



**Facultad de Ciencias de la Salud
- Medicina**

Universidad de La Laguna

**EFFECTIVIDAD DE LAS
VACUNAS
BACTERIANAS PARA
LA PREVENCIÓN DE
AFECCIONES DE VÍAS
RESPIRATORIAS
ALTAS**

Revisión bibliográfica

Curso 2019/2020
Convocatoria de Julio

Pablo Monsalve Sosa
Tutor: Dr. Blas Pérez Piñero

RESUMEN

Introducción: Las infecciones de vías respiratorias son una patología que afecta a gran parte de la población mundial y uno de los motivos de consulta más frecuentes. Además, suponen un gasto no despreciable de recursos sanitarios y por lo tanto económicos. Desde principios del siglo XX las vacunas bacterianas han sido vistas como una terapia con capacidad para evitar o reducir la patología infecciosa de vías aéreas superiores pero aun a día de hoy existen diferencias de opinión entre los profesionales médicos acerca de si son verdaderamente eficaces.

Objetivo: recabar la evidencia existente en la literatura científica médica acerca del uso de vacunas bacterianas como prevención de las infecciones de vías respiratorias altas con el fin de extraer conclusiones en cuanto a si son verdaderamente útiles en la prevención de esta patología.

Material y Método: Este trabajo se ha realizado a través de la búsqueda de ensayos clínicos aleatorios y revisiones bibliográficas según unos criterios de exclusión específicos utilizando las principales bases de datos: *Embase, ScienceDirect, Cochrane, Pubmed, Medline, el Punto Q de la Universidad de la Laguna, el Registro de Ensayos clínicos de la Unión Europea y Google Scholar.*

Resultados: Las vacunas bacterianas se utilizan con frecuencia en la práctica clínica, pero no queda totalmente claro si son más eficaces a otras terapias utilizadas. Los resultados que brindan varían mucho de unos pacientes a otros y es difícil reproducirlos.

Conclusión: Pese a que la evidencia que existe a favor de las vacunas bacterianas apunta a que su uso supone una reducción en la frecuencia de infecciones de vías respiratorias superiores, se recomienda realizar futuros estudios de manera singularizada y con una muestra más amplia.

Palabras clave: “vacuna autógena”, “autovacuna”, “vacunas bacterianas”, “vacuna conjugada”, “eficacia”, “infección de vías aéreas superiores”.

ÍNDICE

Contenido

Contenido	3
1. Introducción	4
2. Justificación	4
3. Objetivos.....	5
Objetivo principal	5
Objetivos secundarios	5
4. Materiales y método.....	6
5. Resultados.....	7
Tabla de resultados de la búsqueda bibliográfica	11
6. Discusión.....	19
7. Conclusiones	20
8. Qué he aprendido con el TFG	20
9. Bibliografía	21
10. Referencias en el texto	22

1. Introducción

En 1903, Wright¹ publicó el que fue el primer artículo de la literatura en el que se menciona el uso de vacunas bacterianas, hoy en día llamadas también autovacunas o vacunas autógenas.

Estas vacunas funcionan bajo la siguiente premisa: se obtienen muestras de la flora bacteriana del paciente que se cultivan para luego preparar vacunas que contengan dichas bacterias. Posteriormente se administran al paciente del que se extrajeron las muestras con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune adquirida contra estas bacterias. Actualmente, muchas de estas vacunas vienen en una presentación oral y se emplean para la prevención de varias patologías como la ITU o las infecciones de vías aéreas superiores (VAS). Estas últimas serán el foco de este TFG.

En el momento en que Wright publicó este artículo todavía se pagaba en chelines, no había antibióticos y las transfusiones de sangre eran un procedimiento novedoso tras el reciente descubrimiento de los grupos sanguíneos. Más de un siglo después, la comunidad médica no ha alcanzado un consenso sobre la eficacia de estas vacunas a la hora de prevenir las infecciones de vías aéreas superiores. Hay quienes las defienden como una herramienta preventiva útil para reducir la frecuencia de infecciones de VAS mientras que otros dicen que no suponen un beneficio para los pacientes. A lo largo de esta revisión bibliográfica se abordará la literatura existente y se analizará la evidencia para tratar de discernir si son verdaderamente eficaces en la prevención de esta patología.

2. Justificación

Las afecciones de vías respiratorias altas son una de las patologías más frecuentes y consistentemente prevalentes en la salud pública, con un característico repunte en los meses más fríos. Se estima que causan 2,8 millones de muertes cada año a nivel mundial. Son además fuente de complicaciones en pacientes con predisposición como, por ejemplo, exacerbaciones de EPOC o neumonías en pacientes no inmunocompetentes. Por ello, suponen una carga sanitaria con la que los servicios sanitarios saben que van a tener que lidiar cada año inevitablemente.

Es por esto por lo que las vacunas bacterianas pueden jugar un papel fundamental para disminuir la prevalencia y morbilidad de esta patología. Profesionales de numerosos servicios como ORL o neumología prescriben a menudo estas vacunas a sus pacientes, sobre todo en aquellos particularmente vulnerables a desarrollar complicaciones adversas si llegaran a tener una infección de VAS.

El objetivo de esta búsqueda bibliográfica es lograr una valoración objetiva del impacto que el uso de estas vacunas está teniendo: valorar si son eficaces mediante la búsqueda y análisis de la literatura científica publicada sobre estas vacunas. Permitirá ver si el empleo de estas es o no un factor determinante para la prevención de afecciones de vías respiratorias altas.

La realización del estudio se justificará en base a toda la información relevante y específica de la que se disponga. En este apartado deben resumirse los hallazgos previos que puedan ser relevantes para el estudio actual, así como los riesgos y beneficios conocidos y potenciales, si los hubiera, para los seres humanos.

3. Objetivos

Objetivo principal

Hacer una revisión bibliográfica sobre la eficacia del uso de vacunas bacterianas como prevención de las infecciones de vías respiratorias altas y extraer conclusiones en cuanto a si son verdaderamente efectivas.

Objetivos secundarios

- Comprobar lo extendido que está el uso de estas vacunas.
- Explicar en qué fundamentos fisiológicos se basan las vacunas bacterianas para desarrollar una inmunidad.

4. Materiales y método

Para la realización de este trabajo se ha hecho una búsqueda de información en las principales bases de datos científicas: *Embase*, *ScienceDirect*, *Cochrane*, *Pubmed*, *Medline*, *el Punto Q de la Universidad de la Laguna*, *el Registro de Ensayos clínicos de la Unión Europea* y *Google Scholar*.

La búsqueda se ha realizado en bases de datos de relevancia, utilizando las siguientes palabras claves: “autogenous vaccine”, “autovaccine”, “Bacterial vaccines”, “pneumococcal conjugate vaccine”, “Upper respiratory tract infection”.

- Los criterios de exclusión fueron:
 - Prevención de las infecciones de vías respiratorias altas por medio de otras técnicas que no fueran vacunas bacterianas
 - Estudios que no especificaran el número de muestra escogido.
 - Artículos publicados en otro idioma que no fuera español, inglés o alemán.
 - Artículos cuyo texto completo no estuviera accesible.
 - Artículos duplicados en las diferentes bases de datos consultadas

- Los criterios de inclusión fueron:
 - Prevención de las infecciones de vías respiratorias altas con vacunas bacterianas.
 - Evidencia de los mecanismos teóricos por los que funcionan estas vacunas.
 - Ensayos clínicos controlados aleatoriamente y revisiones bibliográficas.
 - Artículos publicados en inglés, español o alemán.

La primera búsqueda en las bases de datos se hizo con el descriptor “vacuna bacteriana” arrojó numerosos resultados. Para poder concretar la búsqueda se añadieron más descriptores como: “autogenous vaccine”, “efficacy”, “upper respiratory tract”, “autovaccine” e “infection”.

Con todo esto, se seleccionaron un total de 32 artículos, de los cuales, considerando los criterios de exclusión, nos quedamos con 15. De estos 15 artículos, 5 son estudios de casos controles o de cohortes con pacientes reales y 10 son otros artículos hechos en laboratorios, de carácter analítico experimental que dan una base de evidencia que avala a los principios inmunológicos por los que estas vacunas contribuyen al desarrollo de inmunidad adquirida mediante estudios analítico experimentales.

5. Resultados

Alecsandru et al.² hicieron un ensayo clínico unicéntrico analítico experimental, donde el número de la muestra fue de 17 individuos. Estos fueron elegidos si tenían tres o más episodios de rinitis, faringitis y amigdalitis en los 12 meses anteriores (según los registros médicos de las clínicas ambulatorias); dos o más nuevas infecciones de oído y/o sinusitis y/o bronquitis dentro de 1 año en ausencia de alergia; un episodio de neumonía por año durante más de 1 año; exacerbaciones persistentes de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) por infecciones de tracto respiratorio; infecciones virales recurrentes (resfriados y herpes); necesidad recurrente de cursos de antibióticos orales y/o intravenosos y/o hospitalizaciones para eliminar infecciones en los 12 meses anteriores.

Los 17 sujetos que participaron en el estudio se les administró la vacuna bacteriana sublingual diariamente durante 6 meses. Se midió el número de episodios de infecciones de vías respiratorias en los 12 meses previos a la vacuna, el número de episodios de infecciones de vías respiratorias en los 12 meses siguientes a la administración de la vacuna. Asimismo, se registraron los niveles plasmáticos y salivales de los parámetros humorales antes y después del tratamiento. (Los parámetros humorales medidos fueron IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Los resultados obtenidos revelaron que el número de episodios de infecciones de vías respiratorias altas en los 12 meses posteriores a la vacuna se redujo comparado con los 12 meses previos.

Hasan Razi et al.³ comprobaron mediante un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo el efecto de las autovacunas. Para ello, dividieron en dos grupos a los 75 pacientes que escogieron de muestra: el grupo control recibió un placebo mientras al otro grupo le fue dada la vacuna. Los pacientes recibieron 8 sesiones de tratamiento durante 4 u 8 semanas. Se les midió el número de ataques de asma y hospitalizaciones en los 12 meses previos a la puesta en marcha del estudio y el número de ataques de asma en los 12 meses siguientes a la puesta en marcha del estudio.

Los resultados obtenidos nos revelan que el grupo tratado con vacunas experimentó una reducción significativa del número de ataques de asma con respecto a los controles. En el grupo al que le fue administrada la vacuna se redujeron un 31,4%.

El estudio realizado por Mueller y Lanz⁴ trata de medir la efectividad de las autovacunas mediante dos tipos de estudios: uno de casos controles a doble ciego y un estudio longitudinal siguiendo a una cohorte de sujetos.

El estudio de casos controles constó de 14, pero tuvo que ser abandonado prematuramente debido a que los pacientes con placebo sufrieron episodios de graves infecciones respiratorias. Los sujetos que recibieron la vacuna tuvieron menos infecciones respiratorias y las que tuvieron fueron más leves.

En el estudio longitudinal que contó con la participación de 62 pacientes a los que se siguió durante tres años todos ellos recibieron la vacuna y la frecuencia y gravedad de ataques

de asma infeccioso se redujeron. Antes del inicio del tratamiento los sujetos padecían una media de 4,9 infecciones respiratorias con asma al año.

- En el primer año tras el tratamiento la cifra bajó a 2,5.
- En el segundo año bajó a 1,25.
- en el tercer año bajó a 0,87.

Fontana et al.⁵ realizaron un estudio de casos controles a doble ciego para evaluar la eficacia de la vacuna en el asma. Escogieron un número de muestra de 30 pacientes pediátricos de los que midieron la incidencia de los días de sibilancia, el número de episodios de infección asociada a sibilancia y la cantidad de medicación para el asma usada durante un año previo al inicio del tratamiento y durante los dos años posteriores.

Los resultados muestran que de los pacientes tratados con vacunas bacterianas el 46,7% tenían menos episodios de asma en el primer año tras el inicio de tratamiento que en el año anterior, mientras que 73,3% del grupo placebo tuvo menos episodios asmáticos comparado con el año previo al inicio del tratamiento.

En el grupo vacunado, el 40% tuvieron una mayor incidencia de infección respiratoria en el año siguiente al inicio del tratamiento comparado con el año previo al inicio del tratamiento. Este estudio por tanto, suscita inquietud porque demuestra que aunque las vacunas han demostrado dar beneficios en otros estudios, los resultados que dan son difíciles de reproducir porque varían de paciente a paciente y a priori no tenemos medios que permitan saber cómo de efectiva será la vacuna en los pacientes a los que se les da.

Bitaar & Saade⁶ llevaron a cabo un estudio de cohortes retrospectivo a cinco años para intentar medir la eficacia de una vacuna en la prevención de la amigdalitis aguda recurrente en niños. Escogieron una muestra de 177 pacientes pediátricos de 1 a 15 años y registraron edad, sexo, antecedentes de amigdalitis aguda recurrente y resultados de estudios de laboratorio (no se tomaron durante una enfermedad aguda): nivel de hemoglobina total, recuento de glóbulos blancos (WBC), velocidad de sedimentación globular (VSG), nivel de proteína c reactiva (PCR), análisis de orina, título de antiestreptolisina O (ASO) y cultivos de garganta.

También anotaron la modalidad de tratamiento utilizada (vacuna bacteriana, amigdalectomía y antibióticos). Para los pacientes que recibieron la vacuna, la respuesta al tratamiento se evaluó 3 meses después del inicio del tratamiento (es decir, al final del curso del tratamiento). La respuesta se clasificó de la siguiente manera: sin respuesta, sin cambio o aumento en la frecuencia de los episodios de amigdalitis aguda; Respuesta parcial: disminución de la frecuencia de episodios de amigdalitis aguda en un 50%; y Respuesta total: disminución de la frecuencia de episodios de amigdalitis aguda en > 50%. De los 177 pacientes vistos, 131 (el 74%) recibieron la vacuna bacteriana como terapia inicial, y 99 (75.6%) mostraron respuesta (51.2% total y 24.4% respuesta parcial). Ninguno de los pacientes que mostraron una respuesta total requirió amigdalectomía en el seguimiento a largo plazo, mientras que en aquellos con respuesta parcial, el 34,4% requirió amigdalectomía posterior (mediana de seguimiento: 9 meses).

En conclusión, el tratamiento con la vacuna bacteriana redujo la frecuencia de episodios a corto plazo y muy pocos pacientes acabaron necesitando una amigdalectomía.

Los trabajos de Wong et al⁷ y de G. Mogi et al⁸ han sido ha menudo citados por sus hallazgos a la hora de demostrar la presencia de Inmunoglobulinas en amígdalas y mucosa de la vías respiratorias altas, lo que da una base fisiológica a la utilidad de las vacunas bacterianas a la hora de prevenir infecciones en ellas. Gnehm et al⁹, mediante un estudio analítico experimental, ofrecen evidencia de que estas inmunoglobulinas luego son capaces de erradicar colonias de bacterias con las que se pongan en contacto.

Clement et al¹⁰ aportaron evidencia mediante un estudio analítico experimental en ratones que la exposición a antígenos es capaz de estimular la inmunidad innata y aumentar su resiliencia frente a infecciones.

Bowman y Holt¹¹ llevaron a cabo un estudio de casos controles también en ratones con la intención de comprobar si es posible inducir la inmunidad dependiente de linfocitos Th1 mediante la exposición a antígenos. Para ello, en su estudio incluyeron ratones tanto adultos como lactantes y pudieron observar que los lactantes expuestos a un antígeno durante la primera semana de vida desarrollaron memoria inmunológica dependiente de linfocitos TH2 equivalente a la de un adulto. Con todo los animales que recibieron la vacuna mostraron una regulación positiva selectiva en las respuestas primaria y secundaria de IgG2b, acompañadas de un aumento de interferón gamma y una disminución de la producción de interleucina-4.

Boele et al¹² llevaron a cabo un estudio de casos controles en el expusieron células dendríticas a antígenos de diversas bacterias y posteriormente midieron la expresión de CD80, CD96, HLADR, CD83 y receptores Toll que causaba cada uno de ellos. Hallaron que la activación de receptores TLRs, TLR4 por parte de las bacterias se correlaciona con su capacidad para inducir maduración de células dendríticas. Morandia et al¹³ por su parte realizaron un estudio analítico experimental para determinar cómo la presencia de cepas bacterianas distintas influye en la expresión de receptores para dichas bacterias por parte de las células dendríticas. Sus resultados sugieren que las vacunas polibacterianas son más efectivas en inducir la maduración de células dendríticas que aquellas que contienen una sola especie.

Frankland et al¹⁴ ofrecen una perspectiva interesante porque son una de las voces más críticas con estas vacunas. Realizaron un estudio de casos controles con 190 pacientes en el que registraron la gravedad del asma al inicio del estudio, el uso de medicamentos, la evolución del asma durante la evolución del estudio y la mejoría o empeoramiento de la enfermedad al acabar el estudio con respecto al inicio. Los resultados que obtuvieron fueron que las vacunas no produjeron mayor beneficio que el placebo: en ambos grupos más del 50% de los pacientes se vieron beneficiados por el tratamiento.

Eisen y Bacal¹⁵ realizaron un estudio analítico experimental en el que inocularon a 13 pacientes con varias especies de bacterias. Este estudio es relevante para el tema que nos atañe porque registraron que no todas las especies bacterianas generan una respuesta igual en la inmunidad específica de unos pacientes a otros.

Tabla de resultados de la búsqueda bibliográfica

Autores	Muestra	Tipo de estudio	Diseño del estudio	Variables a medir	Resultados
<p>D Alecsandru, L Valor, S Sánchez-Ramón, J Gil, J Carbone, J Navarro, J J Rodríguez, C Rodríguez-Sainz, and E Fernández-Cruz</p>	<p>17 Pacientes adultos:</p>	<p>Ensayo clínico unicéntrico analítico experimental</p>	<p>Un único grupo de estudio. Los sujetos del estudio tenían que cumplir 3 criterios: 3 tomas episodios de rinitis, faringitis y amigdalitis en los 12 meses anteriores</p>	<p>Número de episodios de infecciones de vías respiratorias en los 12 meses previos a la vacuna</p> <p>Número de episodios de infecciones de vías respiratorias en los 12 meses siguientes a la administración de la vacuna.</p> <p>Estadística descriptiva (mediana y primer y tercer cuartil) de los niveles plasmáticos y salivales de los parámetros humorales antes y después del tratamiento. (Los parámetros humorales medidos fueron IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,</p> <p>Anti-PPC antibody, Anti-TT antibody, Salivary IgA)</p>	<p>El número de episodios de infecciones de vías respiratorias altas en los 12 meses posteriores a la vacuna se redujo comparado con los 12 meses previos.</p> <p>Todos los pacientes mostraron una respuesta conservada de anticuerpos a antígenos de polisacárido y proteína y niveles normales de células B, T y NK (Tabla 2).</p> <p>Siete de 17 (41%) pacientes con RRTI presentaron alteraciones de la respuesta inmune humoral (uno deficiencia selectiva de IgA, dos deficiencias selectivas de subclase de IgG4 y cuatro IgG leves hipogammaglobulinemia). Sin embargo,</p> <p>La vacuna, que fue administrada sublingual diariamente durante 6 meses. fue bien tolerada sin reacciones adversas.</p>

<p>Cem Hasan Razi, MD, Koray Harmancı, MD, Ayhan Abacı, MD, Osman Özdemir, MD, S,amil Hızlı, MD, Rahime Renda, MD,c and Fersin Keskin, MDd</p>	<p>75 sujetos pediátricos</p>	<p>randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study</p>	<p>2 grupos de estudio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de control a los que se daba placebo • Grupo al que se administraba la vacuna 	<ul style="list-style-type: none"> • Número de ataques de asma y hospitalizaciones en los 12 meses previos a la puesta en marcha del estudio • Número de ataques asma en los 12 meses siguientes a la puesta en marcha del estudio 	<p>Reducción significativa del número de ataques de asma en el grupo de casos con respecto a los controles. En el grupo al que le fue administrada la vacuna se redujeron un 31,4%.</p>
<p>H. Mueller, M. Lanz</p>	<p>Caso control: 14 sujetos pediátricos</p> <p>Estudio longitudinal: 62 sujetos pediátricos</p>	<p>Caso control doble ciego</p> <p>Y estudio longitudinal</p>	<p>Caso control: 2 grupos de estudio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de control a los que se daba placebo • Grupo al que se administraba la vacuna <p>Estudio longitudinal: una única cohorte de sujetos de los que se registraban los episodios de infección respiratoria</p>	<p>Caso control doble ciego: 14 pacientes de los cuales 5 recibieron placebo. Se midieron el número de infecciones respiratorias desde un año antes de recibir la vacuna/placebo y durante dos años después de haberla recibido.</p> <p>Estudio longitudinal: 62 pacientes recibieron la vacuna. Se midieron:</p> <ul style="list-style-type: none"> • el número de pacientes que no tenían sibilancias (con o sin infección respiratoria) • El número de paciente que tenían sibilancias con una única infección respiratoria. <p>Estos datos se registraron en el año previo al tratamiento y los cuatro posteriores</p>	<p>En el grupo de casos controles, los sujetos que recibieron la vacuna tuvieron menos infecciones respiratorias y las que tuvieron fueron más leves.</p> <p>En el estudio longitudinal se redujo la frecuencia y gravedad de ataques de asma infeccioso. Previamente al tratamiento los sujetos padecían una media de 4,9 infecciones respiratorias en asma al año.</p> <ul style="list-style-type: none"> • En el primer año tras el tratamiento la cifra bajó a 2,5. • En el segundo año bajo a 1,25 • en el tercer año bajó a 0,87

<p>Vincent J. Fontana, Angela S. Salanitro, MD, Harvey I. Wolfe, MD and Fernando Moreno, MD</p>	<p>30 pacientes pediaticos</p>	<p>casos controles a doble ciego</p>	<p>2 grupos de estudio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de control a los que se daba placebo • Grupo al que se administraba la vacuna 	<p>Se midió la incidencia de los días de sibilancia, el número de episodios de infección asociada a sibilancia y la cantidad de medicación para el asma usada durante un año previo al inicio del tratamiento y durante los dos años posteriores</p>	<p>46,7% de los pacientes tratados con vacunas bacterianas tenían menos episodios de asma en el primer año tras el inicio de tratamiento que en el año anterior, mientras que 73,3% del grupo placebo tuvo menos episodios asmáticos comparado con el año previo al inicio del tratamiento. En el grupo vacunado, el 40% tuvieron una mayor incidencia de infección respiratoria en el año siguiente al inicio del tratamiento comparado con el año previo al inicio del tratamiento.</p>
---	--------------------------------	--------------------------------------	--	--	---

Autores	Muestra	Tipo de estudio	Objetivo	Método	Variables a medir	Resultados
Cecilia G. Clement, Scott E. Evans, Christopher M. Evans, David Hawke, Ryuji Kobayashi, Paul R. Reynolds, Seyed J. Moghaddam, Brenton L. Scott, Ernestina Melicoff, Roberto Adachi, Burton F. Dickey, and Michael J. Tuvim	Ratones hembra mastocito deficientes de 9 a 10 semanas de edad. Ratones C57BL/6 KitW-sh/KitW-sh y ratones C57BL/6 Kit1/Kit1	Analítico experimental	Determinar la capacidad para inducir la activación de las defensas pulmonares innatas contra una proliferación bacteriana.	Los ratones fueron expuestos a un lisado en aerosol de Haemophilus influenzae (NTHi) no matizable ultravioleta (no encapsulado), luego se expusieron con una dosis letal de Streptococcus pneumoniae (Spn) vivo administrado por aerosol.	Cantidad de S. pneumoniae inoculada, Días de supervivencia, recuento de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos	la protección radica en la estimulación de los mecanismos de inmunidad innata locales, y ese epitelio pulmonar activado es el efector celular más probable de esta respuesta. El aumento de las defensas antimicrobianas innatas de los pulmones podría tener valor terapéutico.
Mohamed A. Bitar, Rami Saade	177 pacientes pediátricos. La edad media de los pacientes fue de 4.5 años (rango: 1-15 años) con un 63.8% siendo hombres.	Estudio de cohortes retrospectivas a 5 años	Evaluar la eficacia de un broncovaxom inmunoestimulante (lisado bacteriano) en el tratamiento de niños con amigdalitis aguda recurrente.	Los criterios de inclusión fueron la edad entre 6 meses y 18 años y un diagnóstico de amigdalitis aguda recurrente (más de tres episodios distintos en los últimos 12 meses [2]) en la presentación en nuestra clínica durante el período de estudio. Los criterios de exclusión fueron la inmunodeficiencia, las	Edad, sexo, antecedentes de amigdalitis aguda recurrente y resultados de estudios de laboratorio (no tomados durante una enfermedad aguda): nivel de hemoglobina total, recuento de glóbulos blancos (WBC), velocidad de sedimentación globular (VSG), nivel de proteína c reactiva (PCR),	131 (74%) pacientes recibieron Broncho-Vaxom como terapia inicial, y 99 (75.6%) mostraron respuesta (51.2% total y 24.4% respuesta parcial). Un nivel de VSG normal fue el único predictor de respuesta total en comparación con la ausencia de respuesta (OR: 3.53, IC 95%: 1.03–12.07); mientras que los niveles normales de VSG (OR: 7,15 veces, IC 95%: 1,18–43,39) y CRP

				<p>amígdalas obstructivas que requieren amigdalectomía y el uso de moduladores inmunes que no sean el fármaco del estudio. Los pacientes son atendidos en nuestra clínica al menos 10 días después del último episodio agudo. La amigdalitis aguda altamente recurrente se definió como siete o más episodios de amigdalitis aguda en 1 año, cinco episodios por año durante dos años consecutivos o tres episodios por año durante tres años consecutivos.</p>	<p>análisis de orina, título de antistreptolisina O (ASO) y cultivos de garganta. También se registró la modalidad de tratamiento utilizada (broncovaxom, amigdalectomía y antibióticos). Para los pacientes que recibieron Broncho-Vaxom, la respuesta al tratamiento se evaluó 3 meses después del inicio del tratamiento (es decir, al final del curso del tratamiento). La respuesta se clasificó de la siguiente manera: sin respuesta, sin cambio o aumento en la frecuencia de los episodios de amigdalitis aguda; Respuesta parcial, disminución de la frecuencia de episodios de amigdalitis aguda en un 50%; y Respuesta total, disminución de la frecuencia de episodios de amigdalitis aguda en > 50%. Todos los que respondieron a Broncho-Vaxom fueron seguidos más allá de los 3 meses,</p>	<p>normal (OR: 12,66, IC 95%: 1,43–111,86) fueron predictores independientes de respuesta total sobre parcial.</p> <p>Ninguno de los pacientes que mostraron una respuesta total requirió amigdalectomía en el seguimiento a largo plazo, mientras que en aquellos con respuesta parcial, el 34,4% requirió amigdalectomía posterior (mediana de seguimiento: 9 meses).</p> <p>En resumen, una proporción considerable de niños que reciben Broncho-Vaxom por amigdalitis aguda recurrente muestran una disminución en la frecuencia de episodios a corto plazo, y muy pocos pacientes eventualmente requieren amigdalectomía en el seguimiento a largo plazo.</p>
--	--	--	--	---	---	--

					ya sea en visitas de seguimiento posteriores o mediante una entrevista telefónica con los padres cuando las visitas de seguimiento no estaban disponibles.	
A.H. Eisen, H.L. Bacal	13 pacientes	Analítico experimental	Obtener datos de la respuesta inmunológica a vacunas bacterianas	Se inocularon vacunas bacterianas con varias especies de bacterias a 13 pacientes y luego se midieron los anticuerpos de cada una de ellas	Se estudiaron la reacción de Shartzman, la respuesta de leucocitos periféricos y el desarrollo de anticuerpos de anticuerpos para determinar la actividad de endotoxinas de la vacuna bacteriana.	La respuesta de leucocitos periféricos fue consistente con la actividad de endotoxinas; los otros parámetros no mostraron actividad definitiva de endotoxinas. Se sugiere un posible mecanismo inmunológico para explicar las reacciones clínicas tardías ocasionales que ocurren después de una inyección de vacuna bacteriana.
L. M. Bowman, P. G. Holt	Crías de ratas PVG.RT7b recién nacidas dentro de las 24 h del nacimiento y ratas machos adultas PVG.RT7b de 8 a 12 semanas de edad.	Casos controles	Comprobar si es posible inducir la inmunidad dependiente de linfocitos Th1 mediante la exposición a antígenos	Se hicieron cuatro grupos de estudio : <ul style="list-style-type: none"> • Ratones adultos tratados con vacuna • Ratones adultos tratados con placebo • Ratones neonatos tratados con vacuna • Ratones neonatos tratados con placebo. Se midieron los niveles de IgG1 e IgG2b en varias ocasiones	Niveles de IgG1, IgG2b	Las ratas lactantes expuestas a antígeno soluble durante la primera semana de vida mostraron un desarrollo de memoria inmunológica dependiente de T-helper 2 (Th2) equivalente al de ratas adultas, pero no desarrollaron la IgG2b dependiente de Th1. Los animales que recibieron la vacuna (OM-85) mostraron una regulación positiva

						selectiva en las respuestas primaria y secundaria de IgG2b, acompañadas de un aumento de interferón gamma y una disminución de la producción de interleucina-4 y una mayor capacidad de desarrollo de hipersensibilidad retardada dependiente de Th1 al antígeno desencadenante. Se presume que el extracto bacteriano funciona a través de la mejora del proceso de maduración postnatal de la función Th1, que normalmente es inducida por estímulos de la microflora comensal gastrointestinal.
Linda C.L. Boele, Jeffrey J. Bajramovic, Anne-Marij M.B.C. de Vries, Ingrid A.I. Voskamp-Visser, Wendy E. Kaman, Desiree van der Kleij,*	Células dendríticas (HEK) 293-CD14, HEK 293-CD14 /TLR2 y HEK 293-CD14 / TLR4 de riñón embrionario humano	Caso control analítico prospectivo en una población de células dendríticas.	Entender los efectos de los antígenos de diversas bacterias en las células dendríticas y medir la activación de los receptores tipo Toll.	Las células dendríticas fueron expuestas a antígenos de diversas bacterias y se midió la expresión de CD80, CD96, HLADR, CD83 y receptores Toll que causaba cada uno de ellos.	Expresión de CD80, CD86, HLADR y CD83: % de la población de células dendríticas que lo habían expresado en respuesta a un antígeno específico (la expresión de cada antígeno se midió por separado)	La activación de receptores TLRs, TLR4 por parte de las bacterias se correlaciona con su capacidad para inducir maduración de células dendríticas, mientras que la activación de TLR2 and TLR5 no se correlaciona con la capacidad para inducir la maduración de células dendríticas.

Barbara Morandia, Alessia Agazzib, Antonella D'Agostinob, Francesca Antoninib, Gregorio Costac, Federica Sabatinib, Guido Ferlazzoc, Giovanni Meliolib	Células dendríticas obtenidas de sangre entera de voluntarios	Analítico experimental	Determinar como la presencia de varias cepas bacterianas distintas influye en la expresión de receptores para dichas bacterias por parte de las células dendríticas	Se expusieron células dendríticas a fracciones de proteínas bacterianas en diferentes concentraciones y luego se evaluaba mediante inmunofluorescencia la expresión de los receptores para dichas bacterias de las células dendríticas.	Expresión de CD80, CD83 y CD86 y DR en función de la dosis de antígenos la que fueron expuestas. Secreción de las siguientes sustancias: IL12p70, TNF- α IL10, CXCL10, IFN- γ , IL1 β , IL-8, IL6, CCL5, CXCL9 y CCL2 IL-2	Los resultados sugieren que la fracción particulada de las mezclas de lisados bacterianos, debido a su capacidad de interactuar con diferentes estructuras de superficie, podría explotarse no solo como un inmunógeno, sino también como un tratamiento adyuvante para aumentar la respuesta inmune a proteínas pobremente "antigénicas". tales como antígenos cancerígenos o alérgenos.
Autores	Muestra	Tipo de estudio	Objetivo	Método	Variables a medir	Resultados

6. Discusión

Hemos encontrado varios artículos que apoyan nuestro objetivo. Después de haber hecho una selección según los criterios de exclusión, nos hemos quedado con 15 artículos.

Ha quedado claro que el uso de vacunas bacterianas está bastante extendido entre los profesionales. No obstante, según varios artículos, los resultados de estas vacunas no son lo bastante significativos como para justificar su uso.¹⁶

Si nos detenemos en el artículo de Frankland et al¹⁷, se puede ver que los pacientes vacunados no experimentaban una reducción en la intensidad o frecuencia de sus infecciones respiratorias comparados con el grupo control. Existen, sin embargo, estudios que avalan su eficacia como los estudios realizados por Alecsandru et al,¹⁸ Mueller et al, Bitaar & Saade y Hasan Razi et al¹⁹ donde revelan, por medio de estudios casos controles, que el tratamiento con vacunas bacterianas es capaz de reducir el número e intensidad de las infecciones de vías aéreas superiores.

El resto de los artículos dan una base de evidencia que avala a los principios inmunológicos por los que estas vacunas contribuyen al desarrollo de inmunidad adquirida mediante estudios analítico experimentales.

El mayor problema encontrado a lo largo de esta revisión bibliográfica es que a pesar del rigor con el que los estudios de casos controles citados se llevaron a cabo, el tamaño de las muestras suele estar en las decenas y en muchos casos los pacientes no dejaron de usar la medicación que tomaban normalmente para combatir su patología respiratoria de base (asma). También influye el hecho de que la mayoría de estudios se hicieron en pacientes pediátricos²⁰²¹ y no se encontraron estudios centrados en pacientes ancianos, un grupo de riesgo en el que abundan los pacientes pluripatológicos y en los que una infección respiratoria complicada puede resultar en una descompensación de su patología de base y terminar en una hospitalización. Adicionalmente, la mayoría de estos estudios tienen 30 o más años, condición que de por sí no invalidan los resultados, pero dado que el campo de las autovacunas está intrínsecamente ligado a su interacción con especies bacterianas y que las bacterias son organismos dinámicos que han evolucionado y cambiado a lo largo de estas décadas, invita a pensar que de repetirse estos mismos estudios en la actualidad tal vez arrojarían resultados diferentes. Por todo lo anterior, es posible que estos factores externos ejercieran un sesgo sobre los estudios.

7. Conclusiones

1. Existe mucha evidencia que avala el mecanismo de acción por el que la exposición a antígenos contribuye al desarrollo de inmunidad específica contra agresiones bacterianas.
2. Hay menos que prueben su eficacia. En esto tiene que ver el hecho de que reproducir las condiciones en las que se hicieron los estudios es difícil: las autovacunas se elaboran a partir del cultivo de la flora del paciente, y esta flora varía de unos pacientes a otros. De igual modo, la medicación que el paciente esté tomando, sus antecedentes personales y familiares y estilo de vida contribuyen a alterar los efectos que la autovacuna puede tener.
3. La forma en la que se mide la eficacia de las vacunas más utilizada en los artículos revisados consiste en el registro de datos de episodios infecciosos de vías altas antes y después del inicio del tratamiento y comparando los datos de un grupo control con los de los casos.
4. Como método para evitar las infecciones de vías aéreas superiores, las vacunas de vías aéreas superiores parecen ser poco precisas, en el sentido de que, en ciencia, la precisión de un tratamiento consiste en su capacidad de *“proporcionar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones o de dar el resultado deseado con exactitud”*. Hay pacientes y estudios en los que resultan ser muy eficaces y otros en los que no logran mejores resultados que un placebo. Si bien no hay evidencia que estas vacunas puedan resultar nocivas, no hay que obviar el hecho de que no alcanzan las cifras que logran otras vacunas bacterianas como la de la difteria, que tiene una eficacia superior al 85%²², la del *Haemophilus influenzae* tipo B, que tiene una efectividad global fue del 92.8%²³ o la del Meningococo C, que tiene una eficacia superior al 85% en adultos y niños mayores²⁴.
5. Es necesario realizar más estudios de los efectos de las vacunas bacterianas en la prevención de las infecciones de vías respiratorias altas de forma singularizada, en otras palabras, estudiando únicamente este tratamiento sin concomitancia con otro tipo de tratamiento y con un número de muestra mayor del que se ha utilizado en la mayoría de los estudios.

La conclusión final que se obtiene de esta revisión es que la evidencia existente avala que las autovacunas pueden lograr reducir la frecuencia de infecciones de vías respiratorias altas, pero es muy difícil asegurar con certeza en qué medida.

8. Qué he aprendido con el TFG

A lo largo del tiempo dedicado a la elaboración de este TFG he tenido ocasión de adquirir una mecánica de búsqueda de artículos en las bases de datos. Cosas como anotar sistemáticamente los autores, título y publicación de los artículos se han convertido en un hábito al navegar por los registros.

He tomado contacto con recursos bibliográficos que no había usado hasta ahora en la carrera y me ha servido para aprender a hilar los distintos hallazgos que muchos investigadores han encontrado por separado y construir con ellos una visión articulada de un tema, que fue el de las vacunas bacterianas.

Entender rápidamente qué se propone demostrar o refutar un autor y el tipo de estudio que elige para ello y por qué elige ese tipo de estudio también han sido algunas de las habilidades que he cogido mientras reunía evidencia para el trabajo.

9. Bibliografía

D Alecsandru, L Valor, S Sánchez-Ramón, J Gil, J Carbone, J Navarro, J J Rodríguez, C Rodríguez-Sainz, and E Fernández-Cruz, **Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4 T cells and impact on clinical outcome.** *Clin Exp Immunol.* 2011 Apr; 164(1): 100–107.

Cem Hasan Razi, MD, Koray Harmancı, MD, Ayhan Abacı, MD, Osman Özdemir, MD, Samil Hızlı, MD, Rahime Renda, MD,c and Fersin Keskin, MDd, **The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children,** 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

H. Mueller, M. Lanz "**Hiposensitization with bacterial vaccine in infectious asthma. A double blind study and a longitudinal study**". *JAMA*, 1969-208: 1379:1386

Vincent J. Fontana, Angela S. Salanitro, MD, Harvey I. Wolfe, MD and Fernando Moreno, MD "**Bacterial vaccine and infectious asthma**". *JAMA* 1965-193: 895-902

Mohamed A. Bitar,* , Rami Saade, **The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children,** *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77 (2013) 670–673

David T Wong and Pearay L. Ogra, *Immunology of tonsils and adenoids – An update,* *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2 (1980) 181-191

Goro Mogi M.D., T. Yoshida, S. Honjo, S. Maeda, **Middle Ear Effusions: Quantitative analysis of Immunoglobulins,** *Annals Otolingol.* Vol. 82, pag. 196, 1973,

Hanspeter E. Gnehm, Stephen I. Pelton, Sunita Gulati, and Peter A. Rice, **Characterization of antigens from Nontypable Haemophilus influenzae recognized by human bactericidal antibodies,** *J Clin Invest.* 1985 May; 75(5): 1645–1658.

Cecilia G. Clement¹, Scott E. Evans, Christopher M. Evans, David Hawke, Ryuji Kobayashi, Paul R. Reynolds, Seyed J. Moghaddam¹, Brenton L. Scott, Ernestina Melicoff, Roberto Adachi, Burton F. Dickey, and Michael J. Tuvim, **Stimulation of Lung Innate Immunity Protects against Lethal Pneumococcal Pneumonia in Mice,** *Am J Respir Crit Care Med* Vol 177. pp 1322–1330, 2008

L. M. Bowman and P. G. Holt*, **Selective Enhancement of Systemic Th1 Immunity in Immunologically Immature Rats with an Orally Administered Bacterial Extract, infection and immunity,** June 2001, p. 3719–3727

Linda C.L. Boele, Jeffrey J. Bajramovic, Anne-Marij M.B.C. de Vries, Ingrid A.I. Voskamp-Visser, Wendy E. Kaman, Desiree van der Kleij, **Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules** Cellular Immunology 255 (2009) 17–25

Barbara Morandia, Alessia Agazzib, Antonella D'Agostinob, Francesca Antoninib, Gregorio Costac, Federica Sabatinib, Guido Ferlazzoc, Giovanni Meliolib, **A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating, phenotype in human dendritic cells**, Immunology Letters 138 (2011) 86–91

A. W. Frankland, M.A., B.M., B.Ch. W. Howard Hughes, M.D. R. H. Gorrill, M.D., **Autogenous bacterial vaccines in treatment of asthma**. Brit. Med. J. 1965-2: 941

A.H. Eisen, H.L. Bacal . **"Immunological response to bacterial vaccine"**. Int. Archiv. Allergy. 1967-31: 14-19; 1967

Óscar Swineford, Fr., M.D., and James Holman, M.D., **Results of 3860 cutaneous tests with 34 crude polysaccharide and nucleoprotein fractions of 14 different bacteria**, J. Allergy 20, 40

Wright AE (1903): **On therapeutic inoculations of bacterial vaccines, and their practical exploitation in the treatment of disease**. Brit. Med. Journal London 1903, 1069 1074

Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Manual de Vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; 2020. [consultado el 24/04/2020]. ISSN 2386-2696

Monge S, Hahné S, de Melker H, Sanders E, van der Ende A, Knol M. Effectiveness of the DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine against invasive Haemophilus influenzae type b disease in the Netherlands (2003-2016): a case-control study. Lancet Infectious Disease published on line May 8, 2018

González Enríquez et al. Eficacia de la vacuna meningocócica de polisacárido capsular del grupo C. Rev. Esp. Salud Publica [online]. 1997, vol.71, n.2, pp.103-126. ISSN 2173-9110.

10. Referencias en el texto

¹ Wright AE (1903): On therapeutic inoculations of bacterial vaccines, and their practical exploitation in the treatment of disease. Brit. Med. Journal London 1903, 1069 1074

² D Alecsandru, L Valor, S Sánchez-Ramón, J Gil, J Carbone, J Navarro, J J Rodríguez, C Rodríguez-Sainz, and E Fernández-Cruz, Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4 T cells and impact on clinical outcome. Clin Exp Immunol. 2011 Apr; 164(1): 100–107.

-
- ³ Cem Hasan Razi, MD, Koray Harmanci, MD, Ayhan Abacı, MD, Osman O' zdemir, MD, S, amil Hizli, MD, Rahime Renda, MD,c and Fersin Keskin, MDd, **The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children**, 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
- ⁴ H. Mueller, M. Lanz "Hipo-sensitization with bacterial vaccine in infectious asthma. A double blind study and a longitudinal study". JAMA, 1969-208: 1379:1386
- ⁵ Vincent J. Fontana, Angela S. Salanitro, MD, Harvey I. Wolfe, MD and Fernando Moreno, MD "**Bacterial vaccine and infectious asthma**". JAMA 1965-193: 895-902
- ⁶ Mohamed A. Bitar,* , Rami Saade, **The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children**, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 77 (2013) 670–673
- ⁷ David T Wong and Pearay L. Ogra, Immunology of tonsils and adenoids – An update, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2 (1980) 181-191
- ⁸ Goro Mogi M.D., T. Yoshida, S. Honjo, S. Maeda, **Middle Ear Effusions: Quantitative analysis of Immunoglobulins**, Annals of Othorhinolaryngology 82
- ⁹ Hanspeter E. Gnehm, Stephen I. Pelton, Sunita Gulati, and Peter A. Rice, **Characterization of antigens from Nontypable Haemophilus influenzae recognized by human bactericidal antibodies**, J Clin Invest. 1985 May; 75(5): 1645–1658.
- ¹⁰ Cecilia G. Clement¹, Scott E. Evans, Christopher M. Evans, David Hawke, Ryuji Kobayashi, Paul R. Reynolds, Seyed J. Moghaddam¹, Brenton L. Scott, Ernestina Melicoff, Roberto Adachi, Burton F. Dickey, and Michael J. Tuvim, **Stimulation of Lung Innate Immunity Protects against Lethal Pneumococcal Pneumonia in Mice**, Am J Respir Crit Care Med Vol 177. pp 1322–1330, 2008
- ¹¹ L. M. Bowman and P. G. Holt*, Selective Enhancement of Systemic Th1 Immunity in Immunologically Immature Rats with an Orally Administered Bacterial Extract, infection and immunity, June 2001, p. 3719–3727
- ¹² Linda C.L. Boele, Jeffrey J. Bajramovic, Anne-Marij M.B.C. de Vries, Ingrid A.I. Voskamp-Visser, Wendy E. Kaman, Desiree van der Kleij, **Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules** Cellular Immunology 255 (2009) 17–25
- ¹³ Barbara Morandia, Alessia Agazzib, Antonella D'Agostinob, Francesca Antoninib, Gregorio Costac, Federica Sabatinib, Guido Ferlazzoc, Giovanni Meliolib, **A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating, phenotype in human dendritic cells**, Immunology Letters 138 (2011) 86–91

-
- ¹⁴ A. W. Frankland, M.A., B.M., B.Ch. W. Howard Hughes, M.D. R. H. Gorrill, M.D., **Autogenous bacterial vaccines in treatment of asthma**. Brit. Med. J. 1965-2: 941
- ¹⁵ A.H. Eisen, H.L. Bacal . "**Immunological response to bacterial vaccine**". Int. Archiv. Allergy. 1967-31: 14-19; 1967
- ¹⁶ A. W. Frankland, M.A., B.M., B.Ch. W. Howard Hughes, M.D. R. H. Gorrill, M.D., **Autogenous bacterial vaccines in treatment of asthma**. Brit. Med. J. 1965-2: 941
- ¹⁷ A. W. Frankland, M.A., B.M., B.Ch. W. Howard Hughes, M.D. R. H. Gorrill, M.D., **Autogenous bacterial vaccines in treatment of asthma**. Brit. Med. J. 1965-2: 941
- ¹⁸ D Alecsandru, L Valor, S Sánchez-Ramón, J Gil, J Carbone, J Navarro, J J Rodríguez, C Rodríguez-Sainz, and E Fernández-Cruz, Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4 T cells and impact on clinical outcome. Clin Exp Immunol. 2011 Apr; 164(1): 100–107.
- ¹⁹ Cem Hasan Razi, MD, Koray Harmancı, MD, Ayhan Abacı, MD, Osman O" zdemir, MD, S, amil Hızlı, MD, Rahime Renda, MD,c and Fersin Keskin, MDd, **The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children**, 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
- ²⁰ H. Mueller, M. Lanz "Hipo-sensitization with bacterial vaccine in infectious asthma. A double blind study and a longitudinal study". JAMA, 1969-208: 1379:1386
- ²¹ Vincent J. Fontana, Angela S. Salanitro, MD, Harvey I. Wolfe, MD and Fernando Moreno, MD "**Bacterial vaccine and infectious asthma**". JAMA 1965-193: 895-902
- ²² Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Manual de Vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; 2020. [consultado el 24/04/2020]. ISSN 2386-2696
- ²³ Monge S, Hahné S, de Melker H, Sanders E, van der Ende A, Knol M. Effectiveness of the DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine against invasive Haemophilus influenzae type b disease in the Netherlands (2003-2016): a case-control study. Lancet Infectious Disease published on line May 8, 2018
- ²⁴ González Enríquez et al. Eficacia de la vacuna meningocócica de polisacárido capsular del grupo C. Rev. Esp. Salud Publica [online]. 1997, vol.71, n.2, pp.103-126. ISSN 2173-9110.