

# ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM MULHERES COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E/OU CITOLOGICAS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) COM IDADE INFERIOR A 25 ANOS<sup>1</sup>

RHEINHEIMER, Andréia Carpenedo.<sup>2</sup>  
CORRÊA, Luana Murchie Moraes.<sup>3</sup>  
WASEM, Matheus Pedro.<sup>4</sup>  
HORVATH, Josana Aparecida Dranka.<sup>5</sup>  
GOMES, Douglas Soltau.<sup>6</sup>

## RESUMO

**Introdução:** *Chlamydia trachomatis* (CT) é a infecção bacteriana sexualmente transmissível mais comum no mundo. Pacientes infectadas pelo papilomavírus humano (HPV) têm maiores chances de possuírem outras doenças sexualmente transmissíveis, as quais também devem ser investigadas. **Objetivo:** Determinar a prevalência de CT em mulheres com idade inferior a 25 anos e que tenham manifestações clínicas e/ou citológicas do HPV. **Material e método:** Foram incluídas no estudo 185 mulheres com idade inferior a 25 anos, atendidas no Centro Especializado de Doenças Infecto-parasitárias (CEDIP), em Cascavel – PR. As pacientes deveriam ter diagnóstico clínico de condiloma acuminado em região genital, e/ou citopatológico de colo uterino com neoplasia intra-epitelial (NIC), e ter sido submetidas à pesquisa de CT por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em secreção endocervical colhida com swab estéril. **Resultados:** Das 185 pacientes do estudo, 180 (97,3%) apresentaram lesões condilomatosas à inspeção. Ao exame citopatológico, NIC I foi encontrada em 11 (5,94%), NIC II em 3 (1,62%) e nenhuma apresentou NIC III. Em 36 amostras de secreção endocervical foi encontrada a presença de CT, revelando prevalência de coinfeção de 19,5%. Em relação à idade da sexarca, 97,7% a relataram antes dos 19 anos e 45,2% tinham parceiro fixo. Das pacientes incluídas na pesquisa 48 eram gestantes, totalizando 25,9% das participantes. **Conclusão:** A prevalência de infecção por CT em mulheres com manifestações clínicas e/ou citológicas de HPV foi de 19,45%. Seu caráter assintomático e associação a diversas complicações demonstram a necessidade de discussão sobre estratégias de rastreamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Chamydia trachomatis*, papilomavírus humano, coinfeção, rastreio.

## ASSOCIATION OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* INFECTION IN WOMEN WITH CLINICAL AND/OR CYTOLOGICAL MANIFESTATIONS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) UNDER 25 YEARS OLD

## ABSTRACT

**Introduction:** *Chlamydia trachomatis* (CT) is the most common sexually bacterial infection transmitted in the world. Infected patients with human papillomavirus (HPV) have higher chances of having other sexually transmitted diseases, which should also be investigated. **Objective:** To determine the prevalence of CT in women under 25 and who have clinical and/or morphological manifestations of HPV. **Material and method:** In this study were included 185 women under 25 years old followed at Specialized Center of Infectious and Parasitic Diseases (CEDIP), in Cascavel – PR. Patients should have a clinical diagnosis of condyloma in the genital region and/or uterine cytological exam with cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and have been submitted to search CT through the technique of polymerase chain reaction (PCR) in endocervical secretions collected with sterile swab. **Results:** Of the 185 patients, 180 (97,3%) had condyloma lesions at inspection. At uterine cytological exam, CIN I was found in 11 (5,94%), CIN II in 3 (1,62%) and none had CIN III. In 36 samples was found the presence of endocervical secretion with CT, with a prevalence of coinfection of 19,5%. Regarding age at first sexual intercourse, 97,7% reported age under 19 and 45,2% had a steady partner. Of the patients included in the study, 48 were pregnant, totaling 25,9% of the participants. **Conclusion:** The prevalence of CT infection in women with clinical and/or cytological manifestations of HPV was 19,45% and its association with complications and the fact that it's an asymptomatic disease demonstrate the need of discussion about screening strategies.

**KEYWORDS:** *Chamydia trachomatis*, human papillomavirus, coinfection, screening.

## 1 INTRODUÇÃO

*Chlamydia trachomatis* é a infecção bacteriana sexualmente transmissível mais comum no mundo, e apesar de na maioria das vezes ser assintomática, está associada a muitas síndromes clínicas, incluindo cervicite, endometrite, uretrite, salpingite, e em longo prazo sequelas, que incluem infertilidade tubária e gravidez ectópica em mulheres, e uretrite, proctite e epididimite em homens (CODES et al., 2002).

Nas parturientes está relacionada a inúmeros desfechos desfavoráveis, tanto para a mãe pelo risco de ruptura prematura de membranas e parto prematuro, como para o recém-nascido pela associação com conjuntivite e manifestações respiratórias (CARVALHO et al., 2010).

<sup>1</sup> O presente estudo foi desenvolvido na Faculdade Assis Gurgacz (FAG); e teve auxílio de bolsa de iniciação à pesquisa científica do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

<sup>2</sup> Acadêmica do 6º ano do curso de Medicina da Faculdade Assis Gurgacz – FAG – endereço para correspondência: Andréia Carpenedo Rheinheimer – Rua Dom Pedro II, 2199, CEP: 85812-120, Cascavel - PR; e-mail: deiacarpenedo@hotmail.com.

<sup>3</sup> Acadêmica do 6º ano do curso de Medicina da Faculdade Assis Gurgacz - FAG.

<sup>4</sup> Acadêmico do 4º ano do curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR.

<sup>5</sup> Enfermeira. Coordenadora do Centro de Doenças Infecciosas e Parasitárias (CEDIP) e do Programa de DST/AIDS da Prefeitura Municipal de Cascavel-PR.

<sup>6</sup> Ginecologista responsável pelo Ambulatório de DST do Centro de Doenças Infecciosas e Parasitárias (CEDIP) da Prefeitura Municipal de Cascavel-PR. Professor de Ginecologia e Obstetrícia do curso de Medicina da FAG e preceptor-chefe do internato médico de Ginecologia e Obstetrícia da FAG.

Segundo Gonçalves (2009) a prevalência da infecção clamidiana é maior entre as mulheres com menos de 25 anos, que tenham trocado de parceiro ou que tenham múltiplos parceiros, não usuárias de métodos contraceptivos, que já interromperam voluntariamente uma gestação, ou ainda, com antecedentes de doenças sexualmente transmissíveis.

No Brasil, a infecção por *C. trachomatis* não é de notificação compulsória, entretanto o Ministério da Saúde, a partir de 1999, passou a sugerir o rastreamento para sífilis, gonorréia e *C. trachomatis* em gestantes e adolescentes em serviços específicos, como planejamento pré-natal e prevenção do câncer cérvico-uterino. (FERNANDES et al., 2009).

Pacientes infectadas pelo HPV têm maiores chances de possuírem outras doenças sexualmente transmissíveis às quais também devem ser investigadas. Desta forma, considerando a via comum de transmissão da *C. trachomatis* e do HPV, e da maioria das portadoras de infecção clamidiana ser assintomática, mulheres com manifestações clínicas e/ou citológicas do HPV poderiam ser beneficiadas com o rastreio ativo da *C. trachomatis*.

A coinfecção entre *C. Trachomatis* e o HPV tem sido estudada como um possível fator que contribui para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e câncer cervical, pois admite-se que o risco de transição da infecção cervical para a malignidade seja modulado por outros fatores em conjunto com a infecção pelo HPV oncogênico (ISHI et al., 2000; FREDIZZI et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de coinfecção por *C. trachomatis* em mulheres com manifestações clínicas e/ou citológicas do HPV com idade inferior a 25 anos.

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional e descritivo, realizado através da análise dos prontuários de 185 mulheres com idade inferior a 25 anos, atendidas no Centro Especializado de Doenças Infecto-Parasitárias (CEDIP) da cidade de Cascavel, no período compreendido entre janeiro de 2010 a dezembro de 2012.

As participantes do estudo possuíam diagnóstico clínico de condiloma acuminado em região vulvar, vaginal ou perineal, e/ou citológico de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), e foram submetidas à pesquisa de *C. trachomatis* por meio da coleta de secreção endocervical com swab estéril para teste de pesquisa de DNA pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio da técnica de Abbot Real Time CT/NG.

Foram pesquisados os dados referentes às condições sociodemográficas, estado civil, gestação atual ou não, idade da primeira consulta e idade atual, tabagismo, número de parceiros nos últimos doze meses, idade de início de relação sexual, uso de métodos anticoncepcionais orais combinados (ACOC), uso de preservativo, escolaridade e coinfecção por HPV e *C. trachomatis*.

Os dados analisados foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado. O nível de significância adotado para o teste empregado foi de 5%.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz - FAG (Protocolo 220/2012).

## **3 RESULTADOS**

As características sócio-demográficas e comportamentais das pacientes incluídas na pesquisa estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis sociodemográficas da população do estudo de acordo com a positividade ou não para *C. trachomatis*. (CT).

Variável sociodemográfica	CT presente n=36	CT negativo n=149	p*
<b>Idade média em anos:</b>			
Atual	20,19	29,71	0,2893
Primeira Consulta	18,97	18,47	0,2702
<b>Estado civil</b>			
Solteiras	27	104	0,7392
Casadas	9	45	0,6041
<b>Número de parceiros no último ano (162/185<sup>#</sup>)</b>			
Fixo	16	69	0,8822
2 a 5	17	57	0,4451
6 a 10	0	1	0,623
Mais que 10	1	1	0,2752
Sem informação	2	21	
<b>Gestação Atual</b>			
Sim	8	40	0,6251
Não	28	109	0,7723
<b>Tabagismo</b>			
Sim	3	6	0,293
Não	33	143	0,812

<sup>#</sup>Total de pacientes avaliados para essa variável.

\* Valor do p obtido pelo Teste Qui-Quadrado.

A idade média das pacientes na primeira consulta foi de 18 anos ( $\pm$  2,46 anos). A maioria referia ser solteira (70,8%) e 50,6% relataram um parceiro nos últimos 12 meses. A idade média da sexarca foi de 15,39 anos, sendo a menor de 9 anos e a maior de 20 anos, e o nível de escolaridade mais frequente foi o ensino médio incompleto (49,7%).

Das 185 pacientes, 180 (97,3%) apresentaram condiloma acuminado à inspeção genital, em 11 (5,94%) o exame citopatológico do colo do útero demonstrou NIC I ou lesão intra-epitelial de baixo grau (LIEBG), e em 3 pacientes (1,62%) NIC II ou lesão intra-epitelial de alto grau (LIEAG). A associação entre condiloma e LIEBG foi de 3,25% e com LIEAG não houve.

Trinta e seis amostras de secreção endocervical foram positivas para *C. trachomatis*, revelando prevalência de coinfecção de 19,45%. Todas com rastreio positivo apresentaram condiloma acuminado e em 6 das que tiveram LIEBG ao exame citológico existiu a coinfecção.

Com relação ao planejamento familiar, das 34 usuárias de anticoncepcional oral combinado (ACOC) 9 apresentaram positividade *C. trachomatis* (26,47%). O uso de condom, em todos os casos de forma irregular, foi presente em 44 pacientes, das quais 10 (22,72%) tiveram coinfecção.

Das pacientes incluídas na pesquisa 48 eram gestantes, totalizando 25,94% das participantes, e neste subgrupo a prevalência de coinfecção foi de 16,7%. Nas pacientes não gestantes a prevalência de coinfecção foi de 20,4%. A Tabela 2 descreve a distribuição das variáveis estudadas nas gestantes e não gestantes.

**Tabela 2 – Distribuição das variáveis analisadas nas gestantes e não gestantes incluídas na pesquisa.**

<b>Variável analisada</b>	<b>Gestantes (n=48)</b>	<b>Não gestantes (n=137)</b>
<b>Tipo de lesão pelo HPV<sup>1</sup>:</b>		
Condiloma	48	132
NIC	1	13
<b>Estado Civil</b>		
Casadas	21	33
Solteiras	27	104
<b>Sexarca<sup>#</sup></b>		
Até 19 anos	22	85
Após 19 anos	0	2
<b>Tabagismo</b>		
Sim	2	7
Não	46	130
<b>Uso de preservativo</b>		
Sim	7	37
Não	41	100
<b>Número de parceiros no último ano</b>		
Fixo	23	62
2 a 5	15	59
6 a 10	0	1
Mais que 10	1	1
<b>Coinfecção por Chlamydia trachomatis</b>		
Condiloma + CT <sup>2</sup>	8 (p = 0,2500)	28 (p = 0,2500)
NIC <sup>3</sup> + CT	0 (p = 0,3970)	1 (p = 0,6547)

<sup>#</sup>Sexarca: Informação presente em 22 gestantes e em 87 não gestantes.

<sup>\*</sup>Valor do p obtido pelo Teste Qui-Quadrado.

<sup>1</sup>HPV: Papilomavírus humano, <sup>2</sup>CT: *Chlamydia trachomatis*, <sup>3</sup>NIC: Neoplasia intraepitelial cervical.

#### **4 DISCUSSÃO**

Foram incluídos no estudo 185 pacientes com manifestações clínicas e /ou citológicas de HPV atendidas no CEDIP, nos anos de 2010 a 2012.

A idade média das pacientes na primeira consulta foi de 18 anos ( $\pm 2,46$  anos) e a idade média atual de 19,80 anos ( $\pm 2,45$  anos). Em relação à sexarca, dos 109 prontuários que continham esta informação, em 107 foi relatada com 19 anos ou menos e em 2 com mais de 19 anos, com idade média de 15 anos. Outros trabalhos já haviam demonstrado que o maior risco para infecção pelo HPV é o gênero feminino, juventude e atividade sexual precoce, com as taxas mais elevadas encontradas em mulheres sexualmente ativas com menos de 25 anos de idade (AULT, et al., 2006).

Mulheres jovens podem ser consideradas mais susceptíveis às doenças sexualmente transmissíveis (DST), pela maior incidência de ectopia cervical e mudanças hormonais, bem como maior probabilidade de ter um número maior de parceiros sexuais, relação sexual desprotegida e parceiros sexuais mais expostos a riscos (LUPPI, et al., 2011).

Nesta pesquisa, foi demonstrado que trinta e seis amostras endocervicais foram positivas para *C. trachomatis*, pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR), revelando uma prevalência de infecção de 19,5%. Diferentes resultados foram encontrados em outros trabalhos, a exemplo de um realizado em Salvador com adolescentes, cuja taxa de infecção por *C. trachomatis* foi de 31% (MACHADO et al. 2012).

Para tais variações de prevalência encontradas, deve-se considerar o delineamento do estudo, comportamentos de risco presentes, fatores sociodemográficos da população estudada, sensibilidade e especificidade do teste usado para rastreio.

Todas as pacientes com rastreio positivo apresentaram condiloma acuminado a inspeção e em 6 das que tiveram LIEBG ao exame citológico houve a coinfeção. Os mecanismos envolvidos na associação entre as manifestações

clínicas e/ou citológicas do HPV e coinfeção por *C. trachomatis* ainda não foram totalmente esclarecidos. (WEN et al., 1999).

Uma revisão feita sobre os principais aspectos da epidemiologia, história natural, do diagnóstico e do tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical relatou fraca associação entre incidência de *C. trachomatis* e ocorrência de carcinoma de colo uterino, porém ainda não se sabe totalmente porque algumas lesões regridem e outras malignizam, havendo a necessidade de mais estudos para elucidar esta questão, bem como o apontar qual é o papel específico da *C. trachomatis* neste processo (AIDÉ et al., 2009).

Neste estudo foi encontrada diferença na taxa de coinfeção entre solteiras e casadas, sendo que 20,6% das solteiras e 16,6% das casadas apresentaram positividade no rastreio. Entretanto o valor do p não foi significativo, e em outros estudos não foi descrita relação entre estado civil e presença de coinfeção clamidiana (BRABIN et al., 2005).

Em 162 dos prontuários existiu a informação em relação ao número de parceiros no último ano: 85% tiveram parceiro fixo e 18,8% destas apresentaram coinfeção, 74 relataram de 2 a 5 parceiros no último ano com taxa de coinfeção de 22,97%, 1 relatou de 6 a 10 parceiros no último ano, sem coinfeção, e 2 relataram mais de 10 parceiros no último com 1 apresentando positividade para *C. trachomatis*.

Achados da literatura também sugerem relação entre maior número de parceiros e risco aumentado para DSTs, entre elas a por *C. trachomatis*. Segundo um estudo feito com mulheres atendidas em um serviço de atenção primária em São Paulo, 2 ou mais parceiros na vida ou mais de 2 nos últimos 6 meses representam maior risco para presença de DST. Outro estudo a respeito de coinfeção entre *C. trachomatis* e HPV relatou forte associação com 3 ou mais parceiros sexuais durante a vida (LUPPI et al., 2011; IGANSI et al., 2012).

Em relação ao tabagismo, das 9 fumantes contidas na pesquisa, 3 apresentaram coinfeção por *C. trachomatis* (33,3%). Estudos apontam que o fumo é fator de risco para infecção clamidiana, e, além disso, está associado ao aumento do risco da progressão das lesões pelo HPV devido à persistência da atividade viral (BRABIN et al., 2005; MARCOLINO et al., 2008).

Em relação ao planejamento familiar, 34 referiram o uso de anticoncepcional oral combinado (ACOC) sendo que 9 apresentaram *C. trachomatis* (26,47%), e 44 referiram uso de condom, todas de forma irregular, das quais 10 (22,72%) tiveram coinfeção.

Outros estudos demonstraram que apesar de o fator de risco mais importante para a infecção por *C. trachomatis* ser a idade, uso inconsistente de preservativo masculino e insuficiente conhecimento acerca da vida sexual e cuidados reprodutivos também são fatores de risco importantes (FERNANDES et al., 2009).

Controvérsias existem a respeito da relação do uso de contraceptivos orais (ACO) e a presença de *C. trachomatis*. Alguns estudos não mostram relação causal, enquanto outros apontaram relação com persistência das lesões. (FREDIZZI et al., 2008).

Das pacientes estudadas, 48 eram gestantes, totalizando 25,94% das participantes, e neste subgrupo foi encontrada prevalência de 16,7% de coinfeção com *C. trachomatis*. Nas pacientes não gestantes a prevalência de coinfeção foi de 20,4%, e entre elas existiu um maior número de tabagistas e de 2–5 parceiros no último ano, podendo ser apontados como possíveis comportamentos de maior risco.

A positividade encontrada nas gestantes deste estudo é superior à prevalência de outros já realizados. Em uma pesquisa feita com parturientes atendidas em hospitais públicos brasileiros com idade entre 15 e 24 anos a prevalência de *C. trachomatis* foi de 9,8% e esteve associada com fator de idade precoce (15–19 anos), sexarca antes dos 15 anos e mais de um parceiro sexual ao longo da vida (PINTO et al. 2011).

Pode-se explicar a alta taxa de coinfeção, tanto em gestantes quanto em não gestantes (16,7% e 20,4% respectivamente), superior a muitos outros estudos realizados, pelo método de rastreio empregado, por meio da amplificação de DNA (PCR), que em termos de sensibilidade e especificidade é o mais completo e com menores riscos (CALIL et al., 2011).

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observada uma prevalência de infecção de 19,5%, por *C. trachomatis* em mulheres com manifestações clínicas e/ou citológicas do HPV com idade inferior a 25 anos. Seu caráter assintomático e associação a diversas complicações demonstram a necessidade de discussão sobre estratégias de rastreamento.

## REFERÊNCIAS

AIDÉ S. et al. Neoplasia intraepitelial cervical. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**; n. 4, p.166–170, 2009.

AULT K.A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. **Infect Dis Obstet Gynecol**; n.5, p. 1-5, 2006.

BERTONI, F. R.; BUNN K.; SILVA J.; Perfil Demográfico e Socioeconômico dos Portadores de HIV/AIDS de São José - SC. **Arquivos Catarinenses De Medicina**; n. 4, p. 75-79, 2010.

BRABIN L. et al. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus, and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. **Sex Transm Infect**; n.2, p. 128-132, 2005.

CALIL L.N. et al. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of pacientes with pre – neoplastic and neoplastic lesions. **Braz J Infect Dis**; n.2, p. 126–131, 2011.

CARVALHO N.S. et al. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* em parturientes jovens atendidas em uma maternidade pública. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**; n.3, p.141–144, 2010.

CODES, J.S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**; n.2, p.101–106, 2002.

FERNANDES A.M.; DAHER R.X.P.; PETTA C.A.; Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**; n.5, p.235–240, 2009.

FREDIZZI E.N. et al. Infecção pelo papilloma vírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **J bras Doenças Sex Trasm**; n.2, p.73–79, 2008.

GONÇALVES A.K.S. et al. Rastreamento universal para cervicite clamidiana: uma revisão sistemática. **FEMINA**; n.10, p.535–541, 2009.

IGANSI C.N.; **Prevalência de papiloma vírus humano (HVP) e Chlamydia trachomatis e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil**. 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

IGANSI C.N. et al. HPV and *Chlamydia trachomatis* genital infection among non – symptomatic women: prevalence, associated factors and relationship with cervical lesions. **Caderno de Saúde Coletiva**; n.3, p.287–296, 2012.

ISHI K. et al. Prevalence of human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, and Neisseria gonorrhoeae in commercial sex workers in Japan. **Infect Dis Obstet Gynecol**; n.5, p.235-239, 2000.

LUPPI C.G. et al. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; n.3, p.466–477, 2011.

MACHADO M.S.C; COSTA E SILVA B.F.R; GOMES I.L.C; SANTANA I.U; GRASSI M.F.R; Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. **Braz J Infect Dis**; n.2, p.188-191, 2012.

MARCOLINO L.D. et al. Coinfeccão de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**; n.2, p.87–92, 2008.

PINTO V.M. et al. Chlamydia trachomatis prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**; n.10, p.957–961, 2011.

WEN L.M. et al. Risk factors for the acquisition of genital warts: are condoms protective? **Sex Transm Inf**; n.5, p.312-316, 1999.