

بررسی رابطه باکتری‌های شایع در عفونت ادراری با سنگ ادراری در

بیمارستان لبافی نژاد در سال ۱۳۸۳

دکتر گیتا اسلامی، افسون تقوی، دکتر جمیله نوروزی *

* گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مشکلات اساسی و شایع دستگاه ادراری، بروز سنگهای ادراری است. مسائل مختلفی از قبیل تغذیه، آب و هوا، جنس، ژنتیک و باکتری‌های اوره‌آز مثبت در تشکیل آن دخالت دارند. شیوع این سنگها در جوامع مختلف بین ۳ تا ۴٪ می‌باشد. این مطالعه در سال ۱۳۸۳ بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سنگ مجرای ادراری در بیمارستان لبافی نژاد انجام گرفت.

روش بررسی: سنگ مجرای ادراری که از ۱۰۰ بیمار و با روش *ESWL (Extra corporeal shockwave lithotripsy)* خارج شده بود، جدا گردید و قطعه کوچکی از آن در دو لوله حاوی محیط کشت باکتری (تیوگلیکولات و *T.S.B*) کشت داده شد. سپس در محیطهای اختصاصی کشت داده شده و برای کلنی‌های مشکوک رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت و بخش دیگری از سنگ برای تجزیه شیمیایی نگه داشته شد.

یافته‌ها: در مجموع، باکتری‌ها در ۴۰ مورد (۴۰٪) رشد کردند. ۵۳٪ سنگها، سنگهای مخلوط بود. مردان ۱/۵ برابر بیشتر از زنان به سنگ مبتلا شده بودند ($p < 0/003$). شایعترین میکروارگانیسم‌های جدا شده عبارتند از: *E.coli* (۳۷/۵٪)، استاف‌اورئوس (۱۷/۵٪)، کاندیدا (۱۲٪)، انتروباکتر (۱۰٪)، کلبسیلا (۱۰٪)، پروویدنسیا (۵٪)، استاف اپیدرمیدیس (۵٪) و باسیلوس سابتیلیس (۲/۵٪). بین *E.coli* و اگزالات کلسیم و انتروباکتر و اسیداوریک ارتباط آماری معنی‌دار وجود داشت ($p < 0/034$).

نتیجه‌گیری: هر دو گروه باکتری‌های تولیدکننده و فاقد اوره‌آز قادر به جمع‌آوری کریستال‌های کلسیم می‌باشند. از این رو باکتری‌ها نقش مهمی در بروز سنگهای ادراری دارند.

واژگان کلیدی: سنگ ادراری، باکتری‌ها، عفونت دستگاه ادراری.

مقدمه

رو به افزایش است. سنگ دستگاه ادراری تمایل به عود دارد. در مطالعات متعدد نشان داده شده است عود سنگهای اگزالات کلسیمی در عرض یک‌سال ۱۰٪، ۵ سال ۳۵٪ و در عرض ۱۰ سال ۵۰٪ می‌باشد. از نظر همه‌گیر شناسی عوامل موثر بر سنگ‌سازی را می‌توان به دو گروه عوامل داخلی (وراثت، سن و جنس) و عوامل خارجی (جغرافیا، آب و هوایی و فصلی، میزان مصرف آب، رژیم غذایی و شغل) تقسیم نمود (۳).

دخالت باکتری‌ها در تشکیل سنگهای مجاری ادراری توسط Rosenow پیشنهاد شده است. بعد از آن Bulleid ایجاد رسوب آهکی توسط باکتری‌ها را گزارش کرد که در آن زمان

تاریخچه سنگ ادراری با تاریخ بشر قرین بوده است، به نحوی که در بررسی مومیائیهای مصری مربوط به ۷۰۰۰ سال قبل سنگ مثانه دیده شده است (۱). تخمین زده می‌شود که حدود ۱۲٪ افراد در خلال زندگی خود دچار سنگ ادراری می‌شوند و حداکثر بروز سنگهای ادراری در گروه سنی ۵۰-۳۰ ساله دیده می‌شود (۲). از طرفی بروز سنگهای ادراری

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروبیولوژی، دکتر گیتا اسلامی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۵/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۲/۲

رسوب فسفات کلسیم در سلولهای متلاشی شده لپتوتریکس بوکالیس مشاهده شد (۴).

بررسیهای دیگری در مورد تشکیل کریستال در انواع مختلفی از باکتریها و قارچها (کاندیدا آلبیکنس) گزارش شده است (۵). عفونت با باکتریهای تولیدکننده اوره‌آز (به ویژه پروتئوس میرابیلیس) شرط ضروری برای تشکیل سنگهای عفونی struvite می‌باشد (۶).

اکثر سنگهای عفونی در مجرای ادراری توسط میکروارگانیسیمهایی ایجاد می‌شوند که آنزیم اوره‌آز را سنتز می‌کنند. آمونیاک در اثر هیدرولیز اوره توسط اوره‌آز ایجاد می‌شود، در نتیجه آن ادرار به مقدار زیاد قلیایی شده و struvite و کربنات آپاتیت تشکیل می‌شود (۶). قرار گرفتن ارگانیسیمهای عفونی در درون سنگ در حال تشکیل، کانونی از عفونت را ایجاد می‌کند که معمولا به درمان ضد میکروبی مقاوم است و در اکثر موارد با باکتریوری پایدار همراه می‌باشد (۷). این در حالیست که میکروارگانیسیمهایی فاقد اوره‌آز نیز در بروز عفونتهای مجرای ادراری موثر شناخته شده‌اند (۸). این میکروارگانیسیمها با مکانیسمهای مختلف می‌توانند در تشکیل سنگهای مجرای ادراری دخالت داشته باشند. برای مثال E.coli در تشکیل هسته رسوب کریستال سنگ دخالت کرده و خاصیت شیمیایی ادرار را تغییر می‌دهد. انواع مختلفی از پاتوژنهای ادراری با اتصال به اپی‌تلیوم مجرای ادراری به آن آسیب می‌رسانند و باعث اتصال کریستالها به اپی‌تلیوم مجرای ادراری می‌شوند (۹).

سنگهای ادراری در کشور ما نیز بعنوان یکی از مشکلات بهداشتی- درمانی مطرح بوده و بخش قابل توجهی از مراجعات به بخشهای اورولوژی را تشکیل می‌دهند. از آنجا که باکتریهای مسئول عفونتهای مجرای ادراری به عنوان هسته مرکزی در ایجاد سنگهای کلیوی عمل می‌کند، هدف از این بررسی شناسایی انواع مختلفی از باکتریهاست که در تشکیل سنگهای عفونی در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان لبافی‌نژاد تهران دخالت دارند.

مواد و روشها

در این مطالعه محیط کشت پایه جهت رشد اولیه میکروارگانیسیمها محیط کشت T.S.B و تیوگلیکولات بود. در مراحل بعد برای رشد کلنی از محیط کشت بلا‌آگار، مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو استفاده شد. از یک پرسشنامه حاوی سؤالات دموگرافیک برای ارزیابی سوابق بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان لبافی‌نژاد استفاده شد.

سنگ ادراری توسط سنگ‌شکن خارجی ESWL (Extracorporeal shock wave lithotripsy) از بیماران خارج شده و بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه درون هاون چینی خرد شده و به محیط کشت مناسب اضافه می‌گردید. قطعه‌ای از سنگ هم برای تجزیه شیمیایی نگه داشته می‌شد.

نمونه خرد شده سنگ ادراری ابتدا در دو محیط T.S.B و تیوگلیکولات به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده و بعد بر روی محیطهای بلا‌آگار و مک‌کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو بطور یکنواخت و جداگانه کشت داده شد.

نمونه‌های کشت خطی در محیطهای مک‌کانکی آگار، بلا‌آگار و ائوزین متیلن بلو به مدت یک شبانه روز (۲۴ ساعت) در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد. سپس، محیطهای کشت بررسی شد و کلنیها جهت تعیین نوع گرم، شکل و اندازه مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم از نمونه رشد کرده، بررسی میکروسکوپی به عمل آمد. به منظور بررسی دقیق و شناسایی گونه و سویه متعلق به کلنیهای بررسی شده، علاوه بر مشاهده شکل، باکتریها از نظر بیوشیمیایی نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه شیمیایی سنگ توسط کیت آماده صبا صورت گرفت. در این روش، کلسیم به طریق تیترومتریک، اگزالات، فسفات، منیزیم، آمونیوم، اسید اوریک و سیستین به طریق کلریمتریک توسط رنگ‌سنجی ارزیابی شدند. از ارقام به دست آمده به کمک یک خط‌کش محاسبه مخصوص می‌توان به نوع سنگ مورد آزمایش پی برد.

یافته‌ها

این مطالعه به مدت ۳ ماه (اردیبهشت تا تیر ۱۳۸۳) بر روی بیماران بستری در بخش اورولوژی بیمارستان لبافی‌نژاد تهران انجام گرفت. ۱۰۰ بیمار شامل ۶۰ مرد و ۴۰ زن در این مطالعه وارد شدند.

در جدول ۱ توزیع جنسی و سنی بیماران آورده شده است. گروه سنی ۲۱-۳۰ سال در مردان و ۳۱-۴۰ سال در زنان از بیشترین درصد ابتلا به سنگ ادراری برخوردار بودند. اختلاف بین گروهها از نظر جنسی معنی‌دار بود ($p < 0.003$). در بیش از ۸۰٪ از بیماران زمینه ارثی برای ابتلا وجود داشت.

از میان ۱۰۰ نمونه کشت داده شده بر روی محیطهای بلا‌آگار، مک‌کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو باکتریها در ۴۰ مورد (۴۰٪) از نمونه‌ها رشد کردند. شایعترین میکروارگانیسیمهای جدا شده عبارتند از: E.coli (۳۷/۵٪)،

نتایج حاصل از انواع سنگهای ادراری بر حسب میکروارگانیسم در جدول ۴ آورده شده است. لازم به ذکر است مقایسه تنها بین سه گروه از سنگها (اگزالات کلسیم، اسید اوریک و مخلوط) صورت گرفته است. بر این اساس، اختلاف بین این سه گروه از لحاظ میکروارگانیسم معنی دار است ($p < 0.004$).

جدول ۳- مقایسه دو جنس از نظر فراوانی انواع سنگهای ادراری، بیمارستان لبافی نژاد*

نوع سنگ	مذکر	مونث	کل
کلسیم اگزالات	۱۱۸ (۳۰/۰)	۱۶ (۴۰/۰)	۳۴ (۳۴)
کلسیم فسفات	۳ (۵/۰)	۰	۳ (۳)
اسید اوریک	۲ (۳/۳)	۲ (۵/۰)	۴ (۴)
آمونیم منیزیم فسفات	۵ (۸/۳)	۱ (۲/۵)	۶ (۶)
مخلوط	۳۲ (۵۳/۳)	۲۱ (۵۲/۵)	۵۳ (۵۳)

* اختلاف بین دو گروه جنسی معنی دار نبود.

† اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

جدول ۴- مقایسه انواع سنگهای ادراری از نظر میکروارگانیسم، بیمارستان لبافی نژاد

کل	نوع سنگ			پاتوژن
	مخلوط	اسید اوریک	کلسیم اگزالات	
۱۵	۸	۰	۷	اشرشیاکلی
۷	۴	۱	۲	استاف اورئوس
۵	۱	۰	۴	کاندیدا آلبیکنس
۲	۲	۰	۰	استاف اپیدرمیدس
۴	۰	۳	۱	انتروباکتر
۴	۴	۰	۰	کلبسیلا
۲	۱	۰	۱	پروویدنسیا
۱	۱	۰	۰	باسیلوس سوبتیلیس

بحث

سنگ ادراری یک بیماری شایع در تمام جوامع بشری می باشد که عوامل متعددی در ایجاد آن نقش دارند. در تحقیق حاضر موارد زیر بررسی شد: شناسایی باکتری های بدست آمده از سنگهای ادراری بیماران و آنالیز سنگهای ادراری و تعیین نوع سنگ.

در این بررسی، محدوده سنی ۳۰-۲۱ سال در مردان و ۴۰-۳۱ سال در زنان بالاترین درصد ابتلا به سنگ ادراری را شامل می شد. در آمار منتشر شده در آمریکا، بالاترین درصد مبتلایان به سنگ کلیه ۵۰ سال و در مورد سنگهای حالب ۴۶ سال بود (۱۰). در مقایسه با آمار مذکور، سن متوسط بیماران ما یک دهه کمتر از بیماران آمریکایی می باشد، که این امر

استاف اورئوس (۱۷/۵٪)، کاندیدا آلبیکنس (۱۲٪)، انتروباکتر (۱۰٪)، کلبسیلا (۱۰٪)، پروویدنسیا (۵٪)، استاف اپیدرمیدس (۵٪) و باسیلوس سوبتیلیس (۲/۵٪).

جدول ۱- توزیع سنی افراد مبتلا به سنگ ادراری

گروه سنی (سال)	مرد	زن	کل
کمتر از ۲۰	۴ (۶/۷)*	۲ (۵/۰)	۶ (۶)
۲۱-۳۰	۲۶ (۴۳/۳)	۸ (۲۰/۰)	۳۴ (۳۴)
۳۱-۴۰	۹ (۱۵/۰)	۲۰ (۵۰/۰)	۲۹ (۲۹)
۴۱-۵۰	۱۱ (۱۸/۳)	۸ (۲۰/۰)	۱۹ (۱۹)
۵۱-۶۰	۶ (۱۰/۰)	۲ (۵/۰)	۸ (۸)
۶۱-۷۰	۴ (۶/۷)	۰	۴ (۴)

* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

نتایج حاصل از مقایسه فراوانی باکتری های بدست آمده از لحاظ میزان املاح موجود در سنگ ادراری در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه فراوانی انواع میکروارگانیسم ها از لحاظ میزان کلسیم و اسید اوریک موجود در سنگ ادراری

میکروارگانیسم	تعداد	میانگین رتبه برای کلسیم	میانگین رتبه برای اسید اوریک
اشرشیاکلی	۱۵	۲۷/۲۷	۱۳/۰۰
استاف اورئوس	۷	۱۸/۳۶	۳۱/۷۹
کاندیدا آلبیکنس	۵	۲۲/۹۰	۱۲/۰۰
انتروباکتر	۴	۸/۷۵	۲۵/۵۰
کلبسیلا	۴	۱۱/۷۵	۳۷/۱۳
پروویدنسیا	۲	۱۴/۷۵	۱۵/۷۵
استاف اپیدرمیدس	۲	۲۱/۲۵	۳۴/۰۰
باسیلوس سوبتیلیس	۱	۱۴/۰۰	۱۲/۰۰

بر اساس جدول فوق بین E.coli و اگزالات کلسیم با میانگین رتبه ۲۷/۲۷ و همچنین بین انتروباکتر و اسید اوریک با میانگین رتبه ۳۷/۱۳ ارتباط آماری معنی داری وجود دارد ($p < 0.004$).

نتایج حاصل از انواع سنگهای ادراری در کل جامعه مورد بررسی بر حسب جنس در جدول ۳ آورده شده است. اختلاف بین گروهها از نظر آماری معنی داری نیست. بر اساس نتایج بدست آمده بالاترین درصد سنگها (۵۳٪) مربوط به سنگهای مخلوط است.

کورینه باکتریوم، انتروباکتریوم و پروتئوس نیز از جمله پاتوژن‌های شایع بودند. در مطالعه Steyn و همکاران ارگانیس‌هایی چون اوره‌آپلازما اوره‌آلیتیکوم و باسیلوس سوبتیلیس جدا گردیدند (۱۵).

با توجه به این که در تحقیق حاضر، اشرشیاکولی بالاترین درصد باکتری جدا شده از بیماران واجد سنگ را تشکیل می‌داد و این باکتری قادر به تولید اوره‌آز نمی‌باشد این سؤال پیش می‌آید که آیا میکروارگانیس‌های تولیدکننده اوره‌آز برای تشکیل سنگهای عفونی ضروری نمی‌باشند؟ توضیح احتمالی در این خصوص این است که میکروارگانیس‌های تجزیه‌کننده اوره ابتدا به عنوان عفونت ناپایدار ظاهر شده و پس از تشکیل سنگ از بین رفته‌اند. احتمال دیگر آن است که سنگهای عفونی با وجود میکروارگانیس‌هایی که قادر به تولید اوره‌آز نیستند، تشکیل می‌شوند. و در نهایت می‌توان گفت سنگهای تشکیل شده از طریق عوامل غیرمیکروبی نظیر ترکیب شیمیایی ادرار، حالت پوششی مخاط مجرای ادرار، وجود یا فقدان عفونت در مجرای ادراری و غیره در بروز این حالت نقش دارند.

تفاوت‌های موجود بین این مطالعه با سایر مطالعات را می‌توان به نوع تغذیه و شرایط زندگی نسبت داد. بدون شک شرایط محیطی در میزان شیوع و جنس سنگهای ادراری در منطقه خاصی تاثیر فراوانی داشته و عدم تحرک افراد نیز عامل مهمی در تشکیل سنگهای ادراری به شمار می‌آید. همچنین به نظر می‌رسد وراثت زمینه ابتلا افراد به سنگهای ادراری را فراهم آورد (۱۱). شناسایی ترکیب سنگهای مجرای ادراری جهت درمان و جلوگیری از عود مجدد سنگها، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است.

در پایان میتوان اذعان نمود در بررسی حاضر باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز در کنار باکتری‌های فاقد اوره‌آز می‌توانند در تشکیل سنگ دخالت داشته باشند. بنابراین توصیه می‌شود کشت از ادرار همزمان با کشت سنگ انجام شود. با یافتن نوع میکروارگانیس‌م و درمان مناسب آنتی‌بیوتیکی می‌توان خطر عود مجدد سنگهای عفونی را کاهش داد. از طرف دیگر عفونت مجرای ادراری می‌تواند یکی از عوامل عمده در ایجاد سنگ باشد. بیماران مبتلا به عفونت‌های مزمن مجرای ادراری ممکن است باکتریوری مداوم با عفونت‌های عود کننده داشته باشند. این بیماران باید شناسایی و به طور کامل درمان شوند تا از بروز سنگ در آنها جلوگیری به عمل آید.

می‌تواند نشانگر شروع زودتر یا روند سریعتر سنگ‌سازی در جمعیت ایرانی باشد. اکثر مولفین حداکثر سن شیوع سنگهای ادراری را بین ۵۰-۳۰ سال عنوان کرده‌اند (۱۱).

شیوع سنگهای ادراری به طور معمول در مردان دو تا سه برابر شایعتر از زنان می‌باشد (۲). این امر تحت تاثیر هورمون‌های اندروژنی و استروژنی است (۱۲).

در تحقیق حاضر، از ۱۰۰ بیمار مبتلا به سنگ ادراری، در حدود ۴۰٪ کشت مثبت سنگ بدست آمد که با نتایج Soshangh و همکاران در شمال شرقی هند که از ۱۰۰ بیمار مبتلا به سنگ ادراری حدود ۴۲٪ کشت مثبت سنگ بدست آورده بودند، مطابقت دارد (۱۴).

درصد شیوع سنگهای استرویتی در نقاط مختلف جهان از ۲/۷٪ در هندوستان تا ۱۷/۴٪ در ژاپن گزارش شده است (۱۳). Nanbu و همکاران گزارش کردند سنگهای استروویت در زنان شایعتر است و علت آن را نفوذپذیری سریعتر و بیشتر دستگاه ادراری زنان عنوان کردند (۱۳). همچنین طی بررسی فوق عنوان شده است که کمتر از یک درصد از سنگهای کلیوی از یک ماده شیمیایی به نام سیستین تشکیل می‌شود. این سنگها ممکن است با درمان و مداوای پزشکی از بین بروند، اما در برخی موارد ممکن است بسیار سخت و غیرقابل نفوذ باشند (۱۳). با این همه در تحقیق حاضر، سنگ سیستینی دیده نشده است.

در پژوهش حاضر ۵۳٪ سنگها، سنگ مخلوط، ۳۴٪ کلسیم اگزالات، ۳٪ کلسیم فسفات، ۴٪ اسید اوریک و ۶٪ سنگ عفونی بدست آمد.

Sohshang و همکاران در بررسیهایی که بر روی ۱۰۰ سنگ ادراری در هند انجام دادند، از کلسیم بعنوان شایعترین ماده موجود در سنگها نام بردند (۱۴). در تحقیق مذکور، سنگهای مخلوط و استرویتی در مراتب بعدی جای داشتند و سنگهای اسیداوریکی کمترین درصد را شامل می‌شدند (۱۴).

در مطالعه Nanbu و همکاران، حدود ۸۰٪ سنگهای کلیه از جنس کلسیم و ترکیبات آن بود، به طوری که اگزالات کلسیم، فسفات کلسیم و دیگر مواد معدنی نیز در ساختار و ترکیبات آنها وجود داشتند (۱۳).

در مطالعه Kaya و همکاران، ۸۴/۷٪ سنگها از جنس کلسیم، ۸/۳٪ اسید اوریک و ۶/۹٪ سنگهای عفونی بودند (۸).

در برخی مطالعات، شایعترین ارگانیس‌م موجود در سنگها، اشرشیاکولی گزارش شده است (۸، ۱۴) که با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین در این تحقیقات ارگانیس‌هایی نظیر استافیلوکوک کواگولاز مثبت و کواگولاز منفی، کلبسیلا،

REFERENCES

1. Balaji KC, Menon M. Mechanism of stone formation. *Urol Clin North Am* 1997;24(1):1-11.
2. Lindbloom EJ, Chang SI. What is the best test to diagnose urinary tract stones? *J Family Prac* 2001;50(8):657-8.
3. Wore Cester EM. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol* 1996;16(5):474-86.
4. Mandell VS, Mandell J, Gaisie G. Pediatric urologic radiology intervention and endourology. *Urol Clin North Am* 1985;12(1):151-68.
5. Friesen A, Stern J, Hofstetter A. Kidney calculi formation in candidiasis. *Mykosen* 1983;26(4):207-15.
6. Torzewski KA, Staczek P, Rozalski A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of proteus endotoxin polysaccharids. *J Med Microbiol* 2003;52(6):471-7.
7. Rangi E, Coulange C. Microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):368-72.
8. Kaya S, Poyraz O, Gokce G, Kilicarslan H, Kaya K, Ayan S. Role of genital mycoplasmas and other bacteria in urolithiasis. *Scand J Infect Dis* 2004;35(5):315-7.
9. Giannakopoulos X, Evangelou A. Urinary infection in urolithiasis patients in the Epirus district. *Ann Urol* 1996;30(3):118-30.
10. Kim H, Cheigh JS, Ham HW. Urinary stone following renal transplantation. *Korean Intern Med* 2001;16(2):118-27.
11. Andrew J, Porits Chandru P, Sundaram A. Diagnosis and initial management of kidney stone. *Am Family Physician* 2001;63:1329-38.
12. Fin Layson B. Symposium on renal lithiasis. *Urol Clin North Am* 1974;1(2):181-212.
13. Nanbu A, Nitta T, Koroku M. Characteristics of patients with staghorn calculi in our experience. *Int J Urol* 2004;11(5):276-81.
14. Sohshang HL, Singh MA, Sing NG, Singh SR. Biochemical and bacteriological study of urinary calculi. *J Commun Dis* 2002;32(3):216-21.
15. Steyn PL, Pols A, Toit PJ. Effects of bacteria involved with the pathogenesis of infection-induced urolithiasis on the urokinase and Salidase activity. *Urol Res* 2000;20(6):393-7.