

M.J. Morales Amella*
M. Serrano Serrano*
A. Sánchez Marco*
J.M. Sáez-Benito Ferrer*
E. Jáuregui Latorre**
M. López Girón**

Hepatozoonosis canina.

45

* Laboratorios Albeitar. ** Clínica Las Torres.
Correspondencia: D. Mariano José Morales Amella
Laboratorios Albeitar.
C/ Miguel Labordeta, 11, local
50010 Zaragoza.

RESUMEN.

Se diagnosticó hepatozoonosis en cuatro perras de raza beagle que habían sufrido una infestación masiva por garrapatas. Se describe el cuadro clínico, protocolo laboratorial, diagnóstico diferencial, tratamiento y evolución. Tras eliminar la presencia de otros procesos patológicos, concluimos que *Hepatozoon canis* produce una reacción leucoeritroblástica, que remite con el tratamiento.

PALABRAS CLAVE.

Hepatozoon; Perro; Leucocitosis.

ABSTRACT.

The study diagnosed canine hepatozoonosis in four Beagles, that become infested with ticks. It describes the clinical signs, laboratory protocol, differential diagnosis, treatment and evolution. After eliminate the presence of other pathology, we conclude what Hepatozoon canis causes a leucoeritroblastic reaction, that remit with treatment.

KEY WORDS.

Hepatozoon; Dog; Leukocytosis.

46

INTRODUCCIÓN.

La hepatozoonosis es una enfermedad cuya importancia ha sido muy discutida, teniéndose como una parasitosis hemática no patógena ligada a enfermedades como babesiosis, ehrlichiosis y estados inmunodeprimidos^(18, 22). En los años 80 Craig⁽⁹⁾ publica unos trabajos en los que atribuye los signos clínicos observados a la presencia de *Hepatozoon canis*.

Desde entonces la enfermedad ha sido descrita en diversos países de los cinco continentes^(1, 6, 32), en Estados Unidos se la conoce como «fiebre de Texas»^(5, 10). En España P. García^(15, 16), C. Nieto⁽³⁰⁾ y M. Habela⁽²¹⁾ han publicado distintos artículos sobre *Hepatozoon canis*.

La infestación ha sido descrita en carnívoros domésticos y silvestres^(2, 3), ungulados, roedores, marsupiales, aves^(7, 33), reptiles, incluso un posible caso en el hombre⁽⁹⁾.

El ciclo vital del género *Hepatozoon* (subclase Coccidia) necesita del paso por un artrópodo y un vertebrado para completarse^(10, 23). La transmisión se produce por: ingestión de *Rhipicephalus sanguineus*, consumo de carne o vísceras con quistes y vía transplacentaria^(10, 33).

En el intestino del hospedador, los esporozoitos liberados alcanzan los órganos del SRE y músculo estriado, donde son fagocitados⁽⁶⁾. Después de producirse la fase asexual, se rompen los quistes y liberan merozoitos, éstos invaden neutrófilos y monocitos, donde se transforman en gametocitos infestantes para la garrapata^(13, 33).

La enfermedad es estacional, coincidiendo con la presencia del artrópodo.

El cuadro clínico más frecuente^(10, 11, 23) cursa con hipertermia (39°-40°), anorexia, abatimiento, anemia, hiperestesia y dificultad en la marcha. Los hallazgos radiográficos tienen presentación inconstante⁽⁶⁾ con proliferación perióstica de intensidad variable, afectando vértebras, pelvis y huesos largos. La aparición de alteraciones óseas no se relaciona con la duración del cuadro clínico, y parece haber una predisposición en animales que sufren infestaciones severas durante el crecimiento óseo⁽³⁶⁾.

El parásito puede hallarse frecuentemente en perros asintomáticos. El cuadro clínico, se hace más evidente, cuando la parasitosis se asocia con esta-

dos de inmunosupresión o defectos congénitos en la función neutrofilica. Los patólogos norteamericanos encuentran lesiones óseas en un elevado porcentaje de casos, mientras que apenas se describen en otros países^(5, 6). Hasta el momento, no se conocen los mecanismos que producen esta diferente presentación de la enfermedad.

Los resultados laboratoriales muestran leucocitosis, neutrofilia con desviación a la izquierda, anemia media a severa y trombocitopenia; ligero aumento de la PAL; la médula ósea presenta una relación mielóide/eritroide elevada^(9, 17, 23).

El diagnóstico se establece por la presencia de gametocitos en los neutrófilos y ocasionalmente en monocitos⁽¹³⁾ (Fotos 1 y 2). Estas estructuras tienen forma rectangular de 8-10 x 36 micras. Si la preparación no se realiza rápidamente tras la extracción de sangre, el gametocito desaparece dejando una cápsula sin teñir dentro de los leucocitos⁽²⁸⁾. El n.º de parásitos en sangre puede variar de 1/1.000-65/100 neutrófilos^(5, 6). Algunos autores consideran esencial la biopsia muscular para el diagnóstico en animales sin parasitemia^(5, 9). Hasta el momento no se han desarrollado pruebas serológicas que faciliten el diagnóstico. Aparece inmunidad humoral estimulada por el parásito, pero no hay evidencia de que sean anticuerpos protectores⁽⁹⁾.



Foto 1. Gametocito de *Hepatozoon canis* en el interior de un neutrófilo de sangre periférica x100.

Los tratamientos utilizados hasta el momento, no han demostrado ninguna eficacia frente a *Hepatozoon canis*. Se han empleado distintos anti-

M.J. Morales Amella
M. Serrano Serrano
A. Sánchez Marco
J.M. Sáez-Benito Ferrer
E. Jáuregui Latorre
M. López Girón

Hepatozoonosis canina.

48

protozoarios, entre ellos, el aceturato de diaminaceno y el dipropionato de imidocarb que, asociado a tetraciclinas, consigue la remisión de síntomas en 3 a 5 días y la depresión de la parasitemia al 50 % en 3 a 4 semanas^(6, 12). Otros autores han encontrado resistencias del parásito al imidocarb tras repetidos tratamientos⁽³²⁾. Algunos opinan que la pobre respuesta del *Hepatozoon* al tratamiento, podría explicarse por la deficiencia de la enzima mieloperoxidasa que presentan los neutrófilos parasitados⁽²⁴⁾. Dada la variedad de síntomas clínicos, el tratamiento sintomático debe adaptarse a cada caso en particular.

CASO CLÍNICO.

Una perra de 7 años de edad, raza beagle, acudió a consulta con un cuadro inespecífico: decaimiento, anorexia, fiebre (39,6° C) y palidez en las mucosas. La anamnesis reveló que el animal había sufrido una infestación masiva por garrapatas 15 días antes. El examen físico confirmó los signos clínicos mencionados.

El análisis laboratorial se orienta hacia la búsqueda de parásitos hemáticos. Se observa la presencia de 3 gametocitos de *Hepatozoon canis* por cada 100 neutrófilos, y 1 en el interior de un monocito (Foto 2). Se descarta la presencia de *Ehrlichia canis* y/o *platii*, virus del moquillo, *Babesia*, *Haemobartonela* y microfilarias.

El examen hemocitológico de la serie blanca, revela leucocitosis con neutrofilia y desviación a la

izquierda de la curva de Arneht, con presencia de linfocitos activados. Los neutrófilos evidencian diferentes estados de toxicidad, con hipersegmentación nuclear, aumento del diámetro celular, inclusiones bacterianas intracitoplasmáticas y cuerpos de Döhle (Foto 3).

En la serie roja se observa anemia severa macrocítica hipocrómica regenerativa, con IPR de 2,48 y presencia de 32 CRN/100 GB: rubricitos y metarubricitos ortocromáticos y policromáticos. Anisocitosis, policromasia y poikocitosis (Foto 3). Observándose megalocitos, estomatocitos, codocitos y gigantocitos. Presencia de cuerpos de Howell-Jolly. La serie plaquetaria presenta hipergranulación y anisocitosis (Foto 4).

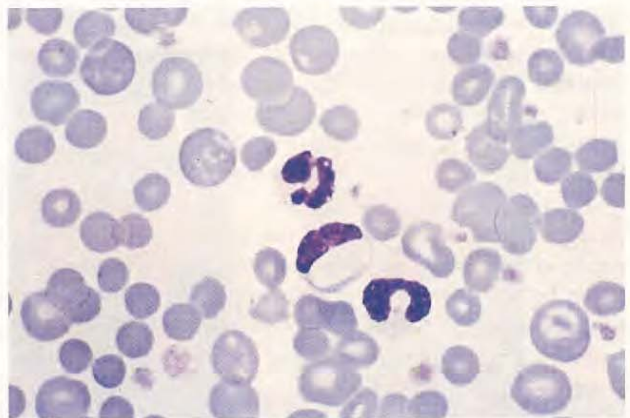


Foto 3. Neutrófilos con hipersegmentación nuclear y cariorrexis. En el centro se observa un *Hepatozoon* ×100.

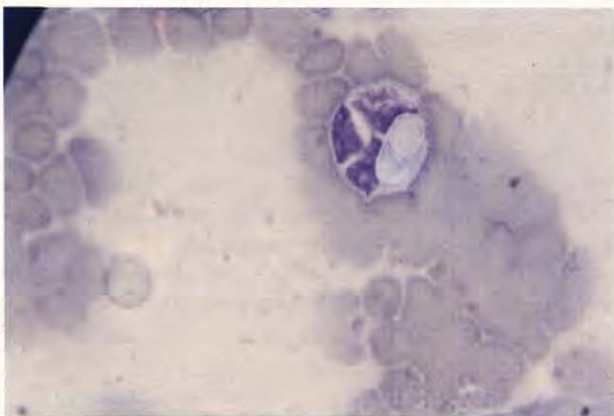


Foto 2. *Hepatozoon canis* en el interior de un monocito ×100.

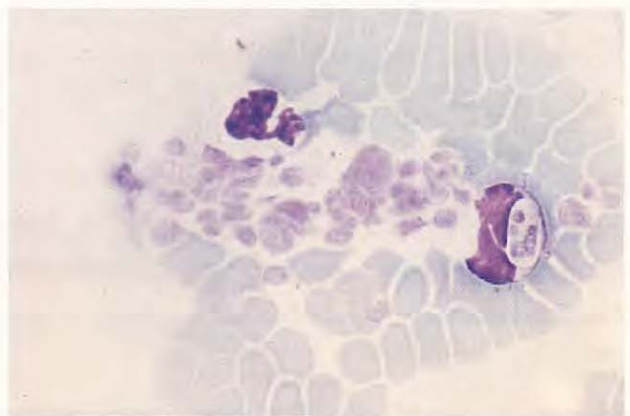


Foto 4. Plaquetas presentando alteración del tamaño y de la morfología, con *Hepatozoon* en neutrófilo ×100.

Los parámetros bioquímicos estudiados son normales, excepto la PAL con un valor de 295 U/L a 30° C. La electroforesis de proteínas séricas muestra ligeras variaciones, descenso de la alfa 2 y elevación de la fracción beta (Atom Digiscan 434) (Fig. 1).

El análisis conjunto de ambas series, blanca y roja, induce a pensar en una reacción leucoeritroblástica, que suele estar asociada a síndromes mieloproliferativos o enfermedades no neoplásicas que comprometan el sistema hematopoyético. Esto nos lleva a realizar análisis diarios, durante una semana, para confirmar o descartar estas posibilidades, dada la escasez de información referente a cuadros causados exclusivamente por *H. canis*.

Ante el diagnóstico de hepatozoonosis, se hace un chequeo a otros tres animales que conviven con nuestro paciente, resultando estar también parasitados. Las anomalías sanguíneas no son tan severas como en el caso que se describe. Se sigue para todos el mismo protocolo analítico y terapéutico.

Se realiza una transfusión de 250 cc de sangre entera. Se administra una dosis de 0,5 mg/kg de imidocarb por vía SC y 10 mg/kg/día de doxiciclina oral durante 14 días. En los días siguientes, la paciente muestra mejoría general, desapareciendo la fiebre. No hay esplenomegalia ni adenopatías generalizadas. La exploración radiográfica del cráneo, columna vertebral, pelvis y extremidades no revela alteraciones óseas.

A los 4-5 días de tratamiento se contabilizan de 2 a 3 gametocitos de *Hepatozoon* cada 100 neutrófilos. Se normaliza la fórmula leucocitaria y el recuento de leucocitos totales, aunque los neutrófilos mantienen las alteraciones tóxicas. Los valores de la serie roja comienzan un ascenso progresivo y desaparecen las formas jóvenes. El incremento del hematocrito los días 4 y 5 se debe a la presencia de gran cantidad de gigantocitos y megalocitos (Tabla I).

En el estudio de médula ósea, obtenida por punción de la cesta ilíaca, se observa que la serie eritroide no responde proporcionalmente al grado de anemia, observado en el estudio de la serie roja. La serie mieloide sufre un incremento de mieloblastos, progranulocitos y neutrófilos mielocitos que dan imagen de médula ósea con hiperplasticidad, sin criterios de malignidad y relación mieloide/eritroide normal (Tabla II).

Estos resultados indican que la reacción leuco-

eritroblástica es debida a una enfermedad no neoplásica del sistema hematopoyético.

El perfil bioquímico permanece normal. En el proteinograma (ver curvas) se produce un ligero aumento de las gammaglobulinas que se mantienen siempre dentro del rango normal. Se comprueba la ausencia de una gammapatía monoclonal o policlonal, que suele acompañar a síndromes mieloproliferativos productores o no de inmunoglobulinas: enfermedades parasitarias como la leishmaniosis; infecciosas del orden rickettsiae⁽³⁴⁾.

El día 15 se administra la segunda dosis de imidocarb, y dada la mejoría de la paciente, se da por finalizada la antibioterapia.

Los neutrófilos mantuvieron las alteraciones tóxicas, comprobándose la desaparición de las inclusiones bacterianas intracitoplasmáticas.

La médula ósea muestra normocelularidad y relación mieloide/eritroide normal (Fotos 5 y 6) (Tabla II).

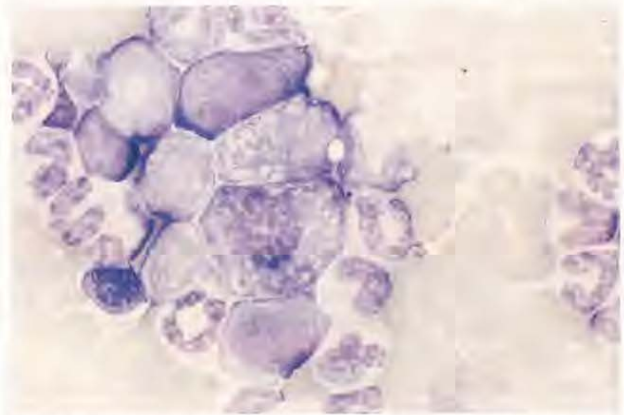


Foto 5. Extensión de M.O.: precursores de las series eritroide y mieloide. Mitosis normal de un progranulocito eosinofílico. Neutrófilos de aspecto normal $\times 100$.

La serie roja no alcanza los valores normales hasta transcurridos dos meses de iniciar el tratamiento. En el proteinograma del día 60 se aprecia: descenso de la albúmina, aumento en valor y pico de la alfa globulina 2, aumento de las betaglobulinas bien definidas y ligero aumento de las gammaglobulinas (Fig. 1).

DISCUSIÓN.

Cuando se presente a nuestra consulta un animal con síntomas inespecíficos, o que ha sufrido

M.J. Morales Amella
M. Serrano Serrano
A. Sánchez Marco
J.M. Sáez-Benito Ferrer
E. Jáuregui Latorre
M. López Girón

Hepatozoonosis canina.

50

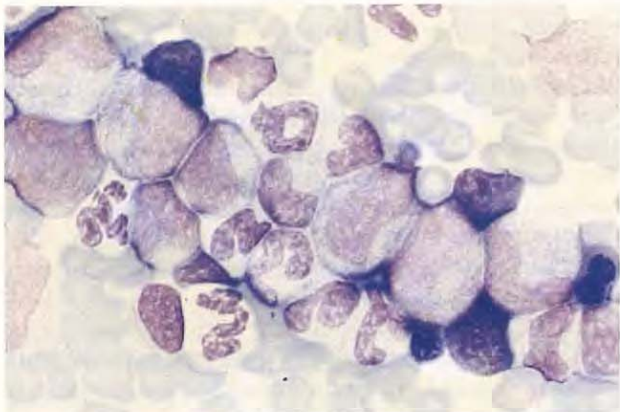


Foto 6. Extensión de M.O.: aumento de precursores de la serie mieloide $\times 100$.

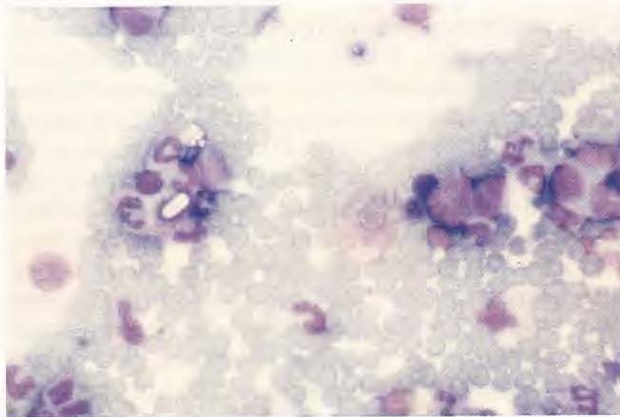


Foto 7. Gametocito de *Hepatozoon* en M.O. $\times 40$.

una infestación por garrapatas, debemos tener presente la posibilidad de infestación por *Hepatozoon canis*. Dada la climatología de nuestro país, el artrópodo transmisor dispone del hábitat ideal, por lo que la hepatozoonosis puede tener gran incidencia.

Es imprescindible el seguimiento laboratorial, tanto para realizar el diagnóstico diferencial con otras patologías concurrentes, como para evaluar el estado del animal y su respuesta al tratamiento.

Se ha descrito la presencia de *Hepatozoon canis* en neutrófilos, monocitos y no en médula ósea. En cambio, hemos observado mayor presencia de gametocitos en médula ósea que en sangre periférica (Foto 7).

Se observan diferentes imágenes del parásito, conteniendo estructuras basófilas en su interior o con apariencia de una cápsula vacía translúcida; esta última imagen puede observarse en extensiones de sangre reciente, no puede deberse, por tanto, al retraso en realizar la extensión⁽²⁸⁾ (Foto 8).

Aconsejamos un meticuloso estudio del frotis sanguíneo para evitar que infestaciones muy bajas pasen desapercibidas, teniendo en cuenta que un gametocito de *Hepatozoon* por cada 100 neutrófilos, puede provocar la aparición de síntomas. El número de gametocitos por 100 neutrófilos aumenta alrededor del día 36, es posible que coincida con el momento en que se rompen los quistes musculares, hecho que consideramos importante para investigaciones posteriores.

El estudio comparado de las diferentes líneas ce-

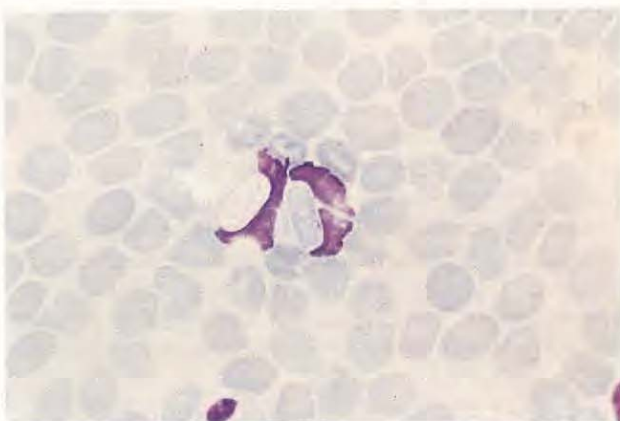


Foto 8. Dos gametocitos de *Hepatozoon* que presentan diferentes características citoquímicas $\times 100$.

lulares en sangre periférica y médula ósea, revela un aumento de la actividad granulopoyética, que da lugar a leucocitosis neutrofílica del pool circulante, y alteraciones tóxicas cuando se encuentran en sangre periférica^(9, 17). Contrariamente a los datos observados por otros autores^(12, 13), aparece trombocitosis con elevado número de megacariocitos en médula ósea.

Al no encontrar anomalías celulares que concuerden con los criterios de malignidad, deducimos que *Hepatozoon canis* provoca una reacción leucemoide y/o leucoeritroblástica.

Consideramos que el estudio de la médula ósea es importante para el diagnóstico diferencial con leishmania, ehrlichia, síndromes mieloproliferativos... No hemos observado alteraciones produci-

das por el tratamiento.

52 La trayectoria de la electroforesis de proteínas séricas ha permitido descartar la posible presencia de otras patologías, evaluar la respuesta de anticuerpos humorales y el estado del animal. Hasta el día 60 no se observa un descenso significativo de la albúmina, a diferencia de los hallazgos de otros autores^(17, 18), a la vez que aumentan las demás globulinas. Esta evolución puede ser signo de mal pronóstico (Fig. 1).

Por otra parte en USA^(5, 12) aparecen problemas locomotores como síntoma frecuente, por ello se realizó un estudio radiográfico que no reveló proliferación perióstica ni otras anomalías óseas. Los valores de PAL tampoco indicaron alteraciones del aparato locomotor.

El tratamiento empleado frente a *Hepatozoon canis* produce remisión de síntomas sin eliminar al parásito.

No podemos descartar la posibilidad de transmisión por ingestión de carne o vísceras con quistes, ni la vía transplacentaria. El conjunto de animales estudiados son abuela, madre e hijas que incluyen en su dieta pequeños roedores cazados.

Tras eliminar la presencia de otros procesos patológicos, concluimos que, *Hepatozoon canis* produce una reacción leucoeritroblástica que remite con el tratamiento.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a D. Jesús Malón, veterinario y propietario de los cuatro animales, su interés y colaboración que han posibilitado el completo estudio de los animales durante el tiempo necesario.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abranches, P., Conceicao-Silva, F.M., Silva-Pereira, M.C. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J. Trop. Med. Hyg.* 87 (5): 197-200, 1984.
2. Anderson, T.J. Blood parasites of mammals from Papua New Guinea. *J. Wildl. Dis.* 26 (2): 291-294, 1990.
3. Averbeck, G.A., Bjork, K.E., Packer, C., Herbst, L. Prevalence of Hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. *J. Wildl. Dis.* 265 (3): 392-394, 1990.
4. Baker, J.L., Craig, T.M., Barton, C.L., Scott, D.W. *Hepatozoon canis* in a dog with oral pyogranulomas and neurologic disease. *Cornell Vet.* 78 (2): 179-183, 1988.
5. Barton, C.L., Russo, E.A., Craig, T.M., Green, J.W. Canine hepatozoonosis: A retrospective study of 15 Naturally Occurring Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 21: 125-134, 1985.
6. Beaufils, J.P., Martin-Granel, J., Bertrand, F. Hépatozoonose canine 2^e partie. A propos de 28 cas. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.* 44, 1988.
7. Bennett, G.E., Garvin, M., Bates, J.M. Avian hematozoa from west-central Bolivia. *J. Parasitol.* 77 (2): 207-211, 1991.
8. Conceicao-Silva, F.M., Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Janz, J.G. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *J. Wildl. Dis.* 24 (2): 344-347, 1988.
9. Craig, T.M., Smallwood, J.E., Knauer, K.W., McGrath, J.P. *Hepatozoon canis* Infection in Dogs: Clinical, Radiographic, and Hematologic Findings. *JAVMA* 173: 967-972, 1978.
10. Craig, T.M. Hepatozoonosis. Infectious diseases of the dogs and cats. Greene, C.E. 778-785. Ed. Saunders 1990.
11. Ettinger, S.J. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 290-291. Ed. Saunders. 3.^a edición. 1989.
12. Elías, E., Homans, P.A. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings: treatment. *J. Small Anim. Pract.* 29: 55-62, 1988.
13. Ezeokoli, C.D., Ogunkoya, A.B., Abdullhi, R., Tekdek, L.B., Sannusi, A., Ilemobade, A.A. Clinical and Epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *J. Small Anim. Pract.* 24: 455-460, 1983.
14. Foreyt, W. Diagnostic parasitology. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 19 (5): 979-1000, 1989.
15. García, P., et al. Identificación de *Hepatozoon canis* en España. Estudio epidemiológico de una enzootia en la Carolina. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Animal* (3) 75-89, 1990.
16. García Fernández, P., et al. Identificación de *Hepatozoon canis* en España. Resúmenes VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. 25-29 Septiembre. Cáceres. 185, 1989.
17. Gaunt, P.S., Gaunt, S.D., Craig, T.M. Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with hepatozoonosis. *JAVMA* 182, 4: 409-410, 1983.
18. Gossett, K.A., Gaunt, S.D., Aja, D.S. Hepatozoonosis and Ehrlichiosis in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 21: 265-267, 1985.
19. Grindem, C.D. Bone marrow biopsy and evaluation. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 19, 4: 669-698, Clinical Pathology Part 1, 1989.
20. Groulade, P. L'électroporèse des protéines sériques dans les affections chroniques chez le chien - Aperçus. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'animal de Compagnie.* 20, 6: 569-576, 1985.
21. Habela, M. Protozoosis transmitidas por garrapatas en carnívoros. *Médico Veterinario* 33: 17-32, 1993.
22. Hoskins, J.D. Canine Haemobartonellosis, Canine Hepatozoono-

- sis, and Feline Cytauxzoonosis. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21 (1): 129-140, 1991.
23. Hriberwik, T.N., Barr, S.C. Parasitic blood disease of dogs and cats. *Current Veterinary Practice*. Vol X. Kirk. 419-424. Ed. W.B. Saunders, 1989.
24. Ibrahim, N.D., Rahamathulla, P.M., Njoku, C.O. Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with canine Hepatozoonosis. *Int. J. Parasitol.* 1988: 915-8, 1989.
25. Jones, H.I. Notes on parasites in penguins (*Spheniscidae*) and petrels (*Procellariidae*) in the Antarctic and Subantarctic. *J. Wildl. Dis.* 24 (1): 166-167, 1988.
26. Kaneko, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Cap. 3, 97-116, 3ª Ed. Academic Press, 1980.
27. Latimer, S., Rakich, P.N. Clinical interpretation of leukocyte response. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 19, 4: 637-668. Clinical Pathology Part 1, 1989.
28. Mercer, S.H., Craig, T.M. Comparison of Various Staining Procedures in the Identification of *Hepatozoon canis* Gamonts. *Veterinary Clinical Pathology* 17: 3, 63-65.
29. Mercer, S.H., Jones, L.P., Rappole, J.H., Twedt, D., Lack, L.L., Craig, T.M. *Hepatozoon sp.* in wild carnivores in Texas. *J. Wildl. Dis.* 24 (3): 574-576, 1988.
30. Nieto, C.G., et al. *Hepatozoon canis* asociado a otros procesos parasitarios. Resúmenes VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. 25-29 Septiembre. 308, 1989.
31. Nordgren, R.M., Craig, T.M. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.* 16 (3-4): 207-214, 1984.
32. Ogunkoya, A.B., Adeyanju, J.B., Aliu, Y.O. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J. Small Anim. Pract.* 22: 775-777, 1981.
33. Olsen, O.W. Parasitología animal. 185-191. Ed. Aedos, 1977.
34. Pennisi, M.G. Ehrlichiosis canina. *Animalis Familiaris* 4, 1: 11-15, 1989.
35. Penzhorn B.L., Lange, A.L. *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in the same canine neutrophil. *J.S. Afr. Vet. Assoc.* 61 (3): 95, 1990.
36. Rajamanickam, C., Wiesenhutter, E., Zin, F.M., Hamid, J. The incidence of canine haematozoa in Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol* 17 (2): 151-157, 1985.
37. Reardon, M.J. and Pierce, K.R. Acute experimental canine Ehrlichiosis. *Vet. Pathol.* 18: 48-61, 1981.
38. Schalm, O.W. Examination of the blood and bone marrow. *Veterinary Haematology*. Cap. 1, 1-20. 4ª Ed. Lea & Febiger. Philadelphia 1986.
39. Schalm, O.W. The dog normal haematology with comments on response to disease. *Veterinary Haematology*. Cap. 4, 103-125. 4ª Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 1986.
40. Schalm, O.W. The neutrophils. *Veterinary Haematology*. Cap. 26, 676-730. 4ª Ed. Lea & Febiger. Philadelphia 1986.
41. Schalm, O.W. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. *Veterinary Haematology*. Cap. 34, 941-989. 4ª Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 1986.
42. Turner, C.M. Seasonal and age distributions of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma* and *Grahamella* species in *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus sylvaticus* populations. *Parasitology* 93 (2): 279-289, 1986.