數種의 結核菌分離培養方法의 比較實驗

大韓結核協會 結核研究院

金 尙 材 · 金 成 鎮

—Abstract—

A Study on the Efficiency of Various Culture Methods in the Isolation of Tubercle Bacilli

Sang Jae Kim and Sung Chin Kim

The Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association

Although it is technically superior to direct microscopy, expansion of culture examination as a diagnostic and/or monitoring service depends largely on its practicability in various phases of a national tuberculosis (TB) programme. Greater emphasis on cultural examination will mean simplification of technical procedures and usage of less expensive materials. In this regard several culture methods have been compared on the basis of positive-case yield, technical procedure, and expense. Specimens for this study were collected from 3,632 radiographic suspects found during the 3rd national prevalence survey which was conducted in 1975. Both the laryngeal swab and spot sputum collection methods were utilized.

Examination of this group by both direct microscopy and by the oxalic acid (OA) culture method yielded 198, or 5.4%, bacteriologically positive cases. Of these, 93, or 2.5%, and 115, or 3.1%, were discovered by direct microscopy from laryngeal swabs and spot sputa, respectively, while 134 cases, representing 3.6%, and 138, or 3.8%, positive cases were discovered subsequently via culture examination. The figures, of course, indicate reason to favor spot sputum collection over the laryngeal swab within the peripheral laboratory where facilities are unsuited for culture examination. In addition to these, findings comparing the results of the culture examination utilizing three relatively simple culture methods, the OA method, the Ogawa method, and the KIT (Korean Institute of Tuberculosis) method, also tabulated. Although statistically insignificant, they showed definitively that the OA method, which has been recommended by World Health Organization, produced fewer positive-case results, (130, or 5.0%), than those discoveries of either the Ogawa, which produced 140, or 5.4%, or the KIT method, which presented 145 cases or 5.6%.

Examination of the 729 spot sputa following the OA method, the simple Ogawa and the KIT methods further substantiated, through demonstration, the superiority of either the simple Ogawa or the KIT methods over any other, not only in positive-case yield capabilities, but in cost analysis as well. The results showed that the OA method produced 91 or 12.5% cases could be found overall, while 105 cases or 14.4% and 107 cases or 14.7% became available employing the Ogawa and the KIT methods, respectively. Furthermore, when the concentrated specimens

were inoculated on L-J, Ogawa, and KIT media, 105(14.4%), 106(14.5%), and 120(16.5%) positive cases were found, respectively.

Direct inoculation of spot sputum specimens with penicillin into the peritoneal cavity of mice produced a marked decrease in positives, 38, or 7.6%, than the findings given by the direct microscopic or culture examination methods, which was 118 cases, representing 23.6%.

序 論

結核菌의 分離培養은 顯微鏡檢査보다 菌發見率이 높음에도 意義가 크지만 菌의 精確한 同定, 病原性, 各種藥劑에 대한 感受性 및 기타 生物學的 性狀에 관한 정보를 얻기 위해서는 반드시 실시해야 하므로 그 중요성은 매우 크다^{1, 2)}. 結核菌의 分離培養法은 今世紀가 시작되기 전에 이미 개발되었다. 따라서 현재 臨床可檢物이나 기타 檢體로부터 結核菌이나 기타 抗酸菌의 分離培養法이 많이 알려져 있다. 그러나 結核의 精確한 診斷과 効果적인 治療를 위해서 실시되는 結核菌의 分離培養方法과 그에 따른 培養基의 개발은 檢査對象, 可檢物의 종류 및 檢査室의 業務量에 따라 經濟性이 考慮되어야 하므로 현재도 그에 대한 研究가 끊임없이 계속되고 있다^{1, 3)}.

本研究은 현재 結核菌檢査室에서 널리 사용되고 있는 培養方法과 本研究院이 최근에 개발한 培養基³⁾를 이용한 培養法등을 第3次結核實態調查時에 채취된 喀痰으로 比較實驗한 것으로서 그 결과를 여기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

喀痰採取: 第3次結核實態調查는 1975년 3월 19일 부터 9월 15일 사이에 실시되었는데 이 조사는 無作為抽出法에 따라 선정된 82개지역의 住民을 대상으로 하였고 그중 喉頭粘液 및 喀痰採取는 胸部 X-線寫眞상의 有所見者에 限해 실시하였다. 胸部 X-線寫眞은 5세 이상의 주민(27,154명)에 대해 실시했고 그중 現地에서의 엑스線寫眞判讀上 有所見者로 判明되어 喀痰을 채취한者は 3682명이었다. 따라서 X-線綜合判讀結果追加된 有所見者는 本實驗對象에서 除外되었다.

喀痰培養:

① 藤酸法¹⁾: 本法는 實態調查에서 採擇된 배양법으로서 채취된 喉頭粘液이나 喀痰을 調查現地로부터 가까운 市道檢査所나 保健所로 가져와 痰이 묻은 綿棒을 5%

oxalic acid에 25분(喀痰인 경우에는 30분) 처리한 다음 5% sodium citrate에 옮겨 15분 처리하여 2本の L-J배양기에 접종했다. 접종된 배양기는 37°C 부란기에서 過剩水分을 제거한 다음 結核研究院으로 운송하였다. 운송된 배양기는 37°C 부란기에 계속배양하면서 本研究院 부란기에 넣은 날자를 기준으로 하여 每週 균발육여부를 관찰하면서 8주까지 배양하였다. 배양 2주 후에 인형결핵균의 菌集落과 類似한 菌集落을 형성하는 균이 관찰되면 즉시 인형결핵균 확인시험을 행하고 8주 배양에서도 균발육이 전혀 없으면 陰性으로 判定하였다.

② 簡易法: 調查現地에서 사용하고 남은 객담은 本研究院으로 운송하였는데 그중에서 痰이 전혀 없는 것은 제외하고 痰量이 0.2ml 이상되는 것(2599건)은 모두 本法으로 배양하였다. 採痰으로부터 배양검사되기까지 약 7~10일정도 걸렸다.

i) Ogawa 法²⁾: 本法는 本研究院과 市·道結核檢査所가 채택해 실시하고 있는 배양법中 하나로서 객담을 同量의 4% NaOH와 잘 혼합하여 液化시킨 다음 20분간 室溫에서 처리하여 汚染菌을 제거한 다음 0.1ml씩 2本の 3% Ogawa 배양기에 접종했다. 접종된 배양기는 可檢物을 표면에 잘 펴서 水平위치로 37°C 부란기에 24~48시간 마개를 약간 열어서 넣어두어 過剩水分을 제거한 다음 마개를 단단히 닫아 37°C에서 계속배양하면서 매주 균발육여부를 관찰하였다. 培養陰性인 배양기는 8주까지 관찰하였다.

ii) 結核研究院(KIT)法³⁾: 객담처리과정은 Ogawa 法과 동일하게 행하되 처리된 可檢物을 2本の KIT 배양기에 접종하는 방법이다. 균발육여부의 관찰도 Ogawa 法과 동일하게 하였다.

③ 集菌法: 本研究院로 운송된 객담중에서 痰量이 4ml 이상되고 質이 좋다고 인정되는 객담(729건)을 대상으로 하였다. 약 3ml 정도의 객담을 同量의 4% NaOH와 혼합하여 液化시킨 다음 20분간 前處置한 후 멸균증유수를 14ml 정도 가지고 약간 흔들여 준 다음 3,000rpm에서 20분간 遠心分離하였다. 원심분리가 끝난 원심관의 상등액은 버리고 沈澱物은 4~5滴의 M/1.5 phosphate buffer(pH, 6.8)에 현탁 및 中和시켜서 각 2本の L-J, 3% Ogawa 및 KIT 배양기에 1滴씩 접종하였

다. 접종된 배양기는 과잉수분을 제거한 다음 37°C에서 8주간 배양하면서 균발육여부를 관찰 하였다.

喀痰動物接種: 喀痰을 同量の penicillin 용액 (20,000 U/ml)과 혼합하여 37°C 孵卵器에 5시간동안 처리한 다음 0.1ml씩 4首의 白鼠(체중 15±2g)의 腹腔에 접종하였다. 접종된 白鼠는 1주이후 4주이내에 死亡한 경우에는 剖檢하고 4주까지 생존한 경우에는 屠殺하여 肺·脾 및 肝을 취해 1% NaOH에 넣고 homogenizer로 15,000 rpm 30抄間 분쇄 均等화시킨 다음 37°C에서 15분간 처리한 후 3% Ogawa 및 KIT 배양기에 접종하였다. 접종된 배양기는 過剩水분을 제거한 다음 37°C에서 8주간 배양하면서 균발육여부를 관찰 하였다.

人型結核菌 確認實驗: 접종된 배양기에 형성된 菌集落 가운데서 人型結核菌의 菌集落과 類似한 것은 發育速度, 菌索形成與否, niacin 生産與否, pH7/68°C catalase test, 窒酸鹽還元 그리고 *p*-nitrobenzoic acid 및 thiophene-2-carboxylic acid hydrazide 感受性등을 관찰하여 人型結核菌을 鑑別하였다.

實驗 結果

대상자로부터 채취한 喉頭粘液 및 喀痰을 Z-N染色에 따른 현미경 검사와 蓼酸法에 의한 培養檢査를 실시한 결과를 보면 Table 1과 같다. 두가지 可檢物에서 顯微鏡 및 培養檢査로 발견된 總菌陽性患者는 198명으로 總檢査件數(3632)의 5.4%였다. 그런데 喉頭粘液으로 발견된 菌陽性患者는 152명(4.1%)인데 비해서 喀痰으로는 166명(4.5%)의 菌陽性者를 발견해 14명을 더 발견했지만 有意한 차이는 인정할 수 없었다. 檢査方法別로 두 可檢物을 비교해 보면 顯微鏡檢査로는 喉頭粘液으로부터 93명(2.5%) 喀痰으로부터 115명(3.1%)을 발견하고 培養檢査로는 喉頭粘液으로부터 134명(3.6%) 喀痰으로부터 138명(3.8%)을 발견하였다. 檢査方法사이 즉 顯微鏡檢査와 培養檢査의 결과를 비교해 보면 喉頭粘液에서는 前者의 方法으로 93명 後者의 方法으로 134명을 발견하여 有意한 정도($P < 0.01$)의 차이를 보여 주었지만 喀痰에서는 前者의 方法으로 115명 後者의 方法으로 138명이 발견되었으나 有意한 차이는 없었다. 그러나 顯微鏡檢査로 발견하지 못한 것을 培養檢査로 발견한 경우가 喉頭粘液에서는 59건(1.6%) 喀痰에서는 51건(1.4%)이었다(Table 2). 이 숫자는 두가지 方法으로 발견된 總陽性患者의 38.8%(喉頭粘液에서) 및 30.7%(喀痰에서)에 해당한다. 可檢物種類別로 균을 발

견하지 못한(농진) 陽性患者數를 비교해 보면 喉頭粘液으로는 46명(1.3%)이고 喀痰으로는 32명(0.9%)이었으며 有意한 차이는 없다.

채취된 喀痰中에서 蓼酸法, 簡易 Ogawa法 및 簡易 KIT法으로 培養檢査를 실시한 2599건의 檢査結果를 보면 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉 2599건 가운데서 발견된 陽性件數가 蓼酸法으로 130건(5.0%), 簡易 Ogawa法으로 140건(5.4%) 그리고 簡易 KIT法으로 145건(5.6%)인데 여기서 볼 수 있는 培養方法 상호간 의 다소의 차이는 有意한 것이 아니었다. 培養陽性을 一次分離培養基에 형성된 菌集落數에 따라 비교해 보면 Table 4에서 보는 바와 같이 菌集落이 5개 또는 그 이하인 경우가 蓼酸法에서는 29건(22.3%)인데 비해 簡易 Ogawa 및 KIT法에서는 각각 43건(30.7%) 및 44건(30.4%)이고 菌集落數가 20개이상인 경우는 蓼酸法이 90건(69.2%)인데 비해 簡易 Ogawa 및 KIT法은 각각 76건(54.3%) 및 83건(57.2%)이었다. 따라서 蓼酸法에 의한 배양법은 陽性率은 多少낮으나, 陽性培地上의 發育된 菌集落數는 더 많은 경향을 보여준다. 前述한 세 가지 培養法에 따라 배양한 결과를 顯微鏡檢査結果와 연관시켜보면(Table 5), 두가지 檢査法으로 모두 균을 찾아 볼 수 있는 경우와 顯微鏡檢査로는 균을 볼 수 있었으나 培養檢査에서는 陰性이었거나 汚染인 경우는 세 가지 배양법사이에 차이가 없었다. 그러나 顯微鏡檢査로 陰性인 것을 培養檢査로 발견한 경우는 蓼酸法에서 45건(1.7%) 簡易 Ogawa法에서 52건(2.0%) 簡易 KIT法에서 56건(2.2%)으로 다소의 차이를 볼 수 있으나 有意한 것은 아니다. 그리고 顯微鏡檢査로 발견하지 못한 것 중에서 다른 培養法으로는 균을 찾아 볼 수 있었으나 해당배양법으로는 균을 찾지 못한 경우가 蓼酸法에서는 43건(1.7%) 簡易 Ogawa法에서는 36건(1.4%) 簡易 KIT法에서는 32건(1.2%)이었으며 有意的差는 인정할 수 없다.

채취된 喀痰中에서 痰量이 많고 質이 좋은 것은 集菌培養法으로 배양하였고, 이것을 蓼酸法 및 簡易培養法으로 배양한 결과를 비교해 보면 Table 6과 같다. 集菌培養한 喀痰總數는 729건인데 이가운데서 실시된 모든 培養法으로 발견된 總陽性件數는 152건(20.9%)이었다. 그중에서 蓼酸法으로 발견된 것은 91건(12.5%)이고 簡易 Ogawa法과 簡易 KIT法으로 발견된 것은 각각 105건(14.4%) 및 107건(14.7%)이었으며 集菌한 可檢物을 L-J배양기에 접종했을 경우에는 105건(14.4%), Ogawa 배양기에 접종했을 때는 106건(14.5%) 그리고 KIT 배

Table 1. Comparison of positive-case yield found through both direct microscopy and subsequent culture examination of laryngeal swab and spot sputum specimens collected from 3,682 radiographic tuberculosis suspects.

Total cases examined	Positives from laryngeal swabs			Positives from spot sputa			Total positives from both type specimens
	by DM	by C	by DM & C	by DM	by C	by DM & C	
3682 (100.0)	93 (2.5)	134 (3.6)	152 (4.1)	115 (3.1)	138 (3.8)	166 (4.5)	198 (5.4)

* Numbers in parentheses are percentage.
DM—direct microscopy.
C—culture.

Table 2. Comparison of the positive-case yield according to specimen type and methods of examination.

Total cases examined	Laryngeal swabs			Spot sputa		
	DM	C	No. of cases	DM	C	No. of cases
3682(100.0)	+	+	75(2.0)	+	+	87(2.4)
	+	—	18(0.5)	+	—	28(0.8)
	—	+	59(1.6)	—	+	51(1.4)
	—	—	46(1.3)	—	—	32(0.9)
Total positives	93(2.5)	134(3.6)	198(5.4)	115(3.1)	138(3.8)	198(5.4)

* Numbers in parentheses are percentage.
DM—direct microscopy.
C—culture.
Culture negative “—” includes no growth and contamination.

Table 3. Comparison of the positive-case yield among the various culture methods.

Total specimens examined	Positives found by oxalic acid method	Positives found by simple Ogawa method	Positives found by simple KIT methods	Total positives found by three methods
2599(100.0)	130(5.0)	140(5.4)	145(5.6)	168(7.6)

* Numbers in parentheses are percentage.

Table 4. Comparison of colony number with regard to the various culture methods.

Oxalic acid method	Simple Ogawa method	Simple KIT method	Number of colonies formed
29 (22.3)	43 (30.7)	44 (30.4)	1—5
11 (8.5)	21 (15.0)	18 (12.4)	6—20
90 (69.2)	76 (54.3)	83 (57.2)	>20
130(100.0)	140(100.0)	145(100.0)	Total

* Numbers in parentheses are percentage.

Table 5. Comparison of the positive-case yield found by direct microscopy among three different culture methods.

Total cases examined	Direct microscopy	Oxalic acid method		Simple Ogawa method		Simple KIT method	
		Result	No. of cases	Result	No. of cases	Result	No. of cases
2599(100.0)	+	+	85(3.3)	+	88(3.4)	+	87(3.4)
	+	—	25(1.0)	—	22(0.9)	—	23(0.9)
	—	+	45(1.7)	+	52(2.0)	+	56(2.2)
	—	—	43(1.7)	—	36(1.4)	—	32(1.2)
Total positives 110(4.2)		130(5.0)	155(6.0)	140(5.4)	162(6.2)	145(5.6)	166(6.4)

* Culture negative includes both no growth and contamination.
Numbers in parentheses represent percent.

Table 6. Comparison of the positive-case yield among the various culture methods using different media.

Total cases examined	Total culture positives	Culture methods	Media used		
			L-J	Ogawa	KIT
729(100.0)	152(20.9)	Oxalic acid method	91(12.5)	N D	N D
		Simple methods	N D	105(14.4)	107(14.7)
		Concentration method	105(14.4)	106(14.5)	120(16.5)

* Numbers in parentheses represent percent.
ND—not done.

Table 7. Results of mice inoculated with sputum specimen.

Result of microscopy or culture	Result of mice inoculation	Number of cases
+	+	35(7.0)
—	+	3(0.6)
+	—	83(16.6)
—	—	380(75.9)
Total		501(100.0)

* Numbers in parentheses represent percent.

양기에 접종했을 때는 120건(16.5%)이 각각 발견되었다. 여기서 蓼酸法, 簡易 KIT 法 및 KIT 배양기를 이용한 集菌培養法사이에는 어느 정도 有意한 차이가 인정된다($0.1 > P > 0.05$). 대체로 蓼酸法은 다른 培養法들보다 陽性發見率이 낮은 경향을 보여주고 있는데 비해 簡易培養法과 集菌培養法사이에는 차이가 없었다. 喀痰을 직접 白鼠의 腹腔內에 접종했을 때의 결과를 보면 표 7과 같다. 접종한 喀痰 501건 중에서 白鼠의 臟

器로부터 結核菌이 발견된 건수는 38건(7.6%)이며 이 가운데서 35건(7.0%)은 顯微鏡檢査나 培養檢査에서 結核菌이 陽性으로 나타난 것이며 다른 3건(0.6%)은 오직 動物接種을 통해서만 結核菌의 存在를 확인한 경우이다. 그러나 다른 한편으로 顯微鏡檢査나 培養檢査로 結核菌이 檢出된 喀痰 83건(16.6%)은 動物接種으로는 菌을 찾지 못했다. 따라서 喀痰을 직접 白鼠에 접종하여 結核菌의 有無를 보는 것은 결코 좋은 방법이 아니

었다.

考 察

結核菌의 分離培養은 菌의 同定을 통한 精確한 진단과 菌의 毒力 및 藥劑感受性을 알기 위해서 뿐만 아니라 보다 많은 수의 菌陽性患者를 찾아내기 위해 그리고 치료에 대한 患者의 반응을 면밀히 관찰하기 위해서도 점점 더 확대해 나가야 할 檢査事業이다.^{1,2)} 그러나 培養檢査는 顯微鏡檢査보다 費用이 더 들고 시간이 많이 걸리며 보다 까다로운 檢査過程을 要하기 때문에 어느 檢査室이나 모두 쉽게 실시하기는 어려운 實情이다. 따라서 培養方法의 簡便함과 經濟性이 考慮된 檢査法의 개발은 이의 利用을 더욱 넓게 해 줄 것이다.^{1,2)}

本研究은 우리나라 結核管理事業에 효과적으로 응용할 수 있는 培養檢査法을 그러한 觀點에서 선택하기 위한 一環으로서 既히 알려진 培養方法들과 結核研究院이 개발하고 있는 培養方法³⁾으로 제 3次結核實態調查에서 채취된 喀痰을 재료로 比較實驗하였던 것이다. 그 결과 可檢物處理件數가 많고 國家的結核管理事業에 연결된 公衆保健檢査室에서는 특수한 경우가 아니고서는 檢査過程이 더 복잡하고 처리시간이 더 걸리며 實驗施設과 材料를 더 많이 要하는 集菌培養法은 당연히 簡易培養法으로 代替되어야 한다는 結論을 내릴 수 있었다. 그리고 5% 蔞酸法도 世界保健機構(WHO)에 의해 널리 勸獎되기는 했으나 4% NaOH 前處置에 따른 簡易 Ogawa 法이나 簡易 KIT 法에 비해 비록 有意한 차이는 아니나

陽性發見率이 떨어지고 그리고 處理過程이 더 복잡하고 더 많은 시간을 要하는 데다 費用도 더 들기 때문에 앞서 이야기한 簡易培養法보다 못하다는 사실도 알 수 있었다. 簡易 Ogawa 法과 簡易 KIT 法사이에는 陽性發見率에는 차이가 없었다. 그러나 KIT 배양기가 3% Ogawa 배양기보다 가격면에서 약간 비싸기는 하지만 喀痰을 集菌해서 接種 할 경우에는 3% Ogawa 배양기보다 KIT 배양기가 더 많은 菌陽性을 찾아 낼 수 있었고 그리고 대체로 菌의 發育이 3% Ogawa 배양기에서 보다 KIT 배양기에서 더 빠르기 때문에 (Figure 1) 檢査 목적에 따라서는 KIT 배양기의 사용이 필요한 경우가 많다.

動物接種을 통한 菌陽性者의 索出은 적어도 白鼠를 사용했을 경우에는 결코 바람직한 檢査方法이 아님을 알 수 있었다.

實態調查에서 채취된 喉頭粘液과 喀痰을 발견된 菌陽性件數로서 比較해 보던 비록 有意한 차이는 아니라도 顯微鏡檢査로는 喀痰으로부터 약간 많은 菌陽性을 찾아 낼 수 있었다.

結 論

第3次結核實態調查에서 채취된 喉頭粘液 및 喀痰을 本研究院에서 最近開發한 培地와 각종 培養法으로 檢査하여 그 결과를 비교 검토하였다.

1) 3682명의 胸部 X-線有所見者로 부터 채취된 喉頭粘液과 喀痰으로 顯微鏡檢査와 蔞酸法에 의한 培養檢査

Fig. 1

로 198명 (5.4%)의 菌陽性患者를 발견했다. 이 가운데서 顯微鏡檢査로는 喉頭粘液에서 93건 (2.5%)의 菌陽性을 發見한데 비해 喀痰에서는 115건 (3.1%)을 發見했고 培養檢査로는 喉頭粘液으로부터 134건 (3.6%)를 발견한데 비해 喀痰에서는 138건 (3.8%)을 檢出했다.

2) 2,599건의 喀痰을 滲酸法에 따라 배양한 경우에는 130건 (5.0%)의 菌陽性을 발견한데 비해 簡易 Ogawa 法 및 簡易 KIT 法으로 배양한 경우에는 각각 140건 (5.4%) 및 145건 (5.6%)을 發見할 수 있었다.

3) 729건의 喀痰을 滲酸法, 簡易 Ogawa 및 KIT 法 그리고 集菌法으로 배양한 결과를 비교해 보면 集菌하지 않은 滲酸法으로는 91건 (12.5%)이 菌陽性이었고 簡易 Ogawa 및 KIT 法으로는 각각 105건 (14.4%) 및 107건 (14.7%)이었으며 集菌한 可檢物을 L-J 배양기 및 3% Ogawa 배양기에 접종했을 때는 각각 105건 (14.4%) 및 106건 (14.5%)을 檢出하고 KIT 배양기에 접종했을 때는 120건 (16.5%)을 檢出하였다.

4) 501건의 喀痰을 白鼠 腹腔內에 접종한 다음 臟器로부터 菌分離를 실시하여 38건 (7.6%)의 菌陽性을 발

견했다. 이중 3건 (0.6%)은 顯微鏡 및 培養檢査로 菌을 檢出하지 못했던 경우이다. 그러나 83건 (7.6%)의 菌陽性喀痰은 動物接種으로 菌을 발견하지 못하였으므로 이 방법은 菌檢出目的으로 使用하는 것이 不適合하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kudoh, S., and Kudoh, T. A Simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull. Wld Hlth Org.*, 51, 71, 1974.
2. Padmanabha Rao, K., Nair, S. S., Cobbald, N., and Naganathan, N. Some operational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Bull. Wld Hlth Org.*, 34, 589, 1966.
3. 金尙材, 金成鎮, Penicillin 感受性 結核菌의 分離, 結核 및 호흡기질환. 23(1):6, 1976.