



Open Access Journal
e-ISSN: 2619 – 9041

Araştırma Makalesi (Research Article)

Cilt 6 - Sayı 4: 726-729 / Ekim 2023

(Volume 6 - Issue 4: 726-729 / October 2023)

EKSTRAKSİYON İÇERMEYEN PCR BAZLI SARS-COV-2 TESTİ İÇİN TÜKÜRÜK ÖRNEĞİ VE NAZOFARİNGEAL SÜRÜNTÜ ÖRNEK ALMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Burcu GÜRER GİRAY^{1,2*}, Gökçe GÜVEN AÇIK², Efdal OKTAY GÜLTEKİN³

¹Yalova University Medical School Medical Microbiology Department, 77200, Yalova, Türkiye

²Ankara Provincial Health Directorate Public Health Molecular Diagnosis Laboratory, 06230, Ankara, Türkiye

³Toros University, Health Services Vocational School, Department of Medical Services and Techniques, 33140, Mersin, Türkiye

Özet: Günümüzde COVID-19'un kesin tanısı için en önemli yöntem, nazofaringeal sürüntü (NS) örneklerinde şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) RNA'sının RT-PCR ile tanımlanmasıdır. Nazofaringeal sürüntü örneğinin alınması bazen olumsuz etkileri olan rahatsız edici bir işlem olup, örnekleme yapan sağlık personeli için de enfeksiyon riski oluşturmaktadır. SARS-CoV-2 tanısında tükürük örneğini kullanmak NS'ye göre daha az invaziv alternatif bir yöntemdir. Altın standart NS ile tükürük protokollerinin uyumunu değerlendiren çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, PCR bazlı SARS-CoV-2 tanısında, sağlık çalışanı tarafından alınan NS örneği ile tükürük örneği ve kişinin kendinden NS alma yöntemini karşılaştırmaktır. 2178 hastadan alınan tükürük ve NS örnekleme çeşitleri SARS-CoV-2 varlığı açısından RT-PCR ile analiz edilmiştir. Örneklerden en az birinde SARS-CoV-2 tespit edilen 684 hastanın, sağlık çalışanı tarafından alınan NS örneğinin 606'sı (%88,59), kişinin kendinden aldığı NS örneğinin 402'si (%58,77) ve tükürük örneğinin 456'sı (%66,66) pozitif bulunmuştur. Kişinin kendinden aldığı NS örneği ve tükürük örneklerinin kullanılabilirliği istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. NS örneklerini alternatif yöntemin olması hastaları invaziv ve ağrılı bir işlemden kurtaracak ve örnek alan sağlık personelinin enfeksiyon riskini azaltacaktır. SARS-CoV-2 tanısında tükürük örneklerinin ya da kişinin kendinden aldığı NS örneğinin test için kullanımı, hastanelerin iş yükünü azaltabilir, test sonuçlarının süresini kısaltabilir, asemptomatik popülasyonları test etmek için daha fazla kapasite sağlayarak enfekte hastaların hızlı bir şekilde izolasyonunu sağlayabilecektir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, Tükürük, Nazofaringeal Sürüntü, RT-PCR

Comparison of Saliva Sample and Nasopharyngeal Swab Sampling Methods for Non-Extraction PCR-Based SARS-CoV-2 Testing

Abstract: Currently, the most important method for the definitive diagnosis of COVID-19 is the identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in nasopharyngeal swab (NS) samples by RT-PCR. Taking a nasopharyngeal swab sample is an uncomfortable procedure that sometimes has adverse effects, and poses a risk of infection for the health personnel performing the sampling. Using a saliva sample in the diagnosis of SARS-CoV-2 is a less invasive alternative method compared to NS. Studies evaluating the compatibility of the gold standard NS and salivary protocols are limited in literature. The aim of this study is to compare the NS sample taken by the healthcare worker with the saliva sample and the method of self NS taking in the PCR-based diagnosis of SARS-CoV-2 RNA. NS and Saliva variant samples of 2178 patients were tested against SARS-CoV-2 by RT-PCR. 684 SARS-CoV-2 patients were identified in at least one of their samples, 606 (88.59%) of the NS sample taken by the healthcare worker, 402 (58.77%) of the NS sample taken by the individual and 456 of the saliva sample (66.66%) were found to be positive. It was found statistically significant that the NS sample and saliva samples taken from the person could be used. Being able to collect NS samples with different procedures those substitute one another will extricate patients from a disturbing and hurting methods and lessen infection risk for healthcare personnel collecting samples. Using self-acquired NS samples or saliva samples to test SARS-CoV-2 presence will dial down the hospital burden, decrease time for test results, accommodate more capacity to diagnose asymptomatic populations, and enable swift isolation of infected patients.

Keywords: SARS-CoV-2, Saliva, Nasopharyngeal Swabs, RT-PCR

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Yalova University Medical School Medical Microbiology Department, 77200, Yalova, Türkiye

E mail: burcu.giray@yalova.edu.tr (B. GÜRER GİRAY)

Burcu GÜRER GİRAY <https://orcid.org/0000-0003-3165-8924>

Gökçe GÜVEN AÇIK <https://orcid.org/0000-0001-9788-9480>

Efdal OKTAY GÜLTEKİN <https://orcid.org/0000-0002-0962-152X>

Gönderi: 30 Ağustos 2023

Kabul: 02 Ekim 2023

Yayınlanma: 15 Ekim 2023

Received: August 30, 2023

Accepted: October 02, 2023

Published: October 15, 2023

Cite as: Gürer Giray B, Güven Açık G, Oktay Gültekin E. 2023. Comparison of Saliva sample and nasopharyngeal swab sampling methods for non-extraction PCR-based SARS-CoV-2 testing. BSJ Health Sci, 6(4): 726-729.

1. Giriş

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2)'nin etkeni olduğu koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-2019), Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde

etiyojisi belirsiz pnömonilerle başlayarak kısa sürede dünyaya hızla yayılan ve Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından pandemisi ilan edilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Hem asemptomatik hem de



semptomatik bireylerin virüsü bulaştırabilmesi nedeniyle SARS-CoV-2'nin yayılmasını kontrol altına almak dünya çapında halen önemli bir sorun oluşturmaktadır (Huff and Singh, 2020). Çapraz bulaşmayı kontrol altına alabilmek için SARS-CoV-2 tanı testleriyle temaslı takibi yapmak önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. SARS-CoV-2 tanısında altın standart, ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT- qPCR) ile nükleik asit varlığının tespitidir (Liu et al., 2020). Solunum yolu enfeksiyonları ajanlarının tanısında nazofaringeal sürüntü örneklerinin kullanılmasından dolayı COVID-19 pandemisinin başından itibaren örnekleme prosedürü olarak nazofaringeal sürüntü örneği benimsenmiştir (Lieberman et al., 2009; Li et al., 2013). Bununla birlikte, nazofaringeal sürüntü örneği alma işlemi invaziv bir girişimdir. Bu sebeple hastalar için bazen ciddi komplikasyonlara yol açan ağırlı bir süreç haline gelebilmektedir. Örnek alma işlemi esnasında hasta öksürebilmekte, hapsirebilmektedir. Meydana gelen bu etkiler nazofaringeal sürüntü örneği alma prosedürünü yürüten sağlık uzmanlarına enfeksiyon ajanının bulaşma riskini arttırmaktadır (Kim et al., 2016). Nazofaringeal sürüntü örneği alınan kişilerde işlemden sonra 24 saate kadar devam edebilen burun kanaması, baş ağrıları ve kulak ağrıları gibi komplikasyonlar da meydana gelebilir. Meydana gelen bu komplikasyonlar, örnek alınan kişilerden gerektiğinde örnek alma prosedürünün yeniden gerçekleştirilmesine ve tanı testlerin ardarda yapılmasına engel olabilir (Gopaul et al., 2020; Mughal et al., 2020; Gupta et al., 2021)

Yapılan bu çalışmada COVID-19 şüphesiyle laboratuvara SARS-CoV-2 viral RNA tespiti için başvuran kişilerden uzman sağlık çalışanları tarafından nazofaringeal sürüntü örneklemesine alternatif olarak kendi kendilerinden nazofaringeal sürüntü alma ve tükürük verme yöntemlerinin COVID-19 tanısı için kullanılma uygunluğunu araştırarak bu yöntemleri karşılaştırmayı amaçladık.

2. Materyal ve Yöntem

Sağlık çalışanları tarafından alınan nazofaringeal sürüntü, kişilerin kendisinden aldığı nazofaringeal sürüntü ve tükürük örnekleri, RNA ekstraksiyonu olmadan, ticari DS CORONEX COVID-19 Multiplex RT-qPCR tanı kitleri (DS Bio ve Nano Tek, Ankara, Türkiye) kullanılarak doğrudan RT-PCR ile SARS-CoV-2 varlığı açısından analiz edildi. Çalışmaya, Ankara İl Sağlık Müdürlüğü Moleküler Tanı Laboratuvarı'na COVID-19 şüphesiyle SARS-CoV-2 viral RNA tespiti testi yaptırmak için başvuran 18 yaş üstü toplam 2178 gönüllü dahil edildi. Sağlık çalışanları tarafından nazofaringeal sürüntü örnekleri alındıktan sonra, hastalardan ayna karşısında kendi kendilerinden sürüntü çubuğu ile örnek almaları ve Viral Nükleik Asit Tamponu (vNAT) içerisine çubuğu koymaları istendi. Ardından vNAT tüpü içerisine yavaşça tükürmeleri istendi.

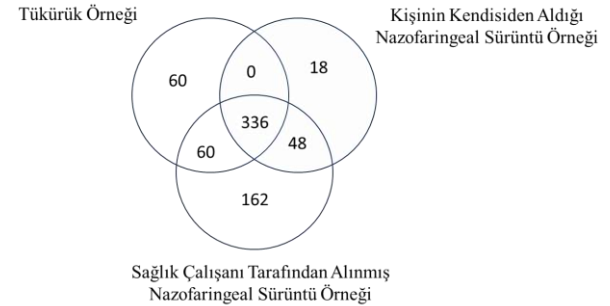
2.1. İstatistik Analiz

Pearson Ki-kare testi 2178 adet nazofaringeal sürüntü örneği, kişinin kendisinden aldığı nazofaringeal sürüntü örneği ve tükürük örneği olmak üzere üç nominal ölçüm seviyesinde gerçekleştirilmiştir: Bu durumda bağımsız değişken COVID-19 tanısı için test yöntemi, bağımlı değişken pozitif ve negatif olmak üzere iki seviyeli test sonucu olarak hesaplanmıştır (Önder, 2018).

3. Bulgular

684 örnekte, üç örnek alma türünden en az birinde SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilmiştir. Toplam RT-PCR-pozitif hastaların 606'sında (%88,6) sağlık çalışanı tarafından alınmış nazofaringeal sürüntü örneğinde, 402'sinde (%58,8) kişinin kendisinden aldığı nazofaringeal sürüntü örneğinde ve 456'sında (%66,7) tükürük örneğinde pozitiflik saptanmıştır (Şekil 1). Kişinin kendisinden aldığı nazofaringeal sürüntü örneği negatifken sağlık çalışanı tarafından alınmış nazofaringeal sürüntü örneği ve tükürük örneğinde SARS-CoV-2 pozitif olan 60 örnek bulunmuştur.

Sağlık çalışanı tarafından alınmış nazofaringeal sürüntü örneği ve tükürük örneklerinin oranı anlamlı olarak farklı bulunmuştur (Pearson Ki-kare 178,15; $P=0,00008$; $P>0,05$). Tükürük örneği ve kişinin kendisinden aldığı örneklerde iki test yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Pearson Ki-kare: 167,73; $P=0,00$; $P>0,05$).



Şekil 1. Sağlık çalışanı tarafından alınmış nazofaringeal sürüntü örneği, kişinin kendisinden aldığı nazofaringeal sürüntü örneği ve tükürük örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'sının RT-PCR yöntemiyle tespiti.

4. Tartışma

COVID-19, insanlık tarihindeki en yıkıcı salgınlardan biri olmuştur. Tüm pandemik hastalıklarda olduğu gibi, enfeksiyöz etkeni taşıyan kişilerin hızlı bir şekilde teşhis edilmesi ve hastalığı sağlıklı kişilere bulaştırmadan önce karantina altına alınmaları, geniş popülasyonlarda hastalığın kontrol altına alınmasında oldukça önemli rol oynamaktadır (Nicola et al., 2020). Günümüzde PCR, COVID-19'un hızlı ve doğru tansında ana teşhis aracıdır (Tang et al., 2020; Afzal et al., 2020). SARS-CoV-2'yi saptamak için altın standart testin, nazofaringeal sürüntü ile elde edilen bir numunenin RT-PCR ile analizi olduğu kabul edilir. Bu nedenle, PCR için örnek almak için en

yaygın kullanılan uygulama nazofaringeal sürüntüdür. Bununla birlikte, çok rahatsız edici olmanın yanı sıra, nazofaringeal sürüntü örneklemeyle ilişkili, vakaların %8,3'ünde epistaksis dahil olmak üzere birçok yan etki bildirilmiştir. Ek olarak, nazofaringeal sürüntü örnekleme, başvuru oranının yüksek olduğu merkezlerde her gün onlarca ila yüzlerce örnekleme yapmak zorunda olan sağlık personeline virüsün bulaşması açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Gopaul et al., 2020; Gupta et al., 2021).

Tükürük örneğinde SARS-CoV-2 testi yapabilmek, nazofaringeal örnek alma yöntemiyle gerçekleştirilene göre daha kolaydır (Vaz et al., 2020; Tan et al., 2021). Ağız boşluğundaki epitel hücrelerinin, SARS-CoV-2'nin girişinde ve replikasyonunda anahtar rol oynayan büyük miktarda ACE2 reseptörü eksprese ettiği gösterilmiştir. COVID-19 hastalarının tükürük örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'sının bulunması beklenir (Xu et al., 2020). Nazofarenks ve orofarinks fiziksel olarak birbirinden ayrı değildir ve nazofarenksteki salgıların oral salgılara karışacağını düşünmek mantıklıdır. Ek olarak, kandaki virüs parçacıkları ağız boşluğunda üretilen eksüdalara geçebilir. Yapılan çalışmalar COVID-19 hastalarının tükürüğünde SARS-CoV-2 RNA'sının bulunduğunu göstermiştir. Tükürük örneklerinin RT-PCR analizinin duyarlılığı, nazofaringeal sürüntülerle yapılan standart tanıya kıyasla COVID-19 için %66 ila %92 arasındadır (Azzi et al., 2020, Fernandes et al., 2020). Yapılan bir çalışmada COVID-19 tanısı için sağlık çalışanları tarafından alınan nazofaringeal sürüntü örneklerine bir alternatif olarak kendi kendine alınan ağız çalkalama suları örnekleri karşılaştırılmıştır. Ağız çalkalama suları örneklerinin pozitif olma ihtimalini, tükürük ve nazofaringeal sürüntü örneklerinden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle uzun süre saklanan örneklerde, SARS-CoV-2 RNA'sının stabilitesinin, ağız çalkalama suyu örneklerinde nazofaringeal sürüntü örneklerine göre çok daha iyi korunduğu gösterilmiştir (Goldfarb et al., 2021). Diğer solunum yolu patojenlerinin saptanmasına yönelik yapılan çalışmalarda, ağız çalkalama suyu örneklerinin boğazdan alınan sürüntü örneklerinden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Bennett et al., 2017). Bu çalışmada COVID-19 tanısında nazofaringeal sürüntü örnekleri yerine kişinin kendisinde nazofaringeal sürüntü alması ve tükürük örneği vermesi karşılaştırılmıştır. Örnekleme sırasında virüs gerçekten sadece nazofaringeal veya orofaringeal boşlukta bulunuyorsa veya örneklerin düzgün şekilde alınmasında bir sorun varsa, daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Halihazırda PCR yönteminden daha iyi duyarlılığa sahip bir tanı yöntemi olmadığı ve hastaların klinik takip verilerine ulaşamadığı için bu çalışmada bu mümkün olmamıştır. Tükürük örneği ve kişinin kendisinden nazofaringeal sürüntü örneği alması çok daha kolay olmasına rağmen, bu yaklaşım yalnızca test edilen kişi bunları gerçekleştirebiliyorsa uygulanabilir örnek alma yöntemleri olur. Bu işlemleri gerçekleştiremeyen

hastalarda (yutma güçlüğü, demans veya bebekler) sağlık çalışanı tarafından nazofaringeal sürüntü örneği alınmalıdır. Sağlık çalışanı tarafından nazofaringeal sürüntü örneği alınması yerine kişinin kendisinden sürüntü örneği alması hasta uyumunu artıracak, örnek almanın olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak, örnek alan sağlık personelinin enfeksiyon riskini önemli ölçüde azaltacak ve sağlık merkezlerinin iş yükünü belirgin şekilde azaltacaktır. Yapılan çalışmalarda sağlık çalışanı tarafından alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri ve tükürük örneklerinin Ct değerleri arasında güçlü bir korelasyon gözlemlenmiştir (Braz-Silva et al., 2020; Mahmoud et al., 2021).

5. Sonuç

COVID-19 pandemisi gibi üst solunum yolu örnekleriyle laboratuvar tanısına gidilen enfeksiyonlarda, kişinin kendisinden farklı örnek alma yöntemlerinin tanımlanması sağlık çalışanlarına çapraz bulaş riskini azaltmanın yanı sıra, kullanılan kişisel koruyucu ekipman kaynağının azaltılması, örnek vermek için sağlık merkezlerinde uzun kuyrukların oluşmaması şeklinde çeşitli avantajlar sunar. Bu avantajlar, patojeni tarama girişiminin uzun vadeli başarısında önemli bir rol oynayacağı gibi hastalardan daha az invaziv ve seri bir şekilde örnek alınması sürveyans programının geliştirilmesi konusunda oldukça önemlidir. Bu amaçla yapılan ve daha fazla yöntemin değerlendirileceği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Katkı Oranı Beyanı

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	B.G.G.	G.G.A.	E.O.G.
K	50	25	25
T	50	25	25
Y	50	25	25
VTI	25	25	50
VAY		50	50
KT	20	40	40
YZ	100		
KI	25	50	25
GR	50	25	25
PY	40	30	30

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi.

Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Etik Onay/Hasta Onamı

Bu çalışma Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından onaylanmıştır (onay tarihi: 09 Aralık

2022, onay numarası: 2022-57). Bu çalışmaya dahil olan tüm katılımcılar bilgilendirilmiş gönüllü olur formuyla yazılı onam vermiştir.

Destek, Teşekkür ve Bilgi Beyanı

Yapılan bu çalışmadaki verilerin bir kısmı, 10-12 Haziran 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilen 1. Uluslararası / 4. Ulusal Sağlık Hizmetleri Kongresi (INHSC2022)'nde özet olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Afzal A. 2020. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: limitations and challenges. *J Adv Res*, 26: 149-159.
- Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A. 2020. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*, 81: e45-e50.
- Bennett S, Davidson RS, Gunson RN. 2017. Comparison of gargle samples and throat swab samples for the detection of respiratory pathogens. *J Virol Meth*, 248: 83-86.
- Braz-Silva PH, Mamana AC, Romano CM. 2020. Performance of at-home self-collected saliva and nasal-oropharyngeal swabs in the surveillance of COVID-19. *J Oral Microbiol*, 13(1): 1858002.
- Fernandes LL, Pacheco VB, Borges L, Athwal HK, de Paula EF, Bezinelli L. 2020. Saliva in the diagnosis of COVID-19: a review and new research directions. *J Dent Res*, 99: 1435-1443.
- Goldfarb DM, Tilley P, Al-Rawahi GN, Srigley JA, Ford G, Pedersen H. 2021. Self-collected saline gargle samples as an alternative to health care worker-collected nasopharyngeal swabs for COVID-19 diagnosis in outpatients. *J Clin Microbiol*, 59(4): e02427-e2520.
- Gopaul R, Davis J, Gangai L, Goetz L. 2020. Practical diagnostic accuracy of nasopharyngeal swab testing for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *West J Emerg Med*, 21(6): 1. DOI: 10.5811/westjem.2020.8.48420:1-4.
- Gupta K, Bellino PM, Charness ME. 2021. Adverse effects of nasopharyngeal swabs: Three-dimensional printed versus commercial swabs. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 42(5): 641-642.
- Huff HV, Singh A. 2020. Asymptomatic transmission during the Coronavirus disease 2019 pandemic and implications for public health strategies. *Clin Infect Dis*, 71(10): 2752-2756.
- Kim YG, Yun SG, Kim MY. 2016. Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab specimens for detection of respiratory viruses by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 55(1): 226-233.
- Li L, Chen QY, Li YY. 2013. Comparison among nasopharyngeal swab, nasal wash, and oropharyngeal swab for respiratory virus detection in adults with acute pharyngitis. *BMC Infect Dis*, 13: 281.
- Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A. 2009. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol*, 47(11): 3439-3443.
- Liu R, Han H, Liu F. 2020. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*, 505: 172-175.
- Mahmoud SA, Ganesan S, Ibrahim E. 2021. Evaluation of RNA extraction free method for detection of SARS-COV-2 in salivary samples for mass screening for COVID-19. *Biomed Res Int*, 2021: 5568350.
- Mughal Z, Luff E, Okonkwo O, Hall CEJ. 2020. Test, test, test-a complication of testing for coronavirus disease 2019 with nasal swabs. *J Laryngol Otol*, 134: 646-649.
- Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, Agha M, Agha R. 2020. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): a review. *Int J Surg*, 78: 185-193.
- Önder H. 2018. Nonparametric statistical methods used in biological experiments. *BSJ Eng Sci*, 1(1): 1-6.
- Tan SH, Allicock O, Armstrong-Hough M. 2021. Saliva as a gold-standard sample for SARS-CoV-2 detection. *Lancet Respir Med*, 9(6): 562-564.
- Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. 2020. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol*, 58: 1-22.
- Vaz SN, de Santana DS, Netto EM. 2020. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Brazilian J Infect Dis*, 24(5): 422-427.
- Xu K, Chen Y, Yuan J, Yi P, Ding C, Wu W. 2020. Factors associated with prolonged viral RNA shedding in patients with Coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*, 71: 799-806.