

Giá trị của PCR trong xác định vi khuẩn Gram dương ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

Evaluating the value of RT-PCR in identifying Gram positive bacteria caused sepsis

Đỗ Văn Đông*,**,
Ngô Tất Trung**, Lê Hữu Song**

*Học viện Quân y
**Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định giá trị của PCR trong phát hiện vi khuẩn Gram dương gây nhiễm khuẩn huyết (NKH). **Đối tượng và phương pháp:** 170 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết theo tiêu chuẩn Sepsis 3 được đưa vào nghiên cứu. Mỗi bệnh nhân đều được xác định căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết bằng cấy máu và Realtime PCR (RT-PCR). **Kết quả:** 58/170 (34,1%), 94/170 (55,3%), và 101/170 (59,4%) được phát hiện mầm bệnh bằng cấy máu, RT-PCR và kết hợp hai phương pháp. Trong số 94 bệnh nhân dương tính với RT-PCR, có 27,7% (26/94) trường hợp có kết quả dương tính với Gram dương. Bằng RT-PCR có thể phát hiện được thêm 43 ca trong số 112 ca cấy máu âm tính và tỷ lệ dương tính với Gram dương trong số bệnh nhân này là 39,5% (17/43). RT-PCR chứng tỏ khả năng phát hiện các vi khuẩn Gram dương tốt hơn cấy máu (72,4% so với 10,3%, $p < 0,05$), đặc biệt một số trường hợp chỉ được xác định bằng RT-PCR như: *Streptococcus sp* (10 ca), *S. pneumoniae* (4 ca) và *Enterococcus sp* (3 ca). **Kết luận:** RT-PCR là một phương pháp có giá trị hỗ trợ tốt cho chẩn đoán và xác định căn nguyên vi khuẩn Gram dương ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.

Từ khóa: Nhiễm khuẩn huyết, RT-PCR.

Summary

Objective: To evaluate a in-house Realtime PCR (RT-PCR) assay in identifying Gram positive bacteria causing sepsis. **Subject and method:** 170 sepsis patients according to Sepsis-3 were recruited into this study. Causative pathogens were identified by conventional blood culture (BC) and RT-PCR concomitantly. **Result:** 34.1%, 55.3% and 59.4% patients were identified bacterial pathogens in blood samples by BC, RT-PCR, and combination of two assays, respectively. Among those positive patients with RT-PCR, 27.7% (26/94) cases were positive for Gram positive bacteria. 43 out of 112 cases negative with BC were positive with RT-PCR and the proportion of Gram positive bacteria in those were 39.5% (17/43). RT-PCR identified pathogens significantly higher than BC (72.4% vs 10.3%, $p < 0.05$), especially several bacteria like *Streptococcus sp* and *Enterococcus sp* were only detected by RT-PCR. **Conclusion:** RT-PCR assay was an effective assay in identifying Gram positive bacteria in sepsis patients.

Keywords: Sepsis, Real-time PCR.

Ngày nhận bài: 10/12/2018, ngày chấp nhận đăng: 14/12/2018

Người phản hồi: Đỗ Văn Đông, Email: vandongdohvqy@gmail.com - Học viện Quân y

1. Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) là một gánh nặng sức khỏe nghiêm trọng, không chỉ thể hiện qua tỷ lệ tử vong và tỷ lệ mắc bệnh mà nó còn thể hiện qua những khoản chi phí chăm sóc và điều trị cho bệnh nhân (BN) [1]. Hiện tại, cấy máu vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán NKH. Tuy nhiên, cấy máu có nhiều hạn chế như: Độ nhạy thấp, thời gian trả kết quả kéo dài (ít nhất 24 - 72 giờ), kết quả âm tính được thông báo sau 5 - 7 ngày, đặc biệt kết quả bị ảnh hưởng bởi việc sử dụng kháng sinh trước khi cấy máu, cần lấy một lượng máu lớn nên sẽ khó khăn cho trẻ nhỏ [2]. Trong khi đó, cứ mỗi giờ trì hoãn liệu pháp kháng sinh sau khi xuất hiện sốc nhiễm khuẩn (SNK) sẽ làm tăng tỷ lệ tử vong lên 7,6% [3]. Sự phân bố mầm bệnh gây NKH thay đổi theo thời gian, song có nhiều nghiên cứu ở Hoa Kỳ chỉ ra rằng căn nguyên vi khuẩn Gram dương được xác định chiếm tỷ lệ đáng kể [4]. Realtime PCR (RT-PCR) là một trong những phương pháp phát hiện tác nhân gây NKH mà gần đây đang được quan tâm phát triển và đưa vào ứng dụng. Ưu điểm của phương pháp này là không chỉ cung cấp kết quả nhanh, mà còn giúp cho bác sĩ lâm sàng có cái nhìn sơ bộ về tính kháng kháng sinh của vi khuẩn thông qua việc phát hiện gene kháng kháng sinh. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Đánh giá giá trị của RT-PCR trong xác định vi khuẩn Gram dương ở BN NKH.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

BN được chẩn đoán NKH theo tiêu chuẩn Sepsis-3: Điểm SOFA tăng cấp tính ≥ 2 điểm so với thời

điểm trước nhiễm khuẩn. Có biểu hiện nhiễm khuẩn: Sốt (thân nhiệt $> 37^{\circ}\text{C}$) hoặc tụt thân nhiệt (thân nhiệt $< 36^{\circ}\text{C}$) kèm theo tăng các marker viêm như bạch cầu, neutrophil máu ngoại vi, procalcitonin (PCT)...

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu mô tả, cắt ngang, được thực hiện hồi cứu từ tháng 1/2016 đến tháng 10/2017 và tiến cứu từ tháng 11/2017 đến tháng 9/2018. BN NKH được thực hiện đồng thời cấy máu và PCR máu xác định căn nguyên gây bệnh. Hai bình cấy máu được lấy từ 2 vị trí, nuôi cấy bằng hệ thống tự động Bactec FX Top và định danh bằng hệ thống Vitek 2. Mẫu máu cho xét nghiệm RT-PCR (2ml) được xử lý bằng dung dịch MCLB-1 để loại bỏ DNA người và làm giàu nồng độ DNA vi khuẩn. Sản phẩm DNA sau đó được dùng để chạy phản ứng RT-PCR với mỗi đặc hiệu cho 14 vi khuẩn: *Staphylococcus sp*, *S. aureus*, *Streptococcus sp*, *S. pneumoniae*, *S. suis*, *Enterococcus sp*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Salmonella sp*, và thêm 2 vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối *Bacteroides sp* và *Fusobacterium sp*. So với phương pháp RT-PCR của chúng tôi được công bố trước đây, phổ vi khuẩn đã được điều chỉnh từ tháng 3/2018 để phù hợp hơn với tình trạng phân bố mầm bệnh tại Việt Nam, cũng như ở bệnh viện bao gồm: *S. aureus*, *Streptococcus sp*, *S. suis*, *Enterococcus sp*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Chỉ số		Số bệnh nhân (n)	Tỷ lệ (%)
Tuổi		64 (18 - 94)	
Giới (Nam)		122	71,8
Ổ nhiễm khuẩn tiên phát	Ổ bụng	49	28,8
	Đường hô hấp	41	24,1
	Thần kinh trung ương	25	14,7
	Tiết niệu	20	11,8

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu (Tiếp theo)

	Chỉ số	Số bệnh nhân (n)	Tỷ lệ (%)
Ổ nhiễm khuẩn tiên phát	Da - mô mềm	19	11,2
	Không rõ	16	9,4
Suy tạng	Suy hô hấp	110	64,7
	Suy tuần hoàn	108	63,5
	Suy thận	101	59,4
	Rối loạn đông máu	99	58,2
	Suy gan	98	57,6
	Suy chức năng thần kinh	87	51,2
SOFA, median (range) (điểm):		8 (2 - 16)	
Kết quả điều trị	Sốc	84	49,4
	Tử vong	79	46,5

Nhận xét: 170 BN nghiên cứu có tuổi trung bình 64 (18 - 94). BN nam chiếm ưu thế với 78,8%. Ổ nhiễm khuẩn tiên phát hay gặp nhất là ổ ổ bụng (28,8%), tiếp theo từ đường hô hấp (24,1%), thần kinh trung ương (14,7%), tiết niệu (11,8%), da - mô mềm (11,2%) và không rõ ổ nhiễm khuẩn (9,4%). Điểm SOFA trung bình của nhóm nghiên cứu là 8 (2 - 16), trong đó hay gặp nhất là suy hô hấp (64,7%), ít gặp nhất là suy chức năng thần kinh (51,2%). Tỷ lệ BN sốc chiếm 49,4%, trong khi đó tỷ lệ tử vong trong nghiên cứu là 46,5%.

Bảng 2. Mối liên quan giữa kết quả RT-PCR với BC, neutrophil và PCT

Marker viêm	RT-PCR (-) (n = 76)	RT-PCR (+) (n = 94)	p
Số lượng bạch cầu (median, range)	13,95 (0,56 - 44,91)	15,69 (0,62 - 53,79)	>0,05
Neutrophil (%) (median, range)	86,2 (4,9 - 96,2)	90,9 (25,9 - 97,4)	<0,05
PCT (ng/ml) (median, range)	13,6 (0,3 - 100)	63,3 (0,6 - 100)	<0,05

Nhận xét: Số lượng bạch cầu, tỷ lệ phần trăm neutrophil máu ngoại vi và nồng độ PCT huyết thanh đều tăng cao hơn ở nhóm RT-PCR dương tính so với nhóm RT-PCR âm tính.

Bảng 3. Kết quả của phương pháp cấy máu và RT-PCR

Phương pháp	Cấy máu (+)	Cấy máu (-)	Tổng
RT-PCR (+), n (%)	51 (87,9)	43 (38,4)	94 (55,3)
RT-PCR (-), n (%)	7 (12,1)	69 (61,6)	76 (44,7)
Tổng, n (%)	58 (34,1)	112 (65,9)	170 (100)

Nhận xét: Tỷ lệ dương tính của RT-PCR cao hơn cấy máu (55,3% so với 34,1%). Kết hợp hai phương pháp cấy máu và RT-PCR cho tỷ lệ dương tính là 59,4% (101/170). Tỷ lệ tương đồng dương tính giữa 2 phương pháp là 90,2% (46/51).

94 bệnh nhân có RT-PCR dương tính, tỷ lệ dương tính với Gram dương là 27,7% (26/94). Ngược lại, 58 bệnh nhân cấy máu dương tính có 13,8% (8/58) phân lập được Gram dương. Trong số 112 bệnh nhân cấy máu âm tính có 43 bệnh nhân (38,4%) được xác định mầm bệnh bằng RT-PCR và tỷ lệ dương tính với Gram dương trong số bệnh nhân này là 39,5% (17/43).

Bảng 4. Kết quả xác định vi khuẩn Gram dương bởi cấy máu và RT-PCR máu

Vi khuẩn được xác định	Chỉ bằng cấy máu, n	Chỉ bằng RT-PCR, n	Đồng thời 2 phương pháp, n	Tổng n
<i>Enterococcus</i> sp	0	3	0	3
<i>S. sanguinis</i>	1	0	0	1
<i>S. aureus</i>	1	1	0	2
<i>S. mitis</i>	1*	0	0	1
<i>S. pneumoniae</i>	0	4	1	5
<i>S. suis</i>	0	2	4	6
<i>Staphylococcus</i> sp	0	1	0	1
<i>Streptococcus</i> sp	0	10	0	10
Tổng, n (%)	3 (10,3)	21 (72,4)	5 (17,3)	29 (100)

Ghi chú: *Cấy máu dương tính với *S. mitis*, RT-PCR dương tính với *Streptococcus* sp.

Nhận xét: RT-PCR chứng tỏ khả năng phát hiện các vi khuẩn Gram dương tốt hơn cấy máu (72,4% so với 10,3%, $p < 0,05$), đặc biệt một số trường hợp chỉ được xác định bằng RT-PCR như *Streptococcus* sp (10 ca), *S. pneumoniae* (4 ca) và *Enterococcus* sp (3 ca).

4. Bàn luận

Nhiễm khuẩn huyết là một trong những nguyên nhân phổ biến gây tử vong ở các bệnh nhân nội trú trên toàn thế giới và tỷ lệ hiện mắc ngày càng tăng. Việc sử dụng kháng sinh ban đầu nhanh và chính xác đóng vai trò quan trọng trong thành công của điều trị của bệnh nhân NKH [5]. Kết quả cấy máu chậm nên việc sử dụng phác đồ kháng sinh chủ yếu theo kinh nghiệm, phần lớn dựa vào đặc điểm lâm sàng [6]. Do vậy, cần có một phương pháp chẩn đoán mầm bệnh nhanh và độ chính xác cao nhằm hỗ trợ bác sĩ lâm sàng đưa ra phác đồ điều trị kháng sinh ban đầu hiệu quả. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về các kit xét nghiệm sử dụng phương pháp PCR để chẩn đoán căn nguyên NKH. Trong đó, SeptiFast của hãng Roche được lưu hành trên thị trường với chứng chỉ IVD và được FDA cho phép sử dụng trong thực hành lâm sàng. Tuy nhiên, giá thành cao, kỹ thuật phức tạp, đòi hỏi trang thiết bị chuyên dụng và hiệu quả lâm sàng còn nhiều tranh luận. Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã tối ưu hóa kit RT-PCR chẩn đoán căn nguyên NKH và ứng

dụng trong lâm sàng nhiều năm nay. Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện nhằm đánh giá giá trị của RT-PCR trong phát hiện mầm bệnh là vi khuẩn Gram dương gây NKH sau khi có một số cải tiến kỹ thuật so với nghiên cứu trước đây [7].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ dương tính của cấy máu, RT-PCR và kết hợp hai phương pháp lần lượt là 34,1%, 55,3% và 59,4%. Trong nhiều nghiên cứu trước đây đều cho thấy tỷ lệ dương tính của RT-PCR cao hơn so với cấy máu. Theo Frank B khi nghiên cứu so sánh khả năng phát hiện mầm bệnh của cấy máu và kit SeptiFast cho thấy tỷ lệ dương tính của SeptiFast là 34,7% so với của cấy máu là 16,5% với $p < 0,001$ [8]. Kết quả cũng tương tự như ở trong nghiên cứu của Suberviola B [9]. Lý do giải thích cho việc tỷ lệ dương tính của RT-PCR cao hơn tỷ lệ dương tính của cấy máu có thể do một số nguyên nhân sau. Thứ nhất, việc sử dụng kháng sinh trước khi cấy máu ảnh hưởng tới độ nhạy của phương pháp cấy máu [10]. Ngược lại, việc sử dụng kháng sinh trước không làm ảnh hưởng đến các phương pháp chẩn đoán mầm bệnh dựa trên kỹ thuật PCR [11]. Thứ hai, có thể do đặc điểm bệnh nhân lựa chọn vào nghiên cứu. Đối tượng chọn vào nghiên cứu của chúng tôi được lấy ở các khoa lâm sàng khác nhau trong bệnh viện và đa phần các đối tượng được chọn là NKH. Trong khi đó, tỷ lệ cấy máu dương tính tăng dần theo mức độ nặng của bệnh

nhân NKH [12]. So sánh kết quả cấy máu và RT-PCR có sự tương đồng dương tính rất cao (90,2%). Ngoài ra, có 69 trường hợp BN cùng âm tính với 2 phương pháp. Do vậy, tỷ lệ tương đồng chung giữa 2 phương pháp trên với tỷ lệ là 95,8% $[(46 + 69) / (51 + 69)]$. Kết quả này cao hơn nghiên cứu của tác giả Westh H [13].

Nếu lấy cấy máu là tiêu chuẩn vàng trong xác định vi khuẩn trong máu, thì RT-PCR có độ nhạy 87,9% (51/58), độ đặc hiệu 61,6% (69/112). So sánh với các phương pháp chẩn đoán nhanh NKH khác, phương pháp sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi có độ nhạy và độ đặc hiệu chấp nhận được. Độ nhạy và độ đặc hiệu khi sử dụng kit SeptiFast chẩn đoán các căn nguyên gây NKH của tác giả Fatih D là 69% và 81% [14], và Westh H là 79% và 78% [13].

Hiện tại, cấy máu vẫn được cho là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán NKH, nhưng độ nhạy của phương pháp này chỉ 30 - 40% tùy theo các nghiên cứu. Do vậy, trong những trường hợp chẩn đoán lâm sàng NKH có kết quả cấy máu âm tính, liệu có phương pháp nào xác định được căn nguyên gây NKH? Trong nghiên cứu của chúng tôi có 43 (38,4%) trong số 112 BN cấy máu âm tính nhưng có RT-PCR (+). Xét nghiệm RT-PCR chẩn đoán căn nguyên NKH được kiểm soát rất chặt chẽ từ khâu lấy mẫu, xử lý mẫu máu cũng như trả kết quả cuối cùng và đặc biệt luôn có sự liên hệ, trao đổi giữa khoa xét nghiệm với các khoa lâm sàng. Do vậy, kết quả RT-PCR có độ chính xác rất cao và có giá trị định hướng cho các bác sĩ lâm sàng trong chẩn đoán và điều trị. Kết quả này gợi ý rằng bên cạnh cấy máu chúng ta cần áp dụng phương pháp khác ví dụ RT-PCR để tăng khả năng phát hiện mầm bệnh. Kết quả của chúng tôi một lần nữa khẳng định giá trị của PCR trong xác định mầm bệnh gây NKH như các nghiên cứu trước đây [13], [14]. Tuy nhiên, vẫn có 7 BN có kết quả RT-PCR âm tính trong khi cấy máu dương tính. NKH ở người lớn đặc trưng bởi nồng độ vi khuẩn trong máu thấp, trong khi đó quá trình tách DNA vi khuẩn còn một số bước phụ thuộc vào kỹ thuật của người làm xét nghiệm và vi khuẩn nuôi cấy được nằm ngoài phổ vi khuẩn chẩn đoán của RT-PCR có thể là nguyên nhân dẫn đến kết quả trên. Nghiên cứu của tác giả Frank Bloos cũng cho thấy có 8 BN có kết quả

SeptiFast âm tính trong khi cấy máu âm tính và có 1/8 tác nhân nuôi cấy được nằm ngoài "panel" chẩn đoán của SeptiFast (*Micrococcus luteus*) [8]. Nghiên cứu của tác giả Westh H và cộng sự chỉ ra rằng có 24 trường hợp cấy máu dương tính trong khi đó kết quả SeptiFast âm tính và có 6/24 (25%) chủng vi khuẩn phân lập được từ cấy máu không nằm trong danh mục chẩn đoán của SeptiFast [13].

Mặt khác, RT-PCR tỏ rõ ưu thế so với cấy máu trong chẩn đoán các căn nguyên vi khuẩn Gram dương. Tỷ lệ vi khuẩn Gram dương được phát hiện bằng RT-PCR và cấy máu lần lượt là 27,7% và 13,8%. Nếu xét riêng từng phương pháp thì tỷ lệ phát hiện vi khuẩn Gram dương chỉ bằng RT-PCR là 72,4% và cấy máu là 10,3%. Hơn nữa, trong số 112 ca bệnh cấy máu âm tính, tỷ lệ vi khuẩn Gram dương RT-PCR phát hiện được 39,5% (17/43). RT-PCR còn tỏ ra ưu thế hơn so với cấy máu ở một số căn nguyên vi khuẩn như *Streptococcus sp* (10 ca), *Enterococcus sp* (3 ca) và đặc biệt là tác nhân khó nuôi cấy *S. pneumoniae* (4 ca). Nghiên cứu của tác giả Westh H cũng cho thấy, SeptiFast ưu thế hơn cấy máu khi phát hiện các tác nhân *S. aureus* (20 ca), *Streptococcus sp* (9 ca) và *Enterococcus faecium* (8 ca) [13].

Nồng độ PCT tăng cao hơn ở nhóm RT-PCR(+) so với nhóm RT-PCR(-) có ý nghĩa với $p < 0,05$ (Bảng 2) gợi ý có vai trò của vi khuẩn trong đáp ứng viêm của nhóm BN có RT-PCR(+). Kết quả này tương tự các nghiên cứu của Frank Bloos [8] và Suberviola [9].

5. Kết luận

Qua nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy, RT-PCR là một phương pháp có giá trị trong xác định căn nguyên vi khuẩn Gram dương ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2017.21.

Tài liệu tham khảo

1. Cecconi M, Evans L, Levy M et al (2018) *Sepsis and septic shock*. The Lancet 392(10141): 75-87.
2. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP et al (2014) *Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and*

- recent developments. *European journal of microbiology & immunology* 4(1): 1-25.
3. Sterling SA, Miller WR, Pryor J et al (2015) *The Impact of timing of antibiotics on outcomes in severe sepsis and septic shock: A systematic review and meta-analysis*. *Critical care medicine* 43(9): 1907-1915.
 4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S et al (2003) *The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000*. *New England Journal of Medicine* 348(16): 1546-1554.
 5. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A et al (2003) *Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis**. *Critical care medicine* 31(12): 2742-2751.
 6. Leekha S, Terrell CL and Edson RS (2011) *General principles of antimicrobial therapy*. *Mayo Clinic Proceedings* 86(2): 156-167.
 7. N. Tat Trung, H. Van Tong, T. T. Lien et al (2018) *Clinical utility of an optimised multiplex real-time PCR assay for the identification of pathogens causing sepsis in Vietnamese patients*. *International Journal of Infectious Diseases* 67: 122-128.
 8. Bloos F, Hinder F, Becker K et al (2010) *A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis*. *Intensive Care Medicine* 36(2): 241-247.
 9. Suberviola B, Márquez-López A, Castellanos-Ortega A et al (2016) *Microbiological diagnosis of sepsis: Polymerase chain reaction system versus blood cultures*. *American Journal of Critical Care* 25(1): 68-75.
 10. Scheer CS, Fuchs C, Gründling M et al (2018) *Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: A prospective clinical cohort study*. *Clinical Microbiology and Infection*.
 11. Dinc F, Akalin H, Özakin C et al (2016) *Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis*. *Minerva anesthesiologica* 82(3): 301-309.
 12. Rangel-Frausto M, Pittet D, Costigan M et al (1995) *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (sirs): A prospective study*. *JAMA* 273(2): 117-123.
 13. Westh H, Lisby G, Breysse F et al (2009) *Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis*. *Clinical Microbiology and Infection* 15(6): 544-551.
 14. Lehmann, LE Hunfeld KP, Steinbrucker M et al (2010) *Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis*. *Intensive Care Medicine* 36(1): 49-56.