

Título: Microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Brucella* spp. IPK. 2017.

Lugo Suárez, Odisney¹; Obregón Fuentes, Ana Margarita²; Echevarría Pérez, Eduardo³; Baly Gil, alberto⁴.

¹IPK/Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba, odisney@ipk.sld.cu; ²IPK/Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba, AMObregon@ipk.sld.cu; ³IPK/Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba, echevarria@ipk.sld.cu; ⁴IPK/Epidemiología, La Habana, Cuba, baly@ipk.sld.cu.

Resumen: El incremento del número de muestras procedentes de pacientes con sospecha de brucelosis humana en Cuba, ha provocado que en ocasiones se agote la suspensión bacteriana del FAB en los laboratorios provinciales, lo cual conlleva a retrasos en el diagnóstico, tratamiento, notificación y seguimiento de casos confirmados. La presente investigación validó y estimó los costos económicos parciales de una microtécnica del FAB, como propuesta para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. en humanos. Se realizó un estudio de corte transversal, entre enero y junio de 2017 en 486 sueros de casos sospechosos cubanos. Se emplearon como sistemas de referencia los ELISA IgM e IgG contra *Brucella* spp. La estimación de los costos se realizó en 182 sueros recibidos en el LNREB durante marzo y abril de 2017. Se obtuvo, para la microtécnica del FAB comercial, 100% de especificidad y 98% de sensibilidad. La concordancia entre el FAB comercial y la microtécnica resultó muy buena (Kappa = 0,8816). Los costos económicos estimados para una determinación fueron de 617,19 CUP. La microtécnica del FAB comercial demuestra ser una herramienta robusta y segura, capaz de reemplazar la metodología utilizada actualmente, por lo que se recomienda su uso en la red nacional de laboratorio de salud pública en Cuba.

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis se considera una enfermedad “olvidada” a pesar de ser una de las cinco zoonosis bacterianas más frecuentes en todo el mundo (1). Su agente etiológico son las bacterias del género *Brucella*, de ellas *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son patógenas para el hombre (2). La infección del ser humano ocurre de forma accidental y está íntimamente relacionada con la enfermedad en los animales domésticos (3). Los pacientes pueden presentar síntomas leves e inespecíficos o cuadros severos, debilitantes e incapacitantes (4). Es importante destacar que cuando el diagnóstico de esta patología no es oportuno existen mayores posibilidades de que el individuo evolucione hacia la cronicidad y de que aparezcan complicaciones o focalizaciones que, hasta en el 20 % de los afectados, se asocian a discapacidades (5).

Los pilares fundamentales para confirmar la infección por brucelas son la elaboración correcta de la historia clínico – epidemiológica y los resultados que brinda el laboratorio de microbiología (6). En este sentido, las técnicas serológicas, debido a que los resultados que se obtienen a través de ellas pueden ser reproducidos con facilidad en diferentes laboratorios, son las más generalizadas en las regiones donde la brucelosis humana representa un problema de salud. Ellas permiten la detección de anticuerpos antibrucelas específicos de tipo IgM, IgG e IgA. Entre los métodos más utilizados para este fin se encuentran la técnica Rosa de Bengala, la Seroaglutinación en Tubo (SAT) y los Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (7). Estos últimos permiten conocer si el paciente cursa por la etapa aguda o crónica de la enfermedad (8).

Debido a que en Cuba la brucelosis humana es una enfermedad de declaración obligatoria (9) su diagnóstico microbiológico se efectuó durante muchos años mediante cultivo y técnicas serológicas case-ras. Pero, a partir de la década del 90 del pasado siglo, debido al inicio del “periodo especial”, comenza-ron a escasear en la mayoría de los laboratorios los reactivos e insumos necesarios para la confirmación microbiológica de la infección por brucelas (10), y no es hasta el año 2012 que el MINSAP logra adquirir e introducir en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas (LNREB) del “IPK” y en los laboratorios de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de todo el país el sistema serológico comercial FAB (del inglés *Febrile Antigen Brucella*). Este sistema serológico, que es comercializado por la firma *Diagnostic Senese SpA* (DIESSE), permite la pesquisa de anticuerpos contra brucelas y cuenta de una prueba inicial cualitativa que se realiza en tarjeta y clasifica el suero como no reactivo o reactivo, para luego aplicar a los últimos la prueba semi-cuantitativa que se efectúa en tubos y permite conocer hasta que dilución del suero del paciente están presente esos anticuerpos (11). Su evaluación, en nuestras condiciones, demostró que es un diagnostica-dor robusto, sensible, específico y seguro, por lo que contribuyó al rescate del diagnóstico y la pesquisa de la enfermedad en el país (10).

Durante los últimos tres años el número de sueros recibidos en el LNREB ha aumentado significati-vamente. Este hecho ha provocado, en ocasiones, el agotamiento del antígeno FAB y, por ende, el atra-so en la confirmación de la infección de los sueros que se estudian. En particular la prueba semicuantitativa del FAB es un proceder técnico que requiere mucho tiempo, resulta fatigoso para el laboratorista y en el que se rompen con facilidad los tubos de cristal que en él se emplean. Además, consume, por determinación, elevados volúmenes de solución salina (7,9 ml), suero del paciente (100 µl) y suspensión bacteriana (350 µl), lo cual determina que por cada estuche o kit solo se puedan estudiar 80 sueros (11).

Tomando este antecedente en consideración se decide diseñar y validar una microtécnica basada en el fundamento del FAB comercial semicuantitativo, usando placas de microtitulación de fondo U, que

permita el estudio de un mayor número de sueros por estuche, la reducción, por determinación, de los recursos (incluyendo el reactivo) y que se agilice la labor del personal de laboratorio. Para lograr lo expuesto nos trazamos los siguientes objetivos:

1. Validar la microtécnica del FAB semicuantitativo, para la detección de anticuerpos contra *Brucella*, utilizando sueros negativos y positivos a brucelosis e infecciones víricas y parasitarias.
2. Aplicar la microtécnica del FAB y el sistema comercial del FAB, en sueros de casos sospechosos de brucelosis.
3. Estimar los costos económicos de la microtécnica del FAB para el nivel terciario de salud.

II. MÉTODO

A. Diseño de la investigación y sitio de estudio

Se realizó un estudio de corte transversal para validar y estimar los costos económicos parciales de la microtécnica del FAB, que se utiliza para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. La investigación se efectuó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas (LNREB) del IPK, entre enero y junio de 2017.

B. Universo de estudio y muestras

El universo de estudio quedó constituido por todos los sueros que se recibieron en el LNREB para vigilancia de la brucelosis humana entre enero y junio de 2017, y por los pertenecientes a las serotecas de los laboratorios del Centro de Diagnóstico, Referencia e Investigación del IPK. Las muestras que se emplearon en esta investigación fueron divididas en grupos. Grupo I: siete sueros controles de la seroteca del LNREB del IPK, con títulos conocidos y obtenidos por la técnica semicuantitativa en tubos del FAB, de ellos dos eran negativos (sin título) y cinco seropositivos con títulos de 20, 40 (reactivo), 80 (sospechoso), 160 y 320 (positivo), respectivamente (objetivo 1). Grupo II: 50 sueros que procedían de la seroteca del LNREB positivos a brucelosis humana por las técnicas serológicas de FAB comercial, ELISA-IgM y ELISA- IgG (objetivo 1). Grupo III: 100 sueros de pacientes negativos a brucelosis humana por las técnicas mencionadas con anterioridad [50 de donantes de sangre aparentemente sanos y 50 de individuos con patologías infecciosas cuyos agentes etiológicos pueden cruzar antigénicamente con *Brucella* spp. (*Leptospira* spp. (10), *Toxoplasma gondii* (10), *Virus de Hepatitis B* (10) y *C* (7), *Citomegalovirus* (10) y *Virus Epstein Barr* (3))] (objetivo 1). Grupo IV: 486 sueros recibidos en el LNREB para diagnóstico y referencia, entre marzo y junio de 2017 (objetivo 2). Para complementar el objetivo 3 se utilizaron, en particular, los 182 sueros que se recibieron en el laboratorio para diagnóstico durante los meses de marzo y abril de 2017.

C. Técnicas y procedimientos

Con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos anti-brucelas se emplearon el estuche comercial FAB y los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG para *Brucella*. En cada caso se procedió según las indicaciones del fabricante (10, 12).

C.1. Normalización de la microtécnica del FAB utilizando sueros controles

Para la normalización de la microtécnica en placa del FAB se realizaron modificaciones a la metodología descrita para la prueba semicuantitativa del FAB de la firma comercial DIESSE con referencia 21212/CUB. Se disminuyeron en su décima parte los volúmenes de solución salina (SS), suero y suspensión bacteriana propuestos. Se emplearon placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo U. Los materiales utilizados fueron puntas (de 5 a 200 μ l), pipeta semiautomática (2 a 20 μ l) y pipeta semiautomática multicanal (5 a 200 μ l). Los ensayos se realizaron con los sueros del grupo I y se prosiguió como sigue: se añadieron 190 μ l de SS en el primer pocillo y 100 μ l en los restantes seis pocillos. Luego se colocaron 10 μ l de suero del paciente en el primer pocillo y tomando 100 μ l, se realizaron diluciones seriadas y al doble, de modo que el suero del paciente quedara diluido desde 1:20 hasta 1:1280. Finalmente se adicionaron 5 μ l de la suspensión bacteriana, se cubrieron las placas con nylon y se colocaron en incubación con atmósfera húmeda, a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente se realizó la lectura visual, esperando encontrar formación de la malla de aglutinación según las diluciones que tenían los sueros positivos, y el punto de sedimentación o botón en los sueros negativos.

Se esperó encontrar un 100% de concordancia entre los títulos conocidos de los sueros controles y los resultados obtenidos por la microtécnica. Además, para establecer la precisión intra e inter-ensayo se trabajó cada una de las muestras por triplicado, bajo las mismas condiciones y en días alternos, esperando obtener los mismos resultados en el 100% de las repeticiones.

C.2. Evaluación de la microtécnica del FAB

Para calcular los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnósticas de la microtécnica del FAB, se utilizaron las muestras de sueros de los grupos II y III. Se tomaron como pruebas de referencia los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG *Brucella*.

C.3. Aplicación de la microtécnica del FAB

A los sueros del grupo IV, reactivos a la prueba cualitativa del FAB, se les aplicó la microtécnica en placa del FAB y la metodología de la prueba semicuantitativa en tubos descrita por el fabricante (10), para luego comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas. Debido a las posibles diferencias entre la microtécnica y el FAB comercial, en cuanto a soporte y volúmenes, se admitieron variaciones en ± 1 dilución entre los resultados de ambas técnicas. La interpretación de los resultados de las dos pruebas se realizó como sigue: títulos de 20 y 40 fueron considerados como reactivos, títulos de 80 como sospechosos, y títulos iguales o superiores de 160 como positivos.

D. Costos: recolección y clasificación

El análisis de costos se realizó desde la perspectiva del LNREB. Se estimaron los costos de las tres actividades para completar el diagnóstico: recepción de las muestras, ejecución de la prueba cualitativa FAB y la realización de la microtécnica del FAB. Los datos para realizar el cálculo de los costos directos se recolectaron por microcosteo, a través de la técnica de informantes claves para describir la ficha del proceso. La información sobre la recepción de la muestra en el IPK y el traslado al LNREB, así como de la ejecución del FAB cualitativo, semicuantitativo en tubo y de la microtécnica se obtuvo a partir de dos encuestas descriptivas diseñadas al efecto. Por otra parte, los costos indirectos se tomaron como

el 49% de los costos directos del LNREB, a partir de la información del Departamento de Contabilidad del IPK.

E. Análisis de los datos

La información que se obtuvo en esta investigación se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel (Microsoft Office), y para su análisis se utilizaron el paquete estadístico EPIDAT 3.1. y el ADD-IN de EXCEL@Risk. Se calcularon los porcentajes de sensibilidad y especificidad diagnósticas, así como el índice de concordancia o validez entre la metodología propuesta y la convencional, estimándose un intervalo de confianza (IC) del 95% y un valor de $p \leq 0,05$. Para el cálculo de la media de los costos en cada diagnóstico que se realizó por la microtécnica o el FAB convencional se aplicó una simulación Monte Carlo para cada variable “inputs” (ej: tiempo que el técnico utiliza para realizar una determinación). Todos los costos fueron expresados en CUP utilizando, para aquellos productos que son importados, la tasa oficial de cambio de 1USD= 24 CUP.

III. RESULTADOS

A. Validación de la microtécnica del FAB para la detección de anticuerpos contra antígenos de Brucella.

Para la utilización de la microtécnica del FAB propuesta en esta investigación se normalizaron las cantidades de reactivos, soluciones, suero del paciente y el protocolo (marcha técnica) a utilizar en la realización de la misma. Esta técnica permite la detección de anticuerpos anti-brucelas que pueden estar presentes en el suero de individuos con brucelosis humana (10).

Al aplicar la microtécnica a los sueros controles que conformaron el grupo I de las muestras de trabajo, existió total concordancia entre los resultados obtenidos y los títulos conocidos, por lo que la exactitud fue del 100%. Los mismos resultados se obtuvieron en cada una de las repeticiones realizadas al trabajar cada una de las muestras por triplicado en días alternos, obteniéndose un 100% de precisión y quedando demostrada la repetibilidad del ensayo.

Para la evaluación de la microtécnica del FAB se emplearon como técnicas de referencia los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG Brucella, porque se consideran de elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de brucelosis humana (12, 13). No se utilizó el cultivo por falta de la infraestructura necesaria en el LNREB-IPK para el manejo de aislados de este microorganismo. De los 50 sueros positivos a brucelosis humana (grupo II), 49 resultaron positivos por la microtécnica de FAB. Solo uno de ellos no presentó anticuerpos contra brucelas en ninguna de las siete diluciones efectuadas. Al mismo tiempo, los 100 sueros del grupo III (negativos a brucelosis humana) resultaron negativos por la microtécnica del FAB (ver figura 1).

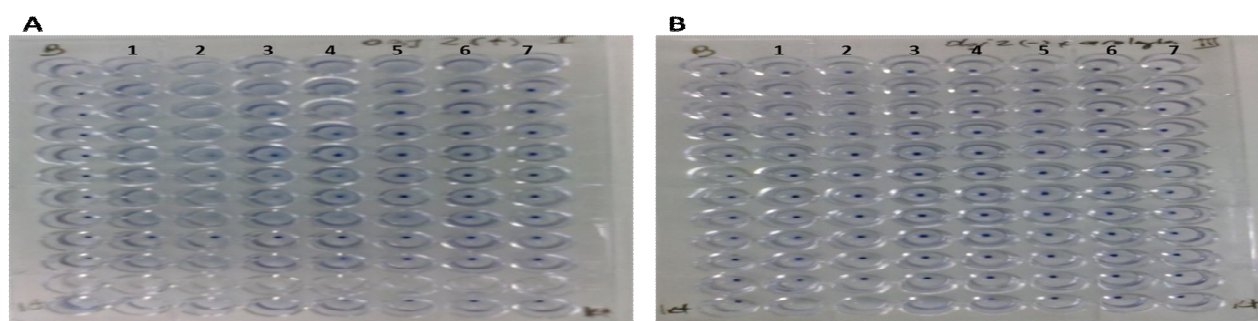


Figura 1. A: Reacciones de aglutinación de los sueros del grupo II en placas de 96 pocillos y fondo U. B: Reacciones de aglutinación de los sueros del grupo III en placas de 96 pocillos y fondo U. Leyenda: B blanco (control negativo); Línea 1 – 7: diluciones de los sueros desde 1: 20 hasta 1: 1280; K+: control positivo.

A partir de los resultados obtenidos se calcularon los indicadores de desempeño de la microtécnica de FAB, resultando que la sensibilidad diagnóstica fue de 98,0%, la especificidad del 100% (0/100), el índice de validez del 99,33%, el índice de Youden de 0,98 y los valores predictivos positivo y negativo del 100% y el 99,01%, respectivamente. Estos resultados corroboran la capacidad de este sistema para detectar anticuerpos contra brucelas en muestras de suero, e indican que la técnica propuesta es confiable para clasificar como enfermos o sanos a individuos con sospecha de la enfermedad (14).

B. Aplicación de la microtécnica del FAB y el sistema comercial del FAB, en sueros de casos sospechosos de brucelosis.

De 486 sueros recibidos en el LNRB para diagnóstico y referencia de brucelosis humana en el periodo comprendido entre marzo y junio de 2017, el 62% (282/486) resultó positivo mediante la prueba cualitativa (en tarjeta) del FAB. La tabla 1 muestra la concordancia obtenida (en ± 1 dilución seriada y al doble) entre los resultados por la microtécnica y la prueba semicuantitativa en tubos del FAB, cuando se estudiaron los 282 sueros reactivos en tarjeta. Nótese que de manera general existió coincidencia en el 96,8% de los títulos (273/282) y que las discrepancias ocurrieron en las diluciones desde 1:20 hasta 1:160, destacando la dilución 1:80 (93,97%).

Tabla 1. Coincidencia entre los títulos de los sueros de casos sospechosos de brucelosis humana, obtenidos por la prueba semicuantitativa del FAB comercial y por la microtécnica de FAB.

FAB en tubos (títulos)	FAB en placas de fondo U (títulos)										Total	Coincidencia en ± 1 dil. n/N (%)
	NR	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
NR	2	1									3	3/3 (100)
20	1	28	14	1	1						45	43/45 (95,6)
40	2	16	46	24							88	86/88 (97,8)
80		4	27	39	12						82	78/82 (93,9)
160			1	23	17	6					46	46/47 (97,9)
320					6	2	1				9	9/9 (100)
640						1	1	2			4	4/4 (100)
1280									2		2	2/2 (100)
2560									1		1	1/1 (100)
5120										1	1	1/1 (100)
Total	5	49	88	87	36	9	2	2	3	1	282	273/282 (100)

Fuente: Registros del LNREB del IPK. **Leyenda:** NR: no reactivo; %: porcentaje; n: número de sueros coincidentes; N= total de sueros.

El título de anticuerpos semicuantificados, permite la agrupación de los resultados por categorías. En consecuencia, se consideran reactivos los títulos de 20 y 40, sospechosos los títulos de 80 y con valor diagnóstico los títulos iguales o superiores de 160 (10). El análisis y las comparaciones de los resultados de las muestras, al emplear la prueba semicuantitativa del FAB y la microtécnica del FAB se realizó a partir de la clasificación de las muestras en las categorías explicadas. Como se muestra en la tabla 2, las mayores discrepancias, aunque solo en un 3,8%, se obtuvieron en la clasificación de los sueros positivos, con un 22,6% (64/282) en la prueba semicuantitativa en tubos, y un 18,8% (53/282) en la microtécnica de FAB.

Tabla 2. Clasificación de los sueros del grupo III, según los títulos de anticuerpos, por la prueba semicuantitativa en tubo de FAB y por la microtécnica de FAB.

Categorías (títulos)	Prueba semicuantitativa del FAB comercial n/N (%)	Microtécnica del FAB n/N (%)
No reactivas	3/282 (1,1)	5/282 (1,8)
Reactivas (a)	133/282 (47,2)	137/282 (48,6)
Sospechosas(b)	82/282 (29,1)	87/282 (30,8)
Positivas(c)	64/282 (22,6)	53/282 (18,8)

Fuente: Registros del LNREB del IPK

Leyenda: (a): títulos entre 20-40, (b): título de 80, (c): título ≥ 160 ; n: total de sueros; %: porcentaje; N= 282.

La estimación de la concordancia entre los resultados que se obtuvieron por el FAB comercial y la microtécnica de FAB, se realizó mediante el índice de Kappa y para su interpretación cualitativa se utilizó la propuesta de Landis y Koch (15). De las 282 muestras que resultaron reactivas en tarjeta, 218 fueron clasificadas como negativas y 53 como positivas por ambas pruebas, mientras que 11 positivas por la prueba semicuantitativa en tubo resultaron negativas por la microtécnica de FAB. Al realizar el análisis estadístico utilizando el índice de Kappa, se obtuvo un valor de 0,8816 con un rango 0,8136 – 0,9497 para un intervalo de confianza del 95%. Este valor permite considerar como muy buena la concordancia existente entre los resultados obtenidos por las dos pruebas analizadas.

D. Estimación de los costos económicos de la microtécnica de FAB para el nivel terciario de salud

La media del costo total para la microtécnica del FAB fue de 617,69 CUP, con un mínimo de 616,85 CUP, un máximo de 618,44 CUP y una desviación estándar de 0,52 CUP; mientras que para la prueba semicuantitativa en tubo fue de 654,92 CUP con un mínimo de 654,01 CUP, un máximo de 655,53 CUP y una desviación estándar de 0,5 CUP. Estos resultados ponen en evidencia que la microtécnica además de permitir estudiar un mayor número de sueros por estuche y reducir el tiempo de ejecución de la técnica, tiene un coste más económico en las condiciones actuales. No obstante, resalta que la diferencia entre el costo de ambas pruebas es de 37,23 CUP, hallazgo que tiene su respuesta en el análisis de sus respectivos costos medios por actividad y en particular en el costo del antígeno por determinación que es el elemento contable que varía de 28,21 CUP para la prueba semicuantitativa en tubo a 3,22 CUP para la microtécnica.

IV. CONCLUSIONES

Podemos concluir que la microtécnica del FAB propuesta en esta investigación detecta anticuerpos totales contra *Brucella*, con gran precisión, exactitud, y adecuados indicadores de desempeño con relación a los métodos confirmatorios. Asimismo, se constató que los resultados que arroja tienen muy buena concordancia con los obtenidos por el FAB disponible y que su costo económico, para el nivel terciario de salud, es inferior al de este último. Los elementos expuestos sugieren que resultaría adecuada su incorporación al algoritmo serológico de laboratorio para el diagnóstico y la pesquisa de la brucelosis humana en nuestro medio.

REFERENCIAS

1. Méndez M, Rodríguez EJ, Sánchez LM, Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Pública Mex.* 2015; 57:519-27.
2. Rahman A. Epidemiology of brucellosis in humans and domestic ruminants in Bangladesh. [Dissertation]. Liege (Bélgica): University of Liege. Faculty of Veterinary Medicine; 2015.
3. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (4): e950.
4. Dean AS, Crump L, Greter H, Hattendorf J, Schelling E, Zinsstag J. Clinical manifestations of human brucellosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6 (12): e1929.
5. Razzaq MS, AlSaadi MA. Molecular Study of virulence genes of *Brucella* isolated from human clinical cases in Babylon Province. *J Babylon Univ.* 2014; 22 (5): 1531-44.
6. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 (1): 12-7.
7. Pabuccuoglu O, Ecemis T, El S, Coskun A, Akcali S, Sanlidag T. Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Jpn J Infect Dis.* 2011; 64(4):272-6.
8. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2013; 32 (1): 177-88.
9. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Dirección de Registros médicos y estadísticas de salud. Sistema de información estadística. Enfermedades de declaración obligatoria. 2013.
10. Obregón AM, Muñoz K, Echevarría E, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdés Y, Baly A, Toledo M. Evaluación del sistema serológico Febrile Antigen *Brucella* para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. *Rev Cub Med Trop.* 2015; 67 (3): 92-3.
11. DIESSE, Diagnostica Senese SpA. Italia. *Febrile Antigen Brucella*. Disponible en: www.diesse.com.
12. VIRCELL, SL. España. *Brucella ELISA IgM. Brucella ELISA IgG*. Disponible en: www.vircell.com.
13. Bashiri H, Sayad B, Madani SH. Study of the Assimilation Rate of Immunoenzymatic Tests and Traditional Serological Methods in the Diagnosis of Human Brucellosis. *Jundishapur J Microbiol.* 2013; 6(4): e4828. DOI: 10.5812/jjm.4828
14. Camaró ML, Martínez R, Olmos P, Catalá V, Ocete MD, Gimeno C, et al. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(7): e31–e36.
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 Mar; 33:159-74.