela.^{13,14,15} Se encontró en el mismo año que la enfermedad era más común en la época lluviosa del año y en las zonas con poca altura sobre el nivel del mar.¹⁵ Para el año 1974 utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. vivax*, encuentran bovinos serorreactivos en los departamentos de Córdoba, Sucre, Valle, Boyacá y Meta;¹⁰ resultados que se incrementan para el año 1978, con bovinos serorreactivos en los departamentos de Atlántico, Antioquia, Bolívar, Córdoba, Magdalena, Cauca, Valle, Caldas, Cundinamarca, Caquetá, Meta y Vichada; evidenciando la distribución a través del territorio nacional, concluyendo que todos los casos estaban relacionados con el transporte de animales infectados desde zonas enzoóticas.¹⁰ En 1994, se encontró en la Costa norte de Colombia *Trypanosomas* identificados por morfología en las técnicas extendido de sangre periférica y microcentrifugación en capilar, como *Trypanosoma vivax* con un 2.75% de positividad en una población de 2909 bovinos, encontrando que la infección era de 3 a 4 veces más alta en rebaños alejados a lagunas, 2 veces más alta en rebaños cercanos a ríos y una vez más alta en rebaños con problemas por moscas.¹¹ En Barrancabermeja se encontró para el año 2006, una frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp., del 13,4% en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) utilizando las técnicas de extendido de sangre periférica y gota gruesa.²

Todas las zonas descritas como enzoóticas coinciden en estar ubicadas a alturas inferiores a los

1.000 msnm, en zonas del país dedicadas a la ganadería bovina con ubicaciones sobre los 1.000 msnm el parásito se ha reportado de forma ocasional, como brotes relacionados con movimientos de ganadería desde zonas enzoóticas que transportan tabánidos que sobreviven un corto tiempo bajo las condiciones de estas regiones¹² a causa de las bajas temperaturas; las cuales inhiben el desarrollo de las larvas de tabánidos,¹⁶ con un desenlace en la interrupción del ciclo de vida de la mosca. Zapata y col, 2011 (próximo a publicarse) encontraron en la misma hacienda que se presentó el caso expuesto, entre noviembre de 2010 y febrero de 2011 la ausencia de tabánidos, siendo la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* la especie predominante con un 97,1% de las moscas capturadas, elementos que permitieron postular al díptero como el posible vector de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, dado el hallazgo de los parásitos en probóscide y abdomen.¹⁷

La descripción del caso presentado, adquiere importancia epizootica, debido a que el bovino afectado es nacido en la hacienda; y el ingreso de bovinos a la hacienda no se hace desde hace tres años aproximadamente. Estas consideraciones evidencian la ocurrencia de la transmisión de los hemoparásitos en esta localidad. Adicionalmente, luego de un mes del diagnóstico inicial, en la misma sala de ordeño se encontró otra hembra raza Holstein con signos clínicos característicos de una hemoparasitosis, la cual fue confirmada por las pruebas de laboratorio (método Buffy coat y extendido de sangre periférica) donde se encontró *Trypanosoma* sp., con una parasitemia de 525 tripanosomas/ μ l y *Anaplasma marginale* con un porcentaje de parasitemia de 0,0028% de eritrocitos parasitados. En el mes de diciembre se hallaron mediante las mismas pruebas diagnósticas otros dos bovinos positivos para *Trypanosoma* sp., todos ellos nacidos en la hacienda, hecho que apoya la hipótesis de la transmisión permanente del parásito. Dentro de los potenciales hospederos que pueden estar involucrados en la diseminación del parásito en la hacienda se deben estudiar los 17 equinos de la hacienda, los 110 bovinos de la ganadería de razas de producción de carne de una hacienda alemana, los cuales proceden de diferentes regiones del país y los sistemas de producción porcina ubicados dentro de los terrenos de la hacienda; todos estos descritos según la literatura como hospederos de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi* y caracterizados

en este caso por la ausencia de vigilancia epizootica al momento del ingreso a la zona.

La coinfección con *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en bovinos encontrada, hace complejo el cuadro clínico caracterizado por anemia y limita la producción, porque, a pesar de que en zonas enzoóticas la parasitemia de *Anaplasma marginale* puede ser baja, la inmunosupresión originada por *T. vivax* propicia la proliferación de *Anaplasma marginale* y así el desarrollo de anaplasmosis, condición que a su vez agrava los síntomas generados por la tripanosomiasis.¹ La inmunosupresión típica de la tripanosomiasis se atribuye a un mecanismo de leucofagocitosis regulado por la liberación de neuraminidasas por tripanosomas en la fase aguda o períodos epizooticos de la infección.¹⁸

En el marco mundial de la inocuidad de los alimentos y del valor intrínseco de los mismos como una de las exigencias cada vez más creciente por parte de los consumidores, los residuos de medicamentos son un riesgo que se verifica con mayor frecuencia en el mercado de productos y subproductos de origen animal.¹⁹

A diferencia de la producción de ganadería bovina dedicada a la producción de carne donde el período de tiempo necesario para evitar los residuos de medicamentos en carne se pueden programar antes de la comercialización, sin generar un gran impacto sobre la economía del sistema productivo; la ganadería de razas especializadas en producción de leche se ve aún más afectada dado que el producto lácteo tiene un comportamiento comercial diario, y los tiempos de retiro de medicamentos en leche utilizados para el control de la tripanosomiasis y otras hemoparasitosis están entre los 3 y 8 días. En el caso de ganaderías dedicadas a la lechería, todo programa de tratamiento debe estar acompañado de la verificación *a priori* de la ausencia de residuos de medicamentos antes de su comercialización. Para el caso del diaceturato de diminazene, las concentraciones en la leche entre las 6 y 24 horas de aplicación están entre 0,2 y 0,5 μ g/ml, luego la concentración baja a 0,1 - 0,2 μ g/ml a las 30 horas y se hace indetectable a las 48 horas después de la dosis con un límite de detección de 0,07 μ g/ml. Según el CODEX no se ha estimado aún el límite máximo de residuos (LMR) en leche.¹⁹

De otro lado para el *Flunixin meglumine* se ha descrito la tolerancia de residuos en 25 ppb en hígado, 25 ppb en músculo y 2 ppb en leche, bajo la regula-

ción CFR 556.286. de la *Food and drug administration*. El tiempo de retiro recomendado fue de 36 horas para la leche.²⁰

La oxitetraciclina, medicamento de elección en el tratamiento de la anaplasmosis bovina genera períodos de tiempo de retiro de la leche más prolongados. El FARAD (*Food Animal Residue Avoidance & Depletion Program*), proyecto cooperativo apoyado por USDA, recomienda un tiempo de retiro de 196 horas en ganadería de leche que recibe oxitetraciclina en una dosis de 20 mg/kg.²¹

CONCLUSIONES

El ciclo de transmisión de la tripanosomiasis se está presentando en una hacienda de Entrerriós, evento epizootico que es preocupante para los productores por sus efectos sobre bovinos de raza Holstein, especializados en producción de leche. La presentación de tripanosomiasis en una zona enzoótica para la anaplasmosis bovina complica el cuadro clínico generado por la tripanosomiasis y obliga a la implementación de tratamientos que recuperan la salud del animal y a su vez generan un impacto sobre la economía de los productores, a razón de la leche que no se comercializa durante el tiempo de retiro necesario para la eliminación de los residuos de medicamentos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses ni responsabilidades compartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Desquesnes M.** Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. France (Paris): OIE (World organization for animal health); 2004.
2. **Zapata R, Mesa J, Mejía J, Reyes J, Ríos LA.** Frecuencia de infección por *Trypanosoma sp.* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro hatos bufaleros de Barrancabermeja, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2009; 22:25-32.
3. **Herrera HM, Dávila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, Jansen AM.** Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004; 125: 263-275.
4. **Parra-Henao G, Alarcon-Pineda EP, Lopez-Valencia G.** Ecología y análisis parasitológico de tábanos (Diptera: Tabanidae) en Antioquia, Colombia. *Caldasia.* 2008; 30 (1): 179-188.
5. **Dávila AM, Silva RA.** Animal trypanosomiasis in South America current status, partnership, and information technology. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 916: 199-212.
6. **Vargas Terán M, Arellano Sota C.** La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. *Revista Veterinaria.* 1997; 33: 17-21.
7. **Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MG, Madruga CR, Simoes SDV, Maia TF.** Tripanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 174-181.
8. **Oliveira JB, Hernández-Gamboia J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón R, Blandón M, Urbina A.** First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Vet Parasitol.* 2009; 163: 136-139.
9. **Smith, B.** Large animal internal medicine: 4th edition. St Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2009.
10. **Wells EA, Betancourt A, Ramírez IE.** *Trypanosoma vivax* in Colombia: interpretation of field results. *Trop Anim Health Prod.* 1982; 14: 141-150.
11. **Otte MJ, Abuabara JY, Wells EA.** *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 1994; 26: 146-156.
12. **Mateus G, and González M.** Características de un brote de *Trypanosoma vivax* en Colombia. *Rev. Club Cienc. Vet.* 1991; 22: 167-172.
13. **Plata R.** Nota preliminar sobre una tripanosomiasis del ganado vacuno en Bolívar. *Revista Medicina Veterinaria.* Bogotá. 1931; 3: 77-79.
14. **Uribe C.** Notas sobre un tripanosoma de los bovinos de Colombia. *Revista Médica de Colombia.* 1931; 1: 701-705.
15. **Zapata A.** La afección de los ganados llamada vulgarmente "huequera", "secadera", "cachohueco". *Revista Medicina Veterinaria.* Bogotá. 1931; 3: 165-180.
16. **Foil LD, Hogsette JA.** Biology and control of tabanids stable flies and horn flies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1994; 13: 1125-1158.
17. **Zapata R, Reyes J, Cardona E, Triana O, Peña V, Barahona R, Ríos L, Polanco D.** Parasitological and entomological study of trypanosomiasis in (*Bos taurus*) Holstein dairy cattle in a farm under cold weather conditions in Antioquia, Colombia. (Próximo a publicarse).
18. **Esievo KAN, Saror DI.** Leukocyte response in experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *J Comp Path.* 1983; 93: 165-169.

19. **IPCS, INCHEM.** Who food additives series 45. Miller Center for Veterinary Medicine Food and Drug Administration. Rockville, Maryland, USA: FAO/WHO, JECFA; [cited 2011 April 26]. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v45je07.htm>
20. **Code of Federal Regulations - Title 21:** Food and Drugs. Chapter I: Food and drug administration, Department of health and human services. Subchapter E: animal drugs, feeds, and related products part 556: tolerances for residues of new animal drugs in food subpart B: specific tolerances for residues of new animal drugs 556.286 – Flunixin. [Updated to: 2011 April 01; cited 2011 April 25]. Disponible en: <http://cfr.vlex.com/vid/556-286-flunixin-19714326>.
21. **Haskell S, Gehring R, Payne M, Craigmill A, Webb A, Baynes R, Riviere J.** Update on FARAD food animal drug withholding recommendations. JAVMA. 2003; 223 (9): 1277-1278.