



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q)

María Teresa Fraile Fariñas^{a,*} y Carlos Muñoz Collado^b

^aServicio de Microbiología, Hospital General de Valencia, Valencia, España

^bDepartamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

RESUMEN

Palabras clave:

Coxiella burnetii

Diagnóstico serológico

Fiebre Q

La fiebre Q todavía es una enfermedad poco conocida, a pesar de que se describió hace más de 60 años. Aunque tampoco se conoce la prevalencia exacta, probablemente el número de casos de fiebre Q está subestimado. La presentación clínica es muy variada e incluye formas graves con un mal pronóstico. Frecuentemente, los casos agudos se presentan como una infección asintomática, un síndrome gripal, una neumonía o una hepatitis. Probablemente, los factores del huésped juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad crónica, que se puede presentar como una endocarditis con hemocultivo negativo. El diagnóstico de fiebre Q debe considerarse en los casos de fiebre de origen desconocido, especialmente si el sujeto ha estado en contacto con mamíferos probablemente contaminados. Los mejores métodos de diagnóstico microbiológico son los que permiten la detección directa de la bacteria (cultivo celular y reacción en cadena de la polimerasa, PCR), si bien estos procedimientos deben realizarse en laboratorios con un nivel de bioseguridad adecuado y con personal especializado. Para el diagnóstico indirecto el método de referencia es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que es muy sensible y específica. En los casos de fiebre Q aguda el diagnóstico deberían confirmarlo unos títulos de anticuerpos (IgG y/o IgM), obtenidos por inmunofluorescencia, superiores al punto de corte calculado para cada área geográfica, o bien por seroconversión.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Infection by *Coxiella burnetii* (fever Q)

ABSTRACT

Keywords:

Coxiella burnetii

Serodiagnosis

Q fever

In spite of being described over 60 years, Q fever is still a little known disease. The exact prevalence is also unknown, but probably the number of cases of Q fever is underestimated. There is much variation in the clinical presentation, including severe forms with a poor prognosis. Acute cases often present as an asymptomatic infection, flu-like syndrome, pneumonia or hepatitis. Presumably, host factors play an important role in the development of chronic disease, which may present as endocarditis with negative blood culture. The diagnosis of Q fever should be considered in cases of fever of unknown origin, especially if the subject has been in contact with mammals suspicious to be infected. The best methods of microbiological diagnosis are those that allow direct detection of bacteria (cell culture and PCR), although these procedures should be performed in laboratories with adequate biosafety measures, and with specialized personnel. For serological diagnosis, the reference method is indirect immunofluorescence (IIF), which is very sensitive and specific. In suspected cases of acute Q fever, diagnosis should be confirmed by serum titers (IgG and/or IgM), obtained by immunofluorescence above the cutoff calculated for each geographic area, or by seroconversion.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fraile_mar@gva.es (M.T. Fraile Fariñas).

Introducción

La fiebre Q es una zoonosis de distribución universal que afecta a diversas especies animales, especialmente rumiantes, y de modo accidental al hombre. Fue descrita por Derrick en 1937 y, ese mismo año, Burnet, Davis y Cox identificaron el microorganismo como una rickettsia a partir de tejidos de cobayas inoculados experimentalmente y la denominaron *Coxiella burnetii*¹. La infección suele ser asintomática, pero se describen formas sintomáticas muy polimórficas e inespecíficas, de carácter agudo, que progresan favorablemente, junto con un número de casos que derivan en formas crónicas con afectación cardíaca, complicaciones y evolución fatal en ausencia de tratamiento. La sospecha y orientación clínica correctas, la necesidad de estudios complementarios de las funciones cardíaca y hepática, así como el correcto diagnóstico microbiológico constituyen un reto para el manejo adecuado de estos pacientes.

Bacteriología y patogenia

C. burnetii es un bacilo gramnegativo de pequeño tamaño (0,3-1,0 µm) que crece exclusivamente en las células eucariotas. Se le clasificó como miembro de la familia *Rickettsiaceae*, pero estudios recientes han demostrado que pertenece al grupo gamma de proteobacterias. Existe una pequeña heterogeneidad genética en las cepas de *C. burnetii*, que constituye una sola especie; sin embargo, se ha encontrado una variación en la composición de azúcares de sus lipopolisacáridos^{2,3}.

Vive en las vacuolas ácidas (pH 4,8) de macrófagos y monocitos, inhibiendo la actividad fagolisosómica y los mecanismos de apoptosis celular, y es capaz de formar fuera de la célula unas pseudoesporas metabólicamente inactivas, lo que explica su extrema resistencia a variaciones ambientales y condiciones físico-químicas.

C. burnetii puede crecer sólo en células vivas, incluyendo cultivos celulares (sobre todo fibroblastos humanos), huevos embrionados y animales susceptibles, como el cobaya. En estos cultivos, su lipopolisacárido experimenta cambios que dan lugar a variaciones de fase en el antígeno. Cuando se aísla de animales y humanos infectados de forma natural, o en el laboratorio, *C. burnetii* está en fase I, que es la forma altamente infecciosa. En subcultivos se produce un cambio a fase II, la cual no es infecciosa. Esta expresión antigénica diferente se emplea para distinguir serológicamente los estados agudo y crónico de la enfermedad.

La presentación clínica y evolución de la enfermedad dependen de diversos factores del huésped, particularmente el estado inmunitario de los pacientes, al haberse demostrado el papel de las integrinas, la interleucina-10 y el factor de necrosis tumoral en el desarrollo de una modalidad u otra de reacción inflamatoria. También son importantes el tamaño del inóculo, la vía de contagio de la infección⁴ e, incluso, el estado hormonal⁵. La respuesta inmunológica y las manifestaciones clínicas de la fiebre Q son comparables a las de otras especies de microorganismos intracelulares, como *Mycobacterium leprae* o *Leishmania* spp. Durante la infección aguda, el control de la enfermedad se asocia con una respuesta de anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA dirigidos frente al antígeno en fase II, y anticuerpos anti-músculo liso y antifosfolípidos, así como una respuesta inmunitaria de tipo celular con una reacción inflamatoria y formación de granulomas, que pueden ser inespecíficos o presentar una apariencia de masa con una parte central clara (granulomas en anillo), observables en biopsias hepáticas y en médula ósea.

En pacientes inmunodeprimidos y con afectaciones en las válvulas cardíacas, puede no ser posible el control de la infección y producirse entonces la cronificación de la misma, sin que se observe una respuesta inmunitaria celular pero sí altos niveles de anticuerpos frente a las fases I y II. En estos casos, las biopsias de las muestras contienen un gran número de microorganismos⁶.

Epidemiología

C. burnetii es una zoonosis ubicua transmisible al ser humano, que se ha identificado en artrópodos, peces, pájaros, roedores, marsupiales y diferentes tipos de ganado. En todo el mundo, los reservorios animales más frecuentes son las vacas, ovejas y cabras. Otros animales domésticos o peridomésticos pueden estar infectados por *C. burnetii*, incluidos los caballos, cerdos, camellos, conejos, perros y gatos. Estos últimos pueden explicar la aparición de epidemias urbanas. Los mamíferos infectados eliminan el microorganismo resistente a la desecación en la orina, heces, leche y, especialmente, a través de los productos relacionados con el parto, ya que en la placenta de los animales infectados se encuentran altas concentraciones de bacterias (> 10⁹ bacterias/g de tejido)⁵. Se considera que durante la gestación se puede producir la reactivación de la infección, observándose un incremento en el número de abortos en cabras y, con menos frecuencia, en ovejas, así como problemas en la reproducción del ganado vacuno.

La infección en el hombre ocurre con mayor frecuencia como resultado de la inhalación de pseudoesporas, con afectación de células alveolares y diseminación sanguínea; se admiten otras vías de contagio, como la ingestión de productos lácteos crudos contaminados, la exposición profesional y manipulación de animales contaminados y, esporádicamente, la transfusión de sangre infectada o por vía transplacentaria, que produce infecciones congénitas⁷. Las garrapatas pueden transmitir este microorganismo a los mamíferos domésticos, pero no se ha documentado la transmisión al hombre por estos artrópodos. Excepcionalmente, se ha documentado la transmisión interhumana.

La enfermedad presenta una amplia distribución geográfica y una prevalencia heterogénea, registrándose el mayor número de casos en primavera y verano. Se presenta en todas las edades, pero es más frecuente en los adultos. Estudios serológicos han mostrado una notable diversidad en los donantes de sangre según el área geográfica (18,3% en Marruecos; 26% en Turquía; 44% en Nigeria; 14,6-36,6% en Canadá). Se han documentado epidemias importantes de fiebre Q en Suiza, Gran Bretaña, Alemania y, más recientemente, en el sur de Francia⁸. En España, donde la enfermedad es endémica, encontramos una diversidad similar, ya que en Andalucía se diagnosticó fiebre Q⁹ en el 30% de los pacientes ingresados por fiebre de más de 7 días, mientras que, en el País Vasco, hasta el 60% de los casos de neumonías contraídas en esta comunidad se atribuyeron a una infección por *C. burnetii*¹⁰.

Manifestaciones clínicas

Tras la exposición y un período de incubación de 10-17 días⁵, *C. burnetii* produce una infección que puede ser inaparente o asintomática (54-60%), aguda (40%) o crónica (1-5%)^{5,8}. La infección aguda, caracterizada por su polimorfismo, presenta manifestaciones clínicas que dependen de la puerta de entrada del patógeno¹¹; cursa con mayor frecuencia como un cuadro de neumonía con fiebre elevada (40 °C), distrés respiratorio agudo y hallazgos radiográficos inespecíficos, similares a los descritos para las neumonías víricas o las neumonías por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. Sin embargo, en nuestro entorno, se han referido diferentes formas de presentación según el área geográfica: en el norte predominan las neumonías, mientras que en el sur es más frecuente la hepatitis aguda¹², con hepatomegalia y granulomas^{13,14}. Abril et al¹⁴ realizaron un estudio retrospectivo comparando las pruebas bioquímicas clásicas de función hepática en pacientes con fiebre Q y con fiebre botonosa mediterránea, detectando mayor frecuencia de hepatomegalia y elevación de transaminasas entre los primeros; sólo un paciente con fiebre Q mostró ictericia clínicamente evidente. Se han descrito otras manifestaciones clínicas en la fase aguda: afectación cardíaca con pericarditis y miocarditis, que puede ser fatal⁴; meningoencefalitis asociada a pleocitosis en líquido cefalorraquídeo¹⁶; síndrome de Guillain-Barré^{17,18}; síndrome de Miller-Fisher^{19,20}, y otras menos frecuentes, como

anemia hemolítica, tiroiditis, pancreatitis, neuritis óptica²¹ y mono-neuritis²². Se han descrito casos de oligoartritis por fiebre Q aguda¹⁵, si bien la afectación osteoarticular (osteomielitis, coxitis, espondilodiscitis) se considera una forma clínica común en los cuadros crónicos. Aunque las oligoartritis por *C. burnetii* pueden ceder espontáneamente, es importante su consideración para evitar su persistencia mediante un tratamiento antibiótico adecuado. En general, las formas agudas siguen un curso benigno con resolución en 10-15 días, y sólo un número limitado de pacientes (2-5%) requiere hospitalización.

En la fiebre Q crónica, la manifestación clínica más frecuente es la endocarditis, que se diagnostica, casi exclusivamente, en pacientes con una afectación valvular previa, en pacientes trasplantados y en pacientes inmunodeprimidos. Se ha sugerido la persistencia asintomática en estado quiescente de *C. burnetii* con reactivación asociada a este tipo de pacientes y a embarazadas. La fiebre está ausente o es baja, con remisiones espontáneas. Puede aparecer como una erupción purpúrica, insuficiencia renal y fallo cardíaco, y encontrar hepatomegalia y esplenomegalia unidas a disfunción valvular^{23,24}. Las vegetaciones raramente se ven en un ecocardiograma normal y los hemocultivos de rutina suelen ser negativos. Debe sospecharse de endocarditis por fiebre Q cuando existe una afectación valvular cardíaca asociada con un síndrome infeccioso o inflamatorio de origen desconocido con determinaciones analíticas anormales, tanto bioquímicas como serológicas. La fiebre Q crónica, cuyo diagnóstico normalmente se retrasa de 12 a 24 meses debido a que esta entidad raramente se tiene en consideración, constituye un problema grave, si se tiene en cuenta que algunas formas crónicas pueden llegar a ser letales. La afectación pulmonar es rara, aunque se han descrito casos de fibrosis pulmonar crónica en algunos pacientes años después de haber padecido neumonitis por fiebre Q aguda²⁵.

Diagnóstico microbiológico

La gran variedad de sus manifestaciones clínicas, así como la existencia de formas asintomáticas, hacen difícil el diagnóstico de infección por *C. burnetii*. Por ello, es importante que exista un alto grado de sospecha clínica y se estudien las circunstancias epidemiológicas de contacto con reservorios animales o ambientales.

El diagnóstico microbiológico directo puede establecerse mediante el aislamiento en cultivo celular convencional o en *shell vial* de *C. burnetii* a partir de muestras sanguíneas o tejidos, o mediante técnicas de amplificación y detección del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque estas últimas no están ampliamente difundidas^{26,27}. El cultivo en *shell vial* es útil, no sólo para el aislamiento, sino también para determinar la sensibilidad a los antibióticos²⁸, si bien sólo es factible en laboratorios con bioseguridad de nivel 3. Es posible la demostración del microorganismo mediante tinciones de Koster, Stamp, Giemsa y Gimenez y su recuperación en cultivos celulares procesando material valvular cardíaco en los casos en los que se procede a la sustitución valvular protésica²⁹. Aunque el microorganismo puede aislarse después de la desaparición de las manifestaciones clínicas, los cultivos tienen baja sensibilidad. Se ha propuesto diferentes métodos de amplificación para la detección de ADN específico (*Real Time PCR*, *Light-Cycler Nested PCR*, etc.) en cultivo celular, biopsia (pueden emplearse muestras congeladas, conservadas en formol o parafina), sangre y suero. La amplificación en tiempo real de la secuencia IS 11 11 tiene una excelente sensibilidad, incluso en la muestra sérica^{30,31}.

Sin embargo, el diagnóstico más ampliamente utilizado es el indirecto, para el cual disponemos de técnicas de reacción de fijación del complemento (FC) y de inmunofluorescencia indirecta (IFI). La FC es una técnica poco sensible que puede dar resultados falsos negativos, sobre todo en las formas crónicas. La IFI, considerada el método de referencia, presenta mayor sencillez, rapidez, sensibilidad y ausencia de interferencias con los sueros anticomplementarios de algunos pacientes. Debe ir precedida de la absorción del factor reuma-

toide, con lo que se eliminan los resultados falsos positivos en la detección de anticuerpos de clase IgM. Además, la IFI permite identificar las distintas clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM)^{32,33}. Para el diagnóstico de las formas agudas (antígeno en fase II) son significativos los títulos de anticuerpos de clase IgG $\geq 1/128$, la seroconversión y los títulos de anticuerpos de clase IgM $\geq 1/32$. En las formas crónicas (antígeno en fase I), la detección de títulos de anticuerpos de clase IgG $\geq 1/800$ se considera un diagnóstico. No obstante, en un estudio realizado por Fraile et al³⁴ en 19 pacientes con manifestaciones clínicas y pruebas diagnósticas compatibles con fiebre Q crónica, identificaron a 8 pacientes con serología positiva para antígenos de fase I con título $\geq 1/512$ (rango 1/512-1/2.048) y títulos elevados de IgG frente al antígeno de fase II ($\geq 1/200$). Por tanto, los criterios serológicos de diagnóstico pueden diferir discretamente según el área geográfica, por lo que el incremento de los títulos de anticuerpos de clase IgG e IgM para antígenos de *C. burnetii* en fase II o en fase I, observado en dos muestras séricas diferidas por 1-2 semanas, debe también tomarse en cuenta para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes. Se recomienda que a todos los pacientes con endocarditis y hemocultivo negativo, o con fiebre y aneurisma aórtico, o con fiebre prolongada, hepatitis granulomatosa, neumonía atípica, fiebre prolongada y alteraciones neurológicas, se les realice, al menos, un estudio serológico para fiebre Q.

Tratamiento

El tratamiento de la fiebre Q aguda consiste en administrar doxiciclina, 200 mg/día, durante 15-21 días. En la meningoencefalitis, se considera eficaz un tratamiento con fluoroquinolonas, puesto que éstas penetran en la barrera hematoencefálica. En la hepatitis por fiebre Q, como suele estar asociada con una fuerte respuesta inmune, con producción de autoanticuerpos o anticuerpos antinucleares, se aconseja administrar prednisona, 40 mg/día, durante 7 días³.

La fiebre Q crónica debe tratarse con al menos dos antibióticos; se propone la combinación de doxiciclina y ciprofloxacino (u ofloxacino) de manera prolongada (2-3 años) retirándola únicamente cuando los anticuerpos frente a los antígenos de fase I presentan una tasa inferior a 1/50 en el caso de los IgA, o $< 1/200$ en el caso de los IgG¹¹. Otras asociaciones como doxiciclina e hidroxycloquinolona (600 mg/día) presentan problemas por las reacciones de fotosensibilidad y la necesidad de controlar los niveles de esta última.

La cirugía de sustitución valvular es necesaria en muchos casos de endocarditis, aunque algunos autores, como Ballester³⁵, han obtenido buenos resultados con rifampicina y doxiciclina durante 3 años.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Mc Dade JE. Historical aspects of Q fever. En: Marrie TJ, ed. Q fever, Volumen 1: The disease. Boca Ratón: CRC Press; 1990. p. 5-21.
- Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1:189-96.
- Raoult D, Marrie TH. Retrospective study of Q fever. *Clin Infect Dis.* 1995;20:496.
- Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:219-26.
- Millon M, Lepidi H, Raoult D. Fièvre Q; actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Med Malad Infect.* 2009;39:82-94.
- Raoult D, Marrie T. Q fever. *Clin Infect Dis.* 1995;20:489-95.
- Pérez-Trallero E, Gilla G, Montes M, Sáenz-Domínguez JR, Alcorta M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among slaughterhouse workers in Northern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14:71-3.
- Dupuis G, Petite J, Peter O, Vonilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. *Int J Epidemiol.* 1987;16:282-7.
- Martínez-Luengas F, Borobio MV, Gálvez J, Le N, De Lope M. Fiebre Q en Sevilla. Comparación con otras entidades. Descripción de 34 casos y revisión. *Rev Clin Esp.* 1985;176:400-5.
- Aguirre Errasti C, Montejo Baranda M, Hernández Almaraz H. An outbreak of Q fever in the Basque country. *Can Med Assoc J.* 1984;131:48-9.

11. Roca B. Q fever. *An Intern Med*. 2007;11:1-9.
12. Sobradillo V, Zalacain K, Capelastegui A, Uresandi F, Corral J. Antibiotic treatment in pneumonia due Q fever. *Thorax*. 1992;47:276-8.
13. Parra E, Domínguez A, Arco A, Ibáñez A, Peña JM. Hepatitis aguda como forma de presentación de la fiebre Q. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1989;7:452-3.
14. Abril López de Medrano V, Ortega González E, Ruiz Cabanilles C, Soler Ros J, Fraile Fariñas T, Monzó Inglés V, et al. Afectación hepática en la fiebre Q y la fiebre botanosa del Mediterráneo. Estudio comparativo. *Rev Esp Enf Digest*. 1994;86:891-3.
15. Aguilar García J, De la Torre Lima JL, Prada Pardo A, Del Arco Jiménez. Varón con fiebre y artritis. *Anal Med Interna*. 2005;1:22.
16. Abril V, Ortega E, Mart P, Pedro F, Herrera A. Meningoencefalitis por *Coxiella burnetii*. *Rev Eur Neurol*. 1996;130:722.
17. Bernit E, Pouget J, Jambon F, Dutronc H, Martínez P, Brouqui P, et al. Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature. *Infection*. 1989;17:394-5.
18. Bernard E, Carles M, Laffont C, Durant J, Dellamonica P, Guillain-Barré syndrome associated with acute Q fever. *Med Clin (Barc)*. 1992;29:314-5.
19. Diaz Ortuño A, Maeztu C, Muñoz JA, Reigadas R, Rodríguez T, Valdés M. Millar Fisher syndrome associated with Q fever. *Acta Neurol Scand*. 2002;106:371-3.
20. Fraile MT, Ramos JL, Ocete MD, Parra J, Cervelló MA, Medina A, et al. Relationship between Guillain-Barré syndrome and *Coxiella burnetii* infection. 19th ECMID. Helsinki, Finlandia. 16-19. Resumen P173.
21. Shaked Y, Samra Y. Q fever meningoencephalitis associated with bilateral abducens nerve paralysis, bilateral optic neuritis and abnormal cerebrospinal fluid findings. *Rev Neurol*. 2002;158:77-80.
22. Sommer JB, Schoerner C, Heckman JG, Neundoerfer B, Hiltz MJ. Mononeuritis multiplex caused by *Coxiella burnetii* infection (Q fever). *Scand J Infect Dis*. 2005;37:949-50.
23. Stein A, Raoult D. Q fever endocarditis. *Eur Heart J*. 1995;16:19-23.
24. Brouqui PH, Dupont HI, Drancourt H, Berland Y, Raoult D. Chronic Q fever. *Arch Intern Med*. 1993;153:642-8.
25. Aitken ID, Bogel K, Bracea E. Q fever in Europe: current aspects of aetiology, epidemiology, human infection, diagnosis and therapy. *Infection*. 1987;15:323-7.
26. Brouqui PH, Dumler JS, Raoult D. Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *Am J Med*. 1994;97:451-8.
27. Raoult D, Torres H, Drancourt M. Shell-vial assay: evaluation of a new technique for determining antibiotic susceptibility, tested in 13 isolates of *Coxiella burnetii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:2070-7.
28. Torres H, Raoult D. *In vitro* activities of ceftriaxone and fusidic acid against 13 isolates of *Coxiella burnetii*, determined using the shell-vial assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:491-4.
29. Muhleman K. Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q fever endocarditis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:428-31.
30. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30:57-15.
31. Ughetto E, Gourmet F, Raoult D, Rolain JM. Three years experience of real-time PCR for diagnosis of Q fever. *Clin Microbiol Infect*. 2009; Prepublicación electrónica, mayo de 2009.
32. Raoult D. Diagnostique biologique de la fièvre Q. *Rev Fr Lab*. 1991;227:68-70.
33. Nistal de Paz F, Nistal de Paz C. Fiebre Q. *Med Clin (Barc)*. 1994;103:667-75.
34. Fraile MT, Resta MT, Fandos M, Campos N, De Lamo M, Aznar E. Estudio clínico-serológico de la fiebre Q en nuestro medio. *Rev Diag Biol*. 2006;55:49-54.
35. Ballester Belda JE. Estudio de las endocarditis infecciosas en un hospital de referencia. Hospital General Universitario de Valencia. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Universidad de Valencia. Valencia, 1999.