

EVALUACIÓN RÁPIDA DE RIESGO

Enfermedad por Virus Borna

10 de mayo 2018

Resumen de la situación y conclusiones

Recientemente Alemania ha detectado siete casos de encefalitis aguda asociados con el virus de Borna, seis de los cuales fallecieron. Tres casos eran receptores de órganos sólidos procedentes de un único donante. En el donante se detectaron anticuerpos frente al virus a títulos bajos pero no tuvo síntomas de encefalitis. También se desconoce el modo en el que se infectaron los otros cuatro casos. Aunque todos vivían en el sur de Alemania no se encontró ninguna relación entre ellos.

El virus Borna es un patógeno animal que puede infectar a una gran variedad de vertebrados. Sólo se han identificado casos humanos asociados a virus de Borna de mamíferos. En estos animales, la infección cursa generalmente de forma asintomática, pero puede causar desde manifestaciones neurológicas leves hasta meningoencefalitis aguda o subaguda grave que puede evolucionar a la muerte. La vía de transmisión probable es respiratoria por inhalación del virus eliminado por la orina, heces y otros fluidos de animales infectados. Los reservorios principales son los mamíferos de pequeño tamaño como las musarañas, los roedores y los topillos. Las áreas consideradas endémicas en Europa son Alemania oriental y meridional, la parte oriental de Suiza, Liechtenstein y Austria. El único estudio que se ha podido identificar hasta la fecha en España en mamíferos (caballos) encontró una prevalencia de anticuerpos de alrededor del 30% en 2011-13.

En humanos, la enfermedad por virus Borna se ha notificado generalmente de forma esporádica, causando cuadros de encefalitis con una alta letalidad. También se ha relacionado esta infección con trastornos psiquiátricos, aunque la asociación es controvertida. La presencia de anticuerpos en población general, hace suponer que en muchos casos la enfermedad es asintomática. La transmisión en los casos descritos asociados a brotes (todos en Alemania) ha sido por contacto con ardillas infectadas en un brote de 3 casos ocurrido entre 2011 y 2013, en el contexto de tres trasplantes de órganos sólidos de un mismo donante en 2017, y en otros casos desconocida. En España no se ha notificado ningún caso.

Con la evidencia disponible, se considera que el riesgo asociado al virus Borna es muy bajo para la población general española incluidos los receptores de órganos y personas en estrecho contacto con animales, aunque no se puede descartar que aparezca algún caso esporádico de esta enfermedad.

Justificación de la evaluación de riesgo

Alemania ha notificado recientemente siete casos humanos de encefalitis aguda asociada a una infección por virus de Borna (VB). La infección de tres de los casos corresponde a un grupo de receptores de órganos sólidos de un único donante, dos receptores de riñón y uno de hígado. Los tres casos tuvieron una afectación grave, dos de ellos fallecieron. El donante falleció sin evidencia de que presentase síntomas de la enfermedad, aunque se pudo identificar anticuerpos frente a VB en una muestra de suero. Los otros cuatro casos no tenían relación con los anteriores y también cursaron con una encefalitis fatal.

No hay mucha literatura sobre virus Borna, no es una enfermedad de declaración obligatoria en España ni en Europa, ni en animales ni en humanos. Hay muy pocos datos para valorar la presencia del virus Borna en nuestro país, pero existen estudios que indican la infección en caballos. La detección de anticuerpos contra el virus Borna en humanos se ha relacionado con enfermedades psiquiátricas, aunque hasta el momento no se ha podido demostrar la causalidad. El virus, también se ha encontrado en un 10-15% de encefalitis no filiadas en estudios realizados en China.

Tras la notificación del agrupamiento de casos en Alemania y ante la gravedad de la enfermedad con sospecha de transmisión mediante trasplante de órgano sólido y la falta de conocimiento y de preparación para el diagnóstico de este virus en el contexto clínico, se considera necesario realizar una evaluación rápida del riesgo en España y de las posibles medidas preventivas en salud pública.

Equipo CCAES y expertos consultados

Equipo CCAES en orden alfabético:

Adrian Hugo Aginagalde Llorente¹, Claudia Brugarolas Brufau¹, Sonia Fernández Balbuena², Lucía García San Miguel², Inmaculada López Carrillo¹, Rocío Palmera Suárez², M^a José Sierra Moro, Fernando Simón Soria y Berta Suárez Rodríguez.

¹Médico Interno Residente de Medicina Preventiva y Salud Pública.

²Técnico superior de apoyo, contratada por Tragsatec a través de encomienda del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Otros expertos y filiación:

Luis J. Romero. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad.

Fátima Cruz López. Jefe del Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina SEVISEQ. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. Universidad Complutense de Madrid.

Paz Sánchez-Seco. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid.

Rosa Cano. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid

Rosario Marazuela. Organización Nacional de Trasplantes. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Información del evento

Descripción epidemiológica

Alemania notificó el 8 de marzo de 2018, a través del Sistema Europeo de Alerta Precoz y Respuesta (EWRS por sus siglas en inglés), cuatro casos de encefalitis aguda en humanos asociada al Virus de la Enfermedad de Borna de la especie de mamíferos-1 (VB-1). Los tres primeros casos pertenecen a un grupo de receptores de órganos sólidos (los dos riñones y el hígado) de un único donante del sur de Alemania. Aproximadamente 100 días después de recibir los trasplantes, los tres receptores desarrollaron una encefalitis grave. Todos estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor. Los dos receptores de los riñones fallecieron aproximadamente 200 días después del trasplante. El receptor del hígado sobrevivió pero presentó atrofia degenerativa del nervio óptico como secuela. No hubo más receptores de órganos de este donante. El donante y los pacientes receptores vivían y fueron atendidos en diferentes ciudades/estados y no se pudo identificar ninguna otra fuente común de infección, si bien con la información disponible no puede descartarse que adquieran el virus por otra vía. El cuarto caso, no asociado a trasplante, desarrolló encefalitis grave y también falleció. Este caso no estaba vinculado al resto, excepto porque vivía en el sur de Alemania, al igual que el donante.

En una información posterior, el punto focal del EWRS de Alemania ha informado sobre tres casos adicionales de encefalitis mortal en tres personas del estado de Baviera, con residencia en distritos diferentes. Se trata de dos mujeres de 35 y 19 años y un varón de 25 años. La mujer de 35 años estaba inmunodeprimida y los otros dos no. Hasta el momento no se ha podido identificar la vía de transmisión.

El único antecedente conocido de brote de enfermedad en humanos es uno ocurrido en el estado de Sajonia-Anhalt, en el norte de Alemania, con tres casos que iniciaron síntomas entre 2011 y 2013. Los tres casos eran criadores de ardillas variegadas (*Sciurus variegatoides*) y entre ellos habían intercambiado algunos ejemplares. En las pruebas realizadas en muestras cerebrales de los tres casos humanos, se identificaron secuencias de genes del virus de la enfermedad de Borna de un serogrupo diferente al VB-1 (virus 1 de ardillas variegadas; especie Bornavirus 2 de mamíferos) que también fue detectado en el tejido cerebral de las ardillas (1).

Investigación microbiológica

La investigación microbiológica en las muestras del grupo de receptores de órganos sólidos, confirmó la presencia del genoma y de un antígeno específico del VB-1 mediante RT-qPCR, secuenciación de última generación, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en los dos receptores de riñón. En todos ellos se observó seroconversión específica de VB-1 con altos títulos de anticuerpos.

Según informó el punto focal del EWRS de Alemania, en el suero del donante se pudo identificar anticuerpos frente a VB-1 a títulos bajos.

Información sobre la enfermedad y el virus

Virus de la enfermedad de Borna

Los virus de la enfermedad de Borna (VB) son virus con ARN monocatenario de sentido negativo. Pertenecen a la familia *Bornaviridae* dentro del orden de Mononegavirales.

El género *Bornavirus* incluye ocho especies y 16 virus, según la última taxonomía aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus. Cinco especies incluyen 12 bornavirus aviares, una especie incluye un virus de reptil y dos especies incluyen tres virus de mamífero. En la especie de mamífero-1 hay dos virus: virus de la enfermedad de Borna 1 y 2 (VB-1 y VB-2); en la especie de mamífero-2 hay un único virus: el bornavirus de ardilla variegata-1 (BAV-1) (2).

Infección por el virus de la enfermedad de Borna en animales

La infección por el virus de la enfermedad de Borna se describió por primera vez en el siglo XVIII en animales y después, en el siglo XIX, se produjo un brote de enfermedad neurológica mortal en la ciudad alemana de Borna, de la que el virus recibió el nombre. El VB puede infectar a una gran variedad de vertebrados, incluidos monos rhesus, caballos, ovejas, vacas, cabras, conejos, ciervos, llamas, alpacas, gatos, ratas, ratones, musarañas, jerbos, perros y avestruces. Además, se han descrito bornavirus aviares en aves psitácidas, gansos canadienses, cisnes mudos y canarios (3).

En mamíferos el curso es generalmente asintomático, causando enfermedad en el 20% de los caballos y 40% de las ovejas. En los animales que tienen manifestaciones clínicas causa cuadros neurológicos de distinta gravedad que abarcan un espectro amplio desde cambios en el comportamiento del animal hasta encefalitis grave con una mortalidad del 60-80% a las 5 semanas (3).

En estudios experimentales en ratas se ha logrado transmitir la infección por vía intranasal, intracerebral, intramuscular, subcutánea y transdérmica. Sin embargo, la vía oral y la intravenosa no han demostrado ser eficaces. Existe evidencia de que la ruta axonal es la principal vía de diseminación del virus en el animal (4). También se ha demostrado de forma experimental que la transmisión vertical es posible en ratones infectados (5). Las vías de transmisión natural de la infección no se conocen en detalle, aunque se sugiere que pudiera ser a través por vía olfatoria, desde donde se diseminaría desde el epitelio olfatorio al encéfalo, a través de los nervios periféricos. Los animales infectados, en especial los roedores, excretan numerosos virus en la orina, heces y otros fluidos, favoreciendo contacto con el virus de otros animales por vía olfatoria (3).

El principal reservorio conocido son mamíferos de pequeño tamaño como las musarañas, los roedores y los topillos. Así por ejemplo, en un estudio se ha visto que los gatos que cazan roedores tienen un riesgo siete veces mayor de infección que los que únicamente conviven con otros gatos que han tenido infección demostrada por presencia de anticuerpos. Además, en los animales de granjas en las que no se realiza control de roedores, se ha detectado mayor seroprevalencia de anticuerpos específicos que en las que sí se realizan acciones de control (3).

El periodo de incubación de la enfermedad en animales es largo. Tras la infección natural los casos aparecen a los 2 o 3 meses, aunque experimentalmente se ha observado un periodo de incubación de hasta 143 días en caballos. Experimentalmente se ha demostrado que el periodo de incubación varía según el lugar de inoculación del virus, siendo mayor cuanto más distante del encéfalo está el punto de entrada (3,4).

La presencia del virus en animales se ha descrito en Europa central y septentrional, Japón, Australia y los Estados Unidos. Las áreas consideradas endémicas dentro de Europa central son Alemania oriental y meridional, la parte oriental de Suiza, Liechtenstein y Austria (3).

Infección por el virus de la enfermedad de Borna en humanos

Hay estudios que asocian la presencia del virus o de anticuerpos frente a él, detectados mediante técnicas de PCR o serológicas, en personas con alteraciones psiquiátricas como la depresión, alteraciones bipolares o esquizofrenia o con alteraciones neurológicas como la esclerosis múltiple, afectación de motoneuronas o tumores cerebrales, sin que se haya podido demostrar claramente una relación de causalidad. El tratamiento con amantadina ha producido una mejora en la clínica psiquiátrica junto con un descenso de los marcadores virales en algunos ensayos (6,7).

De acuerdo con la literatura científica, entre el 37 y el 60% de las encefalitis en todo el mundo no llegan a filiarse (8–10). En cuatro estudios realizados en China en líquido cefalorraquídeo o suero de pacientes con encefalitis virales no filiadas, se detectó mediante técnicas moleculares la presencia del VB en un 10-15% de los casos frente a 0% en los controles sanos (11–14). La presencia de anticuerpos frente al VB en la población general indica que la infección puede cursar de forma asintomática (15). En una revisión sistemática de estudios sobre la infección del VB realizados en distintos lugares del mundo, se encontró en donantes de sangre una seroprevalencia de 1-5% y presencia del virus del 0-7% (16).

Los casos humanos asociados a los brotes descritos en la información epidemiológica del evento presentaron cuadros que comenzaron con fiebre, tiritona, astenia, anorexia, estreñimiento, dolor abdominal, entumecimiento anogenital, disuria, fenómenos trombóticos (trombosis femoral y tromboembolismo pulmonar), alteraciones del comportamiento, enlentecimiento, vértigo, cefalea e inestabilidad de la marcha. La enfermedad progresó a una encefalitis mortal en seis de los siete casos (letalidad 86 %). El único caso superviviente tuvo como secuela una neuritis óptica degenerativa (1,17).

La transmisión interhumana hasta el momento sólo se ha podido sospechar en los casos recientemente notificados por Alemania asociados a VB-1 en los que cabe suponer que la fuente de infección tuviera que ver con la recepción de órganos sólidos.

En el brote asociado al VB de mamífero 2 por el BAV-1, la transmisión pudo ocurrir a partir del contacto con ardillas infectadas que habían producido excoriaciones en la piel de los casos, por mordeduras y arañazos.

El periodo de incubación en humanos ha sido de 100 días en el brote de VB-1 asociado al trasplante y no se conoce en el brote de BAV-1 asociado a las ardillas. Se desconoce si la infección proporciona algún tipo de inmunidad duradera.

Evaluación del riesgo para España

Probabilidad de transmisión

La enfermedad por virus Borna no es una enfermedad de declaración obligatoria en España ni en Europa, en animales ni humanos. No se realiza monitorización de este virus en animales en nuestro país y hay escasos estudios para valorar la prevalencia e incidencia real de la infección y la enfermedad en España. Recientemente, el Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina (VISAVET, Universidad Complutense de Madrid) ha realizado un estudio con el objetivo de investigar posible evidencia serológica de infección por VB en caballos y determinar los factores de riesgo para la transmisión. En dicho estudio se recogieron muestras de suero de 500 caballos: 260 de caballos seleccionados para análisis previos a la exportación y 240 de caballos pura sangre recolectadas entre septiembre de 2011 y noviembre de 2013 en 35 cuadras en la zona central de la península ibérica. La prevalencia de anticuerpos contra VB-1 en estas muestras, analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta, fue del 33% y del 35% en caballos de exportación y de pura sangre, respectivamente. Por otra parte, en cuatro caballos del suroeste peninsular con clínica neurológica en los que se descartaron otras causas comunes de enfermedad equina (rinoneumonitis equina y fiebre del Nilo Occidental), se detectó una clara seroconversión al VB. Estos resultados apuntan a la existencia de la circulación del virus en nuestro país (datos no publicados del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid).

Por otra parte, en España también se han podido detectar, en aves, especies de VB aviar, que hasta el momento no se han relacionado con la patología humana (18).

La musaraña gris (*Crocidura russula*), uno de los reservorios propuestos para el VB-1, tiene una amplia distribución en España. La ardilla variegada no existe en España, pero sí la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), con una amplia distribución dentro de la Península Ibérica.

Hasta la fecha de este informe no se ha diagnosticado enfermedad por VB en humanos ni se ha podido identificar ningún estudio de prevalencia de anticuerpos en población humana en España.

Los datos de la presencia del virus en nuestro país son muy escasos, y en la única población de mamíferos en la que se ha estudiado, los caballos, se han identificado anticuerpos contra el VB-1. Aunque no se tienen evidencias de la transmisión del virus desde los caballos al ser humano, en un estudio realizado en Japón se evidenció una mayor seroprevalencia en donantes de sangre residentes en áreas donde se concentran el mayor número de cuadras de caballos frente a otras áreas (19). Hasta el momento, sólo se ha constatado la transmisión a partir de animales por el contacto directo con ardillas, sin que se haya identificado la notificación de ningún caso por contacto con otros animales en el mundo (1).

El evento notificado por Alemania a través del Sistema Europeo de Alerta Precoz y Respuesta pone en evidencia, por vez primera en el mundo, la sospecha de transmisión a través del trasplante de órganos de hígado y riñón. En España se realizan más de 5.000 trasplantes de órganos sólidos al año. Como ocurre con muchos otros patógenos, la ausencia de casos hasta el momento de infección por virus Borna además de la falta de disponibilidad de la prueba diagnóstica, explica que su detección no esté incluida entre las pruebas a realizar como requisito previo al trasplante (20,21). En cualquier caso, la información se ha distribuido a través de la red española de coordinación de trasplantes con objeto de se conozca la sospecha de transmisión.

De forma experimental no se ha podido demostrar la transmisión del virus mediante la inoculación en sangre en animales, lo que iría en contra de la hipótesis de transmisión por transfusión de sangre o hemoderivados (4).

La información disponible indica que el virus Borna está presente en España, sin embargo considerando la incertidumbre alrededor de los mecanismos de transmisión y la poblaciones de animales entre las que se ha identificado infección reciente o pasada, se puede considerar que la transmisión del virus tendría muy baja probabilidad para la población general, así como para los receptores de trasplantes y las personas en contacto con animales, si bien no puede descartarse que aparezca algún caso esporádico.

Impacto en la población

Aunque parece que en la mayoría de los casos la infección cursa de forma asintomática, la enfermedad por VB en los diez casos humanos conocidos ha sido muy grave produciendo cuadros letales en nueve de ellos, tres de los cuales estaban inmunodeprimidos.

Debido al desconocimiento acerca de la epidemiología y clínica de esta enfermedad, y que no existen suficientes medios para el diagnóstico en el entorno clínico, muchas infecciones por VB podrían pasar desapercibidas.

Teniendo en cuenta la información disponible, el impacto de la enfermedad en la población se considera bajo.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

La información disponible indica que el virus Borna podría estar circulando en España, aunque la enfermedad en humanos nunca se ha diagnosticado en nuestro país.

Los mecanismos de transmisión a humanos conocidos hasta la fecha son por contacto estrecho con animales infectados y también se han descrito casos probablemente asociados a trasplante de órganos. Los reservorios, riesgos y mecanismos de transmisión no están bien definidos y de momento no hay técnicas disponibles para el diagnóstico en el entorno clínico, ni se han establecido medidas de control. Para realizar una evaluación más precisa del riesgo asociado al virus Borna es necesario disponer de más evidencia científica sobre las rutas de transmisión zoonóticas e interhumanas.

En la actualidad, y de acuerdo con la evidencia disponible, se considera que el riesgo asociado al virus Borna es muy bajo para la población general, si bien no puede descartarse que se detecte algún caso esporádico de esta enfermedad.

Recomendaciones

Dada la escasa información científica disponible sobre la enfermedad y el posible riesgo asociado a este virus, la prevalencia de infección por virus Borna en poblaciones animales y humanas y los mecanismos y vías de transmisión a humanos desde el reservorio animal deberían considerarse entre las líneas de investigación en salud.

Dado que existen indicios de que el virus Borna puede causar encefalitis graves y que circula en nuestro país, se debe desarrollar la capacidad diagnóstica para este virus en humanos.

Referencias

1. Hoffmann B, Tappe D, Höper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, et al. A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 2015 Jul 9;373(2):154–62.
2. Amarasinghe GK, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Beer M, Bejerman N, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Arch. Virol.* 2017 Aug;162(8):2493–504.
3. Kinnunen PM, Palva A, Vaheri A, Vapalahti O. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections. *J. Gen. Virol.* 2013 Feb;94(Pt 2):247–62.
4. Carbone KM, Duchala CS, Griffin JW, Kincaid AL, Narayan O. Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J. Virol.* 1987 Nov;61(11):3431–40.
5. Okamoto M, Hagiwara K, Kamitani W, Sako T, Hirayama K, Kirisawa R, et al. Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Arch. Virol.* 2003 Aug;148(8):1557–68.
6. Dietrich DE, Bode L. Human Borna disease virus-infection and its therapy in affective disorders. *APMIS Suppl.* 2008;(124):61–5.
7. Ferszt R, Kühl KP, Bode L, Severus EW, Winzer B, Berghöfer A, et al. Amantadine revisited: an open trial of amantadinesulfate treatment in chronically depressed patients with Borna disease virus infection. *Pharmacopsychiatry.* 1999 Jul;32(4):142–7.
8. Davison KL, Crowcroft NS, Ramsay ME, Brown DWG, Andrews NJ. Viral encephalitis in England, 1989-1998: what did we miss? *Emerging Infect. Dis.* 2003 Feb;9(2):234–40.
9. Kennedy PGE, Quan P-L, Lipkin WI. Viral Encephalitis of Unknown Cause: Current Perspective and Recent Advances. *Viruses.* 2017 06;9(6).
10. Granerod J, Tam CC, Crowcroft NS, Davies NWS, Borchert M, Thomas SL. Challenge of the unknown. A systematic review of acute encephalitis in non-outbreak situations. *Neurology.* 2010 Sep 7;75(10):924–32.
11. Wang Z, Xie P, Han Y-X, Zhan J. [Study on molecular epidemiology of Borna disease virus in Ningxia and vicinal regions]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2006 Jun;27(6):479–82.
12. Wang C, Xu P, Ge J, Guo Z. [Study on molecular epidemiology of Borna disease virus in Zunyi regions of Guizhou province]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2008 Dec;29(12):1213–6.
13. Li Q, Wang Z, Zhu D, Xu M, Chen X, Peng D, et al. Detection and analysis of Borna disease virus in Chinese patients with neurological disorders. *Eur. J. Neurol.* 2009 Mar;16(3):399–403.

14. Ma Y, Wang Z, Kong F, Zhang Y. [Research on the association between Borna disease virus infection and the viral encephalitis]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2009 Dec;30(12):1284–7.
15. Lipkin WI, Briese T, Hornig M. Borna disease virus - fact and fantasy. *Virus Res*. 2011 Dec;162(1-2):162–72.
16. Chalmers RM, Thomas DR, Salmon RL. Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM*. 2005 Apr;98(4):255–74.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Acute encephalitis associated with infection with Borna disease virus 1 – Germany, 2018. ECDC; 2018.
18. Heffels-Redmann U, Enderlein D, Herzog S, Herden C, Piepenbring A, Neumann D, et al. Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*. 2011 Aug 1;40(4):419–26.
19. Takahashi H, Nakaya T, Nakamura Y, Asahi S, Onishi Y, Ikebuchi K, et al. Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *J. Med. Virol*. 1997 Jul;52(3):330–5.
20. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1723/2012, de 28 de diciembre, por el que se regulan las actividades de obtención, utilización clínica y coordinación territorial de los órganos humanos destinados al trasplante y se establecen requisitos de calidad y seguridad.
21. Criterios de selección del donante de órganos respecto a la transmisión de infecciones. 2ª edición. [Internet]. 2004. Available from: <http://www.ont.es/infesp/DocumentosDeConsenso/infecciondonante.pdf>