

Original

Actividad del voriconazol sobre levaduras aisladas de hemocultivo determinada por dos métodos

E. Cantón¹, J. Pemán², M. Bosch², A. Viudes³ y M. Gobernado²

¹Unidad de Microbiología Experimental del Centro de Investigación,

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia; ³Unidad Médica, Pfizer, Madrid

RESUMEN

Se ha determinado la actividad in vitro del voriconazol por dos métodos: el de referencia M27-A2 y el colorimétrico comercializado Sensititre YeastOne®. Se ha calculado la concordancia (± 2 diluciones) y la correlación entre métodos, así como el porcentaje de errores. Se ensayaron 144 cepas (47 *Candida albicans*, 52 *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, 10 *C. krusei*, 9 *C. glabrata*, 2 *C. guilliermondii*, 1 *C. colliculosa*, 1 *C. dubliniensis*, 2 *Trichosporum asahii*, 1 *T. mucoides*, 1 *Trichosporum spp.*, 1 *Kloakera apis*, 2 *Pichia ohmeri* y 2 *Rhodotorula glutinis*) aisladas de hemocultivo desde septiembre de 2002 hasta mayo de 2005. El voriconazol mostró muy buena actividad. La tasa de sensibilidad (CMI ≤ 1 mg/l) fue del 97% y la CMI₉₀ de 0,25 mg/l por los dos métodos. La concordancia entre métodos fue del 86% (44,23% a 100%) y el coeficiente de correlación de Pearson fue 0,961. La concordancia por categorías dependió de la especie, entre el 84,6% para levaduras emergentes y el 100% para el resto de las especies excepto *C. glabrata* (66,6%). El porcentaje de errores leves fue del 1,38%. Una cepa de *C. tropicalis* y otra de *C. glabrata* fueron resistentes al voriconazol (CMI ≥ 4 mg/l) por el método de referencia (1,38%). No se detectaron errores graves ni muy graves. El método colorimétrico identificó bien la cepa de *C. tropicalis*, y clasificó como sensible dependiendo de la dosis la de *C. glabrata*. El método colorimétrico es adecuado para estudiar la sensibilidad al voriconazol. Identifica bien las cepas sensibles (100% concordancia). No obstante, se necesitan más estudios con mayor número de cepas resistentes para determinar su capacidad de identificarlas, objetivo de las pruebas de sensibilidad.

Palabras clave: Voriconazol - M27-A2 - Sensititre YeastOne® - Levaduras - Sensibilidad

Activity of voriconazole against yeasts isolated from blood culture determined by two methods

SUMMARY

The in vitro activity of voriconazole has been determined by two methods: the reference M27-A2 and the marketed Sensititre YeastOne® microdilution colorimetric method. The agreement (± 2 dilutions) and correlation between methods as well as the percentage of errors has been determined. A total of 144 yeasts (47 *Candida albicans*, 52 *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, 10 *C. krusei*, 9 *C. glabrata*, 2 *C. guilliermondii*, 1 *C. colliculosa*, 1 *C. dubliniensis*, 2 *Trichosporum asahii*, 1 *T. mucoides*, 1 *Trichosporum spp.*, 1 *Kloakera apis*, 2 *Pichia ohmeri*, and 2 *Rhodotorula glutinis*) isolated from blood culture between October 2002 and May 2005 were assayed. Voriconazole has shown good in vitro activity. The rate of voriconazole-susceptible (MIC ≤ 1 mg/l) strains was 97% and the MIC₉₀ 0.25 mg/l by the two methods. The overall percentage of agreement between methods was 86% (range 44.23-100%) and the Pearson's coefficient of correlation was 0.961. Categorical agreement was strain dependent and ranged from 84.6% for emergent yeasts to 100% for the other species tested except for *C. glabrata* (66.6%). No major or very major errors were found, the percentage of minor errors being 1.38%. Only one *C. tropicalis* and one *C. glabrata* strain were resistant (MIC ≥ 4 mg/l) to voriconazole (1.38%) by the reference method. The colorimetric method identified the voriconazole-resistant *C. tropicalis* strain, and classified the *C. glabrata* as susceptible-dose dependent. The colorimetric method is a potential alternative method for testing the susceptibility of yeast in a clinical laboratory and identifies the susceptible strains (100% agreement) very well. Nevertheless, further studies including more voriconazole-resistant strains are required to determine the ability of the method to identify resistance, which is the goal of susceptibility tests.

Key words: Voriconazole - M27-A2 - Sensititre YeastOne® - Yeasts - Susceptibility

INTRODUCCIÓN

El aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas, así como la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos comercializados, ha propulsado la búsqueda de nuevos antifúngicos más activos y con unos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que los hagan menos tóxicos. Además, el fluconazol, que es el agente empleado en la profilaxis antifúngica en los pacientes inmunodeprimidos, no tiene actividad sobre *Aspergillus* spp., tan frecuente en estos casos (1-6).

El voriconazol es un nuevo triazol, derivado del fluconazol, autorizado en Europa por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para uso hospitalario desde el 9 de marzo de 2002, para el tratamiento de la candidemia invasora, las infecciones graves por *Candida* spp. resistentes al fluconazol (incluyendo *C. krusei*), la aspergilosis invasora y las infecciones graves por *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp.; en enero de 2005 se ampliaron sus indicaciones al tratamiento de las candidemias en pacientes no neutropénicos (7, 8). El voriconazol se puede administrar por vía oral o parenteral. Posee un amplio espectro de actividad, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp., incluyendo cepas con resistencia intrínseca al fluconazol, como *C. krusei*, *C. novyensis* y *C. inconspicua*, o con resistencia adquirida, y sobre *Aspergillus* spp. (9-12).

La realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos está indicada en las micosis invasoras, las micosis orofaríngeas que no responden al tratamiento y las producidas por patógenos fúngicos emergentes. Desde 1997 se dispone de un método estandarizado por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), ahora *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), para determinar la sensibilidad de las levaduras (documento M27-A2) (13) y los hongos filamentosos (documento M38-A) (14). Sin embargo, la preparación de las diluciones de antifúngicos por estos métodos es laboriosa y requiere mucho tiempo. Por ello, se han desarrollado métodos más sencillos y prácticos para un laboratorio clínico, como el *E-test*[®] y el método colorimétrico *Sensititre YeastOne*[®]. Este último consiste en una placa de 96 pocillos que llevan incorporados diluciones dobles seriadas de los antifúngicos deshidratados en pocillos individuales (amfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, 5-fluorocitosina y, desde septiembre de 2002, voriconazol). Está basado en el método de microdilución M27-A2, al que se ha incorporado glucosa y un indicador de crecimiento de oxi-reducción (azul de Alamar).

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la actividad *in vitro* del voriconazol sobre levaduras aisladas de hemocultivo entre octubre de 2002 y mayo de 2005 por el método de referencia y por el método colorimétrico *Sen-*

sititre YeastOne[®], y establecer la correlación entre ambos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Organismos

Se estudiaron un total de 144 levaduras pertenecientes a cinco géneros distintos: 47 *Candida albicans*, 52 *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, 10 *C. krusei*, 9 *C. glabrata*, 4 *Trichosporum* spp., 2 *Pichia ohmeri*, 2 *Rhodotorula glutinis*, 1 *Kloeckera apis*, 2 *C. guilliermondii*, 1 *C. colliculosa* y 1 *C. dubliniensis*. Las cepas se aislaron de hemocultivos y se identificaron mediante el sistema *VITEK2*[®] (BioMérieux Inc.). Las cepas se conservaron en suspensión acuosa a temperatura ambiente hasta su utilización, y se les realizaron dos pases consecutivos en agar de Sabouraud glucosa (Difco) antes de determinar su sensibilidad por el método de referencia M27-A2 (13).

Antifúngicos

El voriconazol se obtuvo por gentileza del laboratorio Pfizer Inc., como polvo valorado. Se preparó una solución inicial de 1600 mg/l en dimetilsulfóxido (DMSO), que se almacenó en alícuotas a -70 °C hasta su utilización (antes de tres meses). Las concentraciones ensayadas fueron de 0,016 mg/l a 8 mg/l.

Estudio de la sensibilidad

La sensibilidad al voriconazol se determinó por dos métodos de microdilución: el método de referencia M27-A2 (13) y *Sensititre YeastOne*[®] (Trek Diagnostic System Ltd., Inglaterra).

En cada ensayo se incluyeron como control de calidad las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 (13).

Método M27-A2

La CMI se determinó siguiendo las indicaciones del CLSI (13). Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 (RPMI) (Sigma Aldrich, Madrid) con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma) 0,164 M y a pH 7 ± 0,1. Las concentraciones de antifúngico se prepararon por el método de las diluciones dobles aditivas. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en SDA, resuspendiendo las levaduras en agua destilada, ajustando a una densidad óptica de 0,5 McFarland en un espectrofotómetro (530 nm) y con posterior dilución 1:1000 con RPMI (concentración final en las placas de 0,5 × 10³ a 2,5 × 10³ UFC/ml). El tamaño del inóculo se comprobó mediante la siembra de 10 µl

del pocillo control de crecimiento en *CHROMagar™ Candida* (CHROMagar, Paris, Francia). Las placas se incubaron a 35 °C y se realizó lectura visual a las 24 y 48 horas. Como CMI se consideró la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ respecto al crecimiento control tras 48 horas de incubación, determinada visualmente.

Método colorimétrico Sensititre YeastOne®

Los pocillos se rehidrataron añadiendo a cada uno 100 μ l de una suspensión de levaduras (aproximadamente 1×10^3 UFC/ml) preparada siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez llenas las placas se sellaron e incubaron a 35 °C durante 24 horas. Antes de leer las placas se comprobó que el pocillo control de crecimiento hubiera virado a color rosa (crecimiento); en caso contrario se dejó hasta que hubiera crecimiento.

Como CMI se consideró la concentración del primer pocillo de color azul (no crecimiento) o púrpura (ligero crecimiento) tras 24 horas de incubación.

Análisis de los datos

Con cada método se determinó el intervalo de concentraciones, la media geométrica de la CMI y la concentración que inhibía al 50% (CMI₅₀) y al 90% (CMI₉₀). Las CMI obtenidas por el método colorimétrico a las 24 horas se compararon con las del método de referencia a las 48

horas. En el análisis se incluyeron todos los resultados; los valores fuera de escala, por ejemplo ≥ 16 mg/l o $\leq 0,008$ mg/l, se dejaron como 16 y 0,008 mg/l, respectivamente.

Para calcular el porcentaje de concordancia entre los dos métodos se consideró el mismo resultado cuando la diferencia entre el par de CMI comparado era ≤ 2 diluciones logarítmicas en base 2. Las cepas se consideraron sensibles al voriconazol cuando la CMI fue ≤ 1 mg/l, sensibles dependiendo de la dosis cuando la CMI = 2 mg/l, y resistentes si la CMI ≥ 4 mg/l (*Minute of CLSI Antifungal Subcommittee Meeting*, 2005) (15). Se definió como error muy grave cuando la cepa fue resistente por el método de referencia y sensible por el colorimétrico; error grave cuando fue sensible por el método de referencia y resistente por el colorimétrico; error leve cuando por uno de los métodos era sensible o resistente y por el otro sensible dependiendo de la dosis. También se realizó análisis de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las CMI de las cepas control de calidad estuvieron dentro del intervalo de concentraciones indicado por el CLSI para ambos métodos (13). En la Tabla 1 se resumen los resultados de la actividad *in vitro* del voriconazol obtenidos por los métodos M27-A2 y colorimétrico, la concordancia entre los dos métodos y el coeficiente de correlación de Pearson. En general, el voriconazol tuvo muy buena actividad sobre las cepas ensayadas, la media geométrica de

Tabla 1. Actividad del voriconazol determinada por dos métodos y concordancia entre ellos.

Especie (nº de cepas)	Método	CMI (mg/l)			Intervalo CMI	% Concordancia		R**
		MG*-CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀		± 1 Log ₂	± 2 Log ₂	
<i>C. albicans</i> (47)	M27-A2	0,0088	0,008	0,016	0,008-0,03	100	100	0,627
	Colorimétrico	0,0086	0,008	0,008	0,008-0,03			
<i>C. glabrata</i> (9)	M27-A2	0,27	0,12	4	0,12-4	66,667	66,666	0,227
	Colorimétrico	0,157	0,25	0,25	0,06-0,25			
<i>C. krusei</i> (10)	M27-A2	0,189	0,25	0,5	0,03-1	60	90	0,324
	Colorimétrico	0,175	0,12	0,5	0,06-1			
<i>C. parapsilosis</i> (52)	M27-A2	0,027	0,03	0,12	0,008-0,25	44,23	75	-0,029
	Colorimétrico	0,029	0,03	0,12	0,008-0,5			
<i>C. tropicalis</i> (13)	M27-A2	0,038	0,03	0,25	0,008-16	76,92	84,615	0,999
	Colorimétrico	0,069	0,06	0,12	0,016-16			
Levaduras emergentes (13)	M27-A2	0,08	0,06	1	0,008-2	92,308	100	0,995
	Colorimétrico	0,088	0,06	1	0,008-4			
Total (144)	M27-A2	0,028	0,016	0,25	0,008-16	72,222	86,806	0,961
	Colorimétrico	0,029	0,016	0,25	0,008-16			

*MG: media geométrica; **R: coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 2. Concordancia por categorías entre el método colorimétrico y el M27-A2, según punto de corte del CLSI.

Especie (nº de cepas)	Método	Categoría según punto de corte			Concordancia* (%)
		S	S-DD	R	
<i>C. albicans</i> (47)	M27-A2	47	0	0	100
	Colorimétrico	47	0	0	
<i>C. glabrata</i> (9)	M27-A2	8	0	1	88,8
	Colorimétrico	8	1	0	
<i>C. krusei</i> (10)	M27-A2	10	0	0	100
	Colorimétrico	10	0	0	
<i>C. parapsilosis</i> (52)	M27-A2	52	0	0	100
	Colorimétrico	52	0	0	
<i>C. tropicalis</i> (13)	M27-A2	12	0	1	100
	Colorimétrico	12	0	1	
Levaduras emergentes (13)	M27-A2	12	1	0	84,6
	Colorimétrico	10	2	1	

*Porcentaje de cepas incluidas en la misma clasificación por los dos métodos. S: sensible; S-DD: sensible dependiendo de la dosis; R: resistente.

la CMI fue 0,028 mg/l y la CMI₉₀ fue 0,25 mg/l. Las especies sobre las que mostró mayor actividad fueron *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, con CMI₉₀ de 0,016, 0,12 y 0,5 mg/l, respectivamente. La concordancia entre los métodos dependió de la especie y osciló entre el 66,6% para *C. glabrata* y el 100% para *C. albicans* y levaduras emergentes. La correlación entre los métodos fue muy buena y positiva (0,961). Por especies, la correlación fue negativa y baja para *C. parapsilosis* (-0,029). La Tabla 2 muestra la clasificación de las cepas según los puntos de corte provisionales del CLSI y la concordancia por categorías (porcentaje de cepas con la misma clasificación) entre los métodos.

En la Tabla 3 se especifican las CMI del voriconazol para las cepas de levaduras emergentes y su clasificación. Entre las cepas aisladas en el periodo de tiempo estudiado, el porcentaje de sensibles al voriconazol (CMI ≤1 mg/l) fue del 97%, el de sensibles según la dosis (CMI = 2 mg/l) fue del 0,69% (1 *R. glutinis*) y el de resistentes (CMI ≥4 mg/l) fue del 1,38% (1 *C. tropicalis* y 1 *C. glabrata*); porcentajes similares a los encontrados por otros autores (10). La mayor discrepancia entre métodos se obtuvo con dos cepas: una de *C. glabrata*, que fue resistente por el método de referencia y sensible dependiendo de la dosis por el método colorimétrico, y otra de *R. glutinis* que fue sensible según la dosis por el método de referencia y resistente por el colorimétrico (1,38% errores leves). El método colorimétrico consiguió detectar la cepa de *C. tropicalis* resistente al voriconazol, pero la de *C. glabrata* la clasificó como sensible según la dosis.

Estudios previos han determinado la reproducibilidad del método colorimétrico para el voriconazol (98%) (16); sin embargo, no se ha podido comparar la concordancia por categorías ni indicar los errores del método, al no disponer de puntos de corte. Nuestros resultados confirman y amplían los obtenidos por otros autores, que también observaron que la concordancia depende de la especie y es más baja para *C. glabrata* (16-20).

En la Fig. 1 se representa la recta de regresión que correlaciona los resultados por el método de referencia con los obtenidos por el método colorimétrico.

En resumen, el voriconazol posee un amplio espectro de actividad sobre levaduras. El método colorimétrico tiene

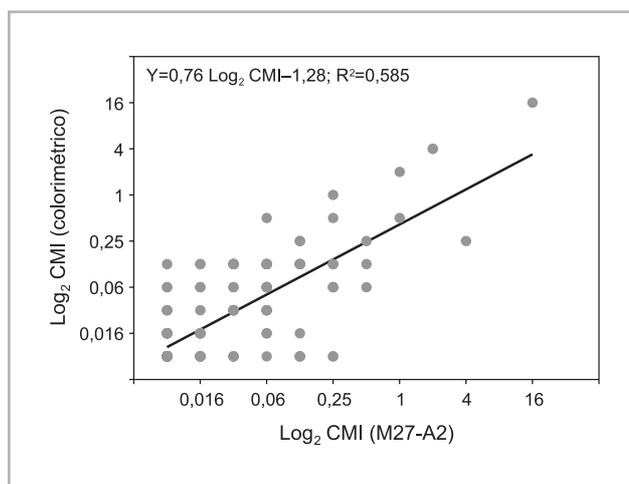


Figura 1. Correlación de los métodos M27-A y colorimétrico.

Tabla 3. Actividad de voriconazol sobre levaduras emergentes.

Especie (nº de cepas)	Método	CMI (mg/l)	Categoría (nº de cepas)
<i>C. colliculosa</i> (1)	M27-A2	0,25	S (1)
	Colorimétrico	0,06	S (1)
<i>C. dubliniensis</i> (1)	M27-A2	0,008	S (1)
	Colorimétrico	0,008	S (1)
<i>C. guilliermondii</i> (2)	M27-A2	0,008-0,03	S (2),
	Colorimétrico	0,008-2	S (1), I (1)
<i>K. apis</i> (1)	M27-A2	0,25	S (1)
	Colorimétrico	0,5	S (1)
<i>P. ohmerii</i> (2)	M27-A2	0,03-0,06	S (2)
	Colorimétrico	0,03	S (2)
<i>R. glutinis</i> (2)	M27-A2	1,0-2	S (1), I (1)
	Colorimétrico	2,0-4	I (1), R (1)
<i>T. asahii</i> (2)	M27-A2	0,06-0,12	S (2)
	Colorimétrico	0,06-0,12	S (2)
<i>T. mucoide</i> (1)	M27-A2	0,06	S (1)
	Colorimétrico	0,03	S (1)
<i>Thichosporum</i> spp. (1)	M27-A2	0,03	S (1)
	Colorimétrico	0,06	S (1)
Total (13)	M27-A2	0,008-2	S (12), I (1)
	Colorimétrico	0,008-4	S (10), I (2), R (1)

una buena correlación con el método de referencia (0,961) y es adecuado para clasificar las cepas sensibles al voriconazol (100% de concordancia). No se puede concluir lo mismo en cuanto a su capacidad para detectar las cepas resistentes (objetivo de las pruebas de sensibilidad), ya que el número ensayado es muy bajo (dos cepas resistentes al voriconazol). Se necesitan más estudios que incluyan mayor número de cepas resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Cantón, E., Viudes, A., Pemán, J. *Infección sistémica nosocomial por levaduras*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 51-55.
- Jarvis, W.R. *Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on Candida species*. Clin Infect Dis 1995; 20: 1526-1530.
- Nguyen, M.H., Peacock, J.E., Morris, A.J. y cols. *The changing face of candidemia: Emergence of non-Candida albicans species and antifungal resistance*. Am J Med 1996; 100: 617-623.
- Pemán, J., Cantón, E., Orero, A., Viudes, A., Frasset, J., Gobernado, M. *Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España*. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 30-35.
- Pemán, J., Cantón, E., Gobernado, M., Spanish Working Group on Candidaemia. *Epidemiology and antifungal susceptibility of Candida species isolated from blood: Results of a 2-year multicentre study in Spain*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 23-30.
- Viudes, A., Pemán, J., Cantón, E., López-Ribot, J.L., Gobernado, M. *Candidemia at a tertiary-care hospital: Epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 767-774.
- EMA 2002. <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/vfend/vfend.htm>
- EMA 2005. <http://www.emea.eu.int/humandocs/PDFs/EPAR/vfend/404901en1.pdf>
- Espinel-Ingroff, A. *In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens*. J Clin Microbiol 1998; 36: 198-202.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J., Jones, R.N., Diekema, D.J. *In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of Candida spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1723-1727.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Messer, S.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Jones, R.N., International Fungal Surveillance Participant Group. *In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against Candida species infrequently isolated from blood*. J Clin Microbiol 2003; 41: 78-83.
- Drago, M., Scaltrito, M.M., Morace, G., GISIA-2 Group. *In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of Candida glabrata and Candida krusei*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 619-624.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. Second Edition. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Wayne, PA 2002.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. NCCLS document M38-A. NCCLS, Wayne, PA 2002.
- Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M. y cols. *International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of Candida spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole*. J Clin Microbiol 2005; 43: 3884-3889.
- Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S.B. *Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of Candida spp.* J Clin Microbiol 2004; 42: 718-721.
- Kauffman, C.A. *Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other triazoles against Candida species*. Mycoses 1999; 42: 539-542.
- Pfaller, M.A., Espinel-Ingroff, A., Jones, R.N. *Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4577-4580.
- Linares, M.J., Charriol, G., Solis, F., Casal, M. *Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of Candida spp. to voriconazole*. J Clin Microbiol 2004; 42: 899-902.
- Pai, M.P., Jones, A.L. *Altered susceptibility of Candida glabrata bloodstream isolates to triazoles at clinically relevant pH values: Comparison of the NCCLS M27-A2, Sensititre YeastOne, and E-test methods*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4441-4443.