

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**



**EL GENEXPERT EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS, SAN SALVADOR  
DURANTE JULIO DE 2023.**

**Presentado por:**

**CARLOS MARIO SANTOS ZELAYA.**

**Para optar por el grado de:**

**LICENCIATURA EN LABORATORIO CLINICO.**

**Asesor:**

**DRA. BEATRIZ ELENA ARCHILA DE FLORES.**

**Ciudad universitaria "Dr. Fabio Castillo Figueroa", San Salvador, Agosto, 2023**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rector**

*Msc. Roger Armando Arias*

**Vicerrector académico**

*PhD. Raúl Ernesto Azucanga López*

**Vicerrector administrativo**

*Ing. Juan Rosa Quintanilla*

**Secretario/a General**

*Ing. Francisco Antonio Alarcón*

## **AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

**Decana**

*Msc. Josefina Sabrían de Rodríguez*

**Vicedecano**

*Dr. Saúl Díaz Peña*

**Secretaria**

*Msc. Aura Marina Miranda de Arce*

**Directora de la Escuela**

*Msc. José Eduardo Zepeda Avelino*

**Directora de Carrera**

*Msp. Miriam Recinos de Barrera*

## CONTENIDO

I.	Introducción .....	vii
II.	Desarrollo del tema .....	9
III.	Conclusiones.....	15
IV.	Fuentes de información.....	17

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por darme vida y las fuerzas para poder llegar a la recta final de mi carrera despues de mucho tiempo y esfuerzo

### **A mi madre**

Que con mucho esfuerzo de su parte me apoyo hasta este momento para poder terminar mi carrera

### **A mis hermanos**

Los cuales también me han brindado su apoyo a lo largo de estos años de mi carrera y me han brindado ánimos

### **A mis docentes**

Por la enseñanza y la orientación que me han brindado a lo largo de la carrera y los conocimientos adquiridos por parte de ellos

### **A mis compañeros Lisseth, Rodrigo, Leonardo y Diana**

Que durante los últimos años han sido un gran apoyo como tanto como compañeros de carrera como amigos, todas las experiencias y conocimientos compartidos me han ayudado mucho durante este trayecto para llegar a este punto

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad causada por el *Mycobacterium tuberculosis* bacteria perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad puede presentarse en dos formas: la pulmonar que afecta los pulmones y la extrapulmonar que afecta cualquier otro órgano que no sea los pulmones. Se trata de una enfermedad con una gran mortalidad en el mundo donde cualquier persona puede llegar a padecerla, aquellos con enfermedades donde el sistema inmune es deficiente son los más propensos a padecerla. Como parte de su diagnóstico se ha empleado de manera común técnicas de laboratorio como lo son la baciloscopia y el cultivo. Sin embargo, por la poca sensibilidad, los largos periodos de tiempo y el riesgo que involucra realizar estas técnicas se desarrollaron técnicas basadas en biología molecular que resulta más sensibles, más específicos y brindan resultados en corto tiempo. Entre estas se encuentra el GeneXpert el cual se trata de una plataforma de una PCR en tiempo real. Este ensayo permite realizar todos los pasos que involucra una realizar una PCR de forma automática. En el análisis de laboratorio se utiliza comúnmente para la identificación del *Mycobacterium tuberculosis*, así como también ayuda a detectar la resistencia a la rifampicina que es el fármaco que más se utiliza para el tratamiento de la tuberculosis y que su resistencia puede significar un gran problema para para el tratamiento del paciente.

**Palabras clave:** Tuberculosis, Técnicas de biología molecular, Reacción en cadena de la polimerasa, PCR en tiempo real, GeneXpert.

## ABSTRACT

Tuberculosis is a disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* bacterium belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. This disease can present in two forms: pulmonary, which affects the lungs, and extrapulmonary, which affects any organ other than the lungs. It is a disease with a high mortality in the world where anyone can get it, those with diseases where the immune system is deficient are the most likely to suffer from it. As part of its diagnosis, laboratory techniques such as bacilloscopy and culture have been commonly used. However, due to the low sensitivity, the long periods of time and the risk involved in performing these techniques, techniques based on molecular biology were developed that are more sensitive, more specific and provide results in a short time. Among these is GeneXpert, which is a real-time PCR platform. This assay allows you to carry out all the steps involved in carrying out a PCR automatically. In laboratory analysis, it is commonly used to identify *Mycobacterium tuberculosis*, as well as to help detect resistance to rifampicin, which is the most widely used drug for the treatment of tuberculosis and its resistance can mean a big problem for the treatment of the patient.

**Keywords:** Tuberculosis, Molecular biology techniques, Polymerase chain reaction, Real-time PCR, GeneXpert

## I. INTRODUCCION

Clásicamente el estudio microbiológico se ha tratado de una disciplina que en la práctica de laboratorio clínico se ha realizado comúnmente de forma manual y algunas de las razones de esto se debe: a los distintos tipos de muestras que se reciben en el laboratorio de microbiología, también a los diferentes microorganismos que suelen ser agentes causales de enfermedades, y el volumen de las muestras que suele ser menor del que se usa en otras áreas de laboratorio. En el caso de la tuberculosis no ha sido la excepción para su diagnóstico. En el laboratorio se ha empleado comúnmente técnicas como lo son la baciloscopia y el cultivo microbiológico para el diagnóstico. Sin embargo, con el pasar del tiempo y a pesar de que estas técnicas todavía se realizan tanto en hospitales como en unidades de salud, con la intención de obtener resultados más precisos y en cortos periodos de tiempo se optó por la biología molecular y un ejemplo de esta es la tecnología llamada “GeneXpert” el cual se trata de un sistema de PCR en tiempo real capaz de lograr estas ventajas en comparación de otras pruebas manuales. En este trabajo se muestra como el GeneXpert ayudo mucho en la práctica de laboratorio y de su importancia al poder dar un diagnóstico rápido en los casos de tuberculosis. En las siguientes partes se explica de forma concreta de que trata la tuberculosis y su agente causal, se explicara de forma breve lo que son las técnicas moleculares y de lo que trata el GeneXpert el cual resulta ser una prueba más “sensible” en comparación de otras y de cómo este sistema ha brindado apoyo al diagnóstico temprano de la tuberculosis, así como algunas de sus virtudes en cuanto los implementos que este utiliza.

## II. DESARROLLO

La tuberculosis es una enfermedad causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis* el cual se trata de un bacilo acido-alcohol resistente que pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (complejo MTB), entre otras características se sabe que es aerobio estricto, resistente al frío y a la desecación. Sin embargo, es muy sensible al calor y a la luz ultravioleta. En lo que respecta a su crecimiento y desarrollo requiere de oxígeno y un pH óptimo similar a la de los pulmones. (Herrera, Arias y Ruiz, 2017, p.5)<sup>1</sup>

El *Mycobacterium tuberculosis* puede permanecer en el organismo en un estado latente y no provocar enfermedad. El reservorio del *Mycobacterium* es el humano y luego de que este se infecta para que este desarrolle una enfermedad va a depender fundamental del sistema inmune del huésped. Dicho esto, si la persona presenta una condición que se relacione con el deterioro del sistema inmunológico como el caso de los pacientes con VIH puede ser un factor que aumente la probabilidad de que se desarrolló la enfermedad. De la tuberculosis existen dos formas: la pulmonar y la extrapulmonar, siendo la pulmonar la forma más frecuente en personas infectadas afectando los pulmones mientras que la extrapulmonar puede afectar cualquier otro órgano que no sean los pulmones. (Herrera et al.,2017, p.5)<sup>2</sup>

La OMS/OPS afirma que: la tuberculosis es una enfermedad que se transmite de persona a persona a través del aire y entre los síntomas de la tuberculosis activa incluyen tos, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos. La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad del mundo. A nivel mundial, en 2021, se estimaron que 10.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.6 millones fallecieron por esta causa; de ellas 187,000 tenían infección con el VIH. (Organización Mundial de la Salud [OMS]/ Organización Panamericana de la Salud [OPS], s.f.)

Las técnicas de biología molecular son técnicas que se utilizan en el laboratorio como herramienta de análisis de ácidos nucleicos. El análisis de estos nos sirve para detectar e identificar microorganismos causantes de enfermedades, nos ayuda a identificar los diferentes genotipos que puede haber de una misma especie y también nos dice si estos poseen algún gen o genes que les brinde resistencia a la aplicación de un fármaco al paciente.

Antes de poder aplicarse estas técnicas se debe realizar la extracción del ADN o ARN de la muestra en estudio. Este paso es muy importante en la biología molecular, para esto hay varias formas de extracción que son: de forma mecánica, que puede hacerse macerando el tejido de donde se quiere extraer el ADN (si la muestra a estudiar es tejido), utilizando productos químicos ya sea con detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles o por digestión con enzimas como la proteinasa K que ayuda a lisar las células destruyendo las proteínas y se pueda liberar el ácido nucleico.

Como parte de este proceso se debe realizar un paso de purificación del ácido nucleico y el porqué de esto es para obtener ADN o ARN puro y tener un resultado correcto. Se debe eliminar cualquier sustancia ya sea de la muestra de donde se extrajo, del exterior o del personal mismo y que pueda inhibir el procedimiento o que pueda ser contaminante y que cause un falso resultado. Algunas de las formas en que se puede realizar este paso puede ser ya sea por ultrafiltración donde se utiliza una membrana que hace función de filtro colocando la muestra la cual se centrifuga logrando que los ácidos nucleicos queden en la membrana libre de los contaminantes y sustancias que no se requieren y esta posteriormente se le agrega agua o un tampón específico para recuperarlo. Otra forma es aplicando varios pasos de centrifugación donde las partículas se dividen algunas quedando en el sobrenadante mientras que otras se sedimentan. Al final de este paso purificación es un producto llamado “eluido” que es el ácido nucleico puro. (Diz Mellado, 2020a, p.2-3)<sup>4</sup>

Las técnicas de PCR consisten en la amplificación de un fragmento del ADN en específico. Para esto se utilizan cebadores o primers, pero no pueden ser cualquiera, el primer a utilizar debe ser “específico” ya que debe ser complementario para el fragmento de ADN que se quiere amplificar. Dicho en otras palabras, lo que se busca con este proceso es replicar muchas veces el mismo proceso que ocurre dentro de la célula para replicar su ADN. (Diz Mellado, 2020b, p.3)<sup>5</sup>

Este proceso lleva una serie de pasos que son la desnaturalización, el alineamiento y la elongación o extensión. En la desnaturalización se somete el ADN a elevaciones de temperatura para provocar la ruptura de las uniones de las cadenas (puentes de hidrogeno) y así obtener dos cadenas separadas que sirvan de molde para darle lugar a los primer para que realicen el proceso de alineamiento donde estos se unen a las cadenas separadas, a partir de aquí comienza el proceso de extensión donde los primers agregaran nucleótidos nuevos que sintetizaran una nueva cadena de ADN sobre la cadena molde a modo de obtener una nueva molécula de ADN de doble hélice. Para esto se puede utilizar un equipo llamado termociclador el cual repite estos pasos haciendo varios ciclos de amplificación. (Diz Mellado, 2020c, p. 3-4)<sup>6</sup>

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional, el trabajo que esta realiza consiste en que mientras realiza la amplificación los ácidos nucleicos al mismo tiempo se está dando la detección, dicho de otro modo, al mismo tiempo que se produce las copias del ADN se ira produciendo la fluorescencia haciendo que la cantidad detectada por el lector de fluorescencia sea proporcional a la cantidad de amplificaciones que se produzcan.

Las ventajas que esta PCR posee sobre la PCR convencional es que es más sensible por lo explicado anteriormente y da resultados en menos tiempo ya que esta realiza la amplificación y la detección al mismo tiempo a diferencia de la convencional que lo hace un paso después del otro. Un fluoroforo muy utilizado en esta PCR en tiempo real es el SYBR Green ya que esta posee carga

positiva la cual se une fácilmente al ADN y no produce fluorescencia de manera libre y de hacerlo es para unirse a la fracción del ADN que se produzca.

El GeneXpert es una plataforma o sistema el cual fue hecho por una empresa llamada Cepheid en Estados Unidos en el 2009, fue hecho como una plataforma para PCR en tiempo real y como tal puede hacer el proceso de amplificación y detección simultáneamente, pero lo que lo hace especial en cuanto a estos procesos es que fue diseñada para trabajar de manera automática las etapas que involucra la realización de una PCR, pero ¿qué significa esto? que para esta plataforma solo se necesita mezclar una parte de la muestra con un buffer que lisa la muestra y después se introduce una parte de la mezcla en un cartucho de prueba específico en el cual después se introduce dentro de un módulo que funciona como termociclador y en el interior del cartucho realiza la extracción de los ácidos nucleicos, la amplificación y la detección de estos. (Herrera et al.,2017, p.7)<sup>7</sup>

Ciertamente esta plataforma es una maravilla en cuanto al diagnóstico ya que puede procesar pruebas para organismos como el virus sincitial respiratorio o VIH. Pero en lo que respecta al diagnóstico de la tuberculosis de la plataforma GeneXpert se han realizado ensayos específicos para esto, uno de estos es el Xpert MTB/RIF es cual se trata de un ensayo que aparte de realizar la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* también puede detectar la presencia del gen *rpoB* que es específico de la resistencia a la rifampicina el cual es medicamento que se utiliza para tratamiento de la tuberculosis ya que la resistencia a este fármaco puede representar un problema para el paciente al momento de llevar este tratamiento.

La plataforma presenta algunas ventajas como por ejemplo el uso de los cartuchos, estos se podrían considerar como un sistema cerrado de biología molecular, algo así como un pequeño laboratorio dentro de un cartucho ya que este contiene en su interior cámaras donde se encuentran los reactivos y soluciones necesarios para el ensayo, este es desechable después de su uso, esto ayuda a reducir

el riesgo de contacto con la muestra ya que solo utiliza una pequeña porción de la mezcla que es de 2 ml o 1.5 ml como mínimo, esto a su vez representa menos requisitos de seguridad, dicho de otro modo, realiza la identificación dentro un volumen muy pequeño. Otra ventaja que considerar es la sensibilidad, este tiene una sensibilidad que puede detectar como límite 5 copias del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* y a 114 UFC/mL en muestras de esputo, hay otra versión de esta plataforma que es aún más sensible que se llama Xpert MTB/RIF Ultra, este puede detectar hasta 16 UFC y es mejor en cuanto a la precisión para detectar la resistencia a la rifampicina. En cuanto al tiempo de procesamiento, se tarda alrededor de 2 horas en el caso del MTB/RIF para poder dar un resultado, alrededor de 50 minutos en el caso del MTB/RIF Ultra, en esto supera a la baciloscopia que puede tardar más horas y al cultivo que puede tardar hasta 60 días, aparte de esto también los supera en cuanto al trabajo y la bioseguridad ya que no están laborioso como lo sería realizar una baciloscopia o un cultivo y requiere menos procedimientos bioseguridad. Sin embargo, frente a estas ventajas tiene sus desventajas. En caso del seguimiento durante el tratamiento no nos sirve el GeneXpert ya que este solo detecta la presencia del *Mycobacterium*, en estos casos es mejor usar la baciloscopia que se recomienda para seguimiento de pacientes con tratamiento, por esto que no se vuelve del todo inutilizable frente a la plataforma aparte que aún es una prueba que todavía se usa en centros de salud de nivel intermedio como lo son algunas unidades de salud y donde no tienen al alcance esta tecnología por los costos que es otra desventaja, ya que el tener el acceso a esto resulta costoso.

El cultivo aún resulta útil a la par del GeneXpert ya que se realiza un paso de inactivación de la muestra para evitar riesgos de contaminación e infección y al realizar el cultivo de la muestra se puede saber si esta inactivada o no dependiendo si presenta crecimiento de colonias bacterianas.

En algunos de los casos en los cuales se puede indicar el GeneXpert como prueba inicial pueden ser: en niños y adultos de los que se tengan sospechas de tuberculosis pulmonar, con adultos sin antecedentes de tuberculosis o con antecedentes de que ya haya pasado muchos años desde su último tratamiento, en casos donde se haya obtenido aspirado nasofaríngeo u otras muestras como líquido cefalorraquídeo, heces, cortes de tejido, líquido gástrico, pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, pacientes con diabetes y que se sospeche que padezca de tuberculosis, pacientes inmunodeficientes y que se sospeche que padezcan tuberculosis, pacientes a los que se les haya observado alteraciones radiológicas y se sospeche de tuberculosis.

La plataforma GeneXpert llegó a El Salvador en 2012 y es el único país en Centroamérica en poseerla y a pesar de ser una prueba costosa para el país el costo de obtención fue menos de lo que sería para otros países gracias a un convenio con la OMS como una ayuda a países de bajos recursos.

La plataforma fue validada al principio para utilizar muestras de esputo, pero se pueden utilizar muestras de aspirado nasofaríngeo, heces, líquido gástrico, líquido cefalorraquídeo y cortes de tejido, aunque de estas la de esputo es la mejor ya que proviene de los pulmones y es el órgano comúnmente afectado en casos de tuberculosis.

### III. CONCLUSIONES

Tal y como se ha observado, la tuberculosis es una enfermedad problemática en cuanto a sus afecciones pulmonares y extrapulmonares sobre todo las pulmonares ya que es en los pulmones donde se encuentra el ambiente con las condiciones ideales para el *Mycobacterium tuberculosis*. Todas las personas pueden llegar a ser víctimas de esta enfermedad en especial aquella con padecimientos como el VIH, también con enfermedades como la diabetes y aquellos pacientes con antecedentes de haber padecido tuberculosis. Para poder ayudar en el diagnóstico se crearon técnicas como la baciloscopia y el cultivo, pero como un resultado de estas pruebas puede tardar días, incluso meses, esto generaba complicaciones al momento de querer dar un tratamiento inmediato al paciente afectado, se optó también por implementar la biología molecular como técnica diagnóstica, en este caso se habla específicamente del GeneXpert con algunas de sus variantes: Xpert MTB/RIF y Xpert MTB/RIF Ultra que es aún más sensible que la anterior, se pudo cubrir esta necesidad y como un plus se logró un aumento en la sensibilidad diagnóstica por parte de estos ensayos moleculares. Este sistema no solo ha sido un gran aporte en el diagnóstico de la tuberculosis sino también un gran avance de la misma biología molecular ya que esta no solo permite amplificar y detectar al mismo tiempo el ADN, sino que también puede realizar todo el proceso de forma automática, tiene mayor sensibilidad y brinda un resultado en un periodo de tiempo corto en comparación de otras pruebas antes inventadas. Por estas cualidades el GeneXpert se podría considerar un ensayo de laboratorio casi perfecto. Sin embargo, la realidad es que no llega a serlo por algunas desventajas como lo es el elevado costo, también no es posible saber si la bacteria está inactiva y tampoco funciona para la evaluación de tratamiento para lo cual se necesita tanto la baciloscopia como el cultivo. En resumen, de esto se puede afirmar que, aunque se pueda ver como una maravilla tecnológica y un gran avance el diagnóstico de la tuberculosis al final no

resulta ser perfecta y en algún momento durante el seguimiento que se le da a un paciente se recurre a las técnicas clásicas por lo cual y hasta el momento no logra dejarlas de lado durante el diagnóstico. Al final no siempre se puede valer de una sola herramienta por lo cual a veces hay que recurrir a otro tipo de recursos.

#### IV. FUENTES DE INFORMACION

1. Dr. Herrera Martínez Tania, T.M. Arias Muñoz Fabiola, E.U. Ruiz Lobos Natalia.  
  
(2017). Manual Operativo Implementación del GeneXpert MTB/RIF en el Programa de Tuberculosis. Programa de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud Gobierno de Chile. P. 5  
  
[https://diprece.minsal.cl/wrdprss\\_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/2018.01.23  
MANUAL-XPERT.pdf](https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/2018.01.23_MANUAL-XPERT.pdf)
  
2. Dr. Herrera Martínez Tania, T.M. Arias Muñoz Fabiola, E.U. Ruiz Lobos Natalia.  
  
(2017). Manual Operativo Implementación del GeneXpert MTB/RIF en el Programa de Tuberculosis. Programa de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud Gobierno de Chile. P. 5  
  
[https://diprece.minsal.cl/wrdprss\\_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/2018.01.  
23 MANUAL-XPERT.pdf](https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/2018.01.23_MANUAL-XPERT.pdf)
  
3. Tuberculosis. (s.f.). Organización Mundial de la Salud OMS/ Organización Panamericana de la Salud OPS.  
  
<https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis#:~:text=La%20tuberculosis%20sigue%20siendo%20una,especialmente%20en%20los%20m%C3%A1s%20vulnerables>
  
4. Diz Mellado Olga María. (2020). TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Revistas NPunto Volumen III. Número 30. Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. P. 2-3  
  
<https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en->

[eldiagnostico-de-enfermedadesinfecciosas#:~:text=Las%20t%C3%A9cnicas%20de%20biolog%C3%ADa%20molecular%20sirven%20para%20analizar%20%C3%A1cidos%20nucleicos,extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20o%20ARN.](#)

5. Diz Mellado Olga María. (2020). TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Revistas NPunto Volumen III. Número 30. Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. P. 3
- <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-eldiagnostico-de-enfermedadesinfecciosas#:~:text=Las%20t%C3%A9cnicas%20de%20biolog%C3%ADa%20molecular%20sirven%20para%20analizar%20%C3%A1cidos%20nucleicos,extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20o%20ARN.>

6. Diz Mellado Olga María. (2020). TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Revistas NPunto Volumen III. Número 30. Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. P. 3-4
- <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-eldiagnostico-de-enfermedadesinfecciosas#:~:text=Las%20t%C3%A9cnicas%20de%20biolog%C3%ADa%20molecular%20sirven%20para%20analizar%20%C3%A1cidos%20nucleicos,extracci>

[%C3%B3n%20de%20ADN%20o%20ARN.](#)

7. Dr. Herrera Martínez Tania, T.M. Arias Muñoz Fabiola, E.U. Ruiz Lobos Natalia.

(2017). Manual Operativo Implementación del GeneXpert MTB/RIF en el Programa de Tuberculosis. Programa de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud Gobierno de Chile. P. 7

[https://diprece.minsal.cl/wrdprss\\_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/20](https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wpcontent/uploads/2018/02/20)

[18.01.23 MANUAL-XPRT.pdf](#)