

VACUNAS ANTI NEUMOCÓCICAS

Olga Castillo de Febres (1), Tibusay Triana (2) Juan Carrizo (3)

RESUMEN

Existen vacunas contra el *Streptococcus pneumoniae*. Una de polisacáridos capsulares con 23 antígenos y las vacunas conjugadas, denominadas así, porque los polisacáridos están conjugados a una mutante no tóxica de la toxina diftérica o a la proteína D del *Haemophilus influenzae* no tipificable, a una proteína transportadora del toxoide tetánico y otra de toxoide diftérico. La vacuna de 23 antígenos se recomienda en niños con edad igual y mayor de 24 meses, con alto riesgo para enfermedad neumocócica invasiva y complicaciones, debidas a enfermedades subyacentes y se administra en esquema mixto con vacunas anti neumocócica conjugadas. En 2002, la Organización Mundial de la Salud determinó que la vacuna anti neumocócica heptavalente (Prevenar® 7) es el estándar de oro, con la cual debían ser comparada toda nueva vacuna conjugada, por lo que definieron, necesarios para su aprobación, dos criterios de no inferioridad. Primer criterio: Una vez administrada la vacuna se registren títulos de anticuerpos medidos por ELISA iguales o mayores de 0,35 µg/mL para los serotipos comunes a ambas vacunas y los adicionales. Segundo criterio: Los anticuerpos deben tener capacidad funcional, lo cual se establece mediante la cuantificación de la actividad opsonofagocítica que debe ser igual o mayor de 1:8. Las vacunas conjugadas 10valente (Synflorix®) y 13 valente (Prevenar® 13) cumplen ambos criterios. De no ser posible completar el esquema o administrar refuerzo, con el mismo tipo de vacuna conjugada inicial, puede hacerse con cualquier otra vacuna.

Palabras clave: vacunas anti neumocócica, nuevas vacunas, criterios de no inferioridad

SUMMARY

Several vaccines against *Streptococcus pneumoniae* are available. One made of capsular polysaccharides with 23 antigens and the conjugated vaccines, thus denominated, because the polysaccharides are conjugated to a nontoxic mutant of the diphtheric toxin or to the D protein of the nontypifiable *Haemophilus influenzae*, to a transporting protein of tetanic and diphtheric toxoids. The 23 antigens vaccine is recommended for children 24 months of age and older, with high risk for invasive pneumococcal disease and complications due to underlying diseases. It is administered in a mixed scheme with anti pneumococcal conjugated vaccines. In 2002, the World Health Organization (WHO) determined that the heptavalent vaccine (Prevenar® 7) is the gold standard, with which all new conjugated vaccine should be compared. For this reason, they defined two non inferiority criteria as necessary for the approval. First criterion: Once administered the vaccine and measured the amount of antibodies by ELISA, these must be equal or above 0.35 µg/mL for the common serotypes to both vaccines and to the additional serotypes. Second criterion: The antibodies must have functional capacity, which is determined by the opsonophagocitic activity that must be equal or greater than 1:8. The 10 valent (Synflorix®) and the 13 valent (Prevenar® 13) conjugated vaccines fulfill both criteria. If it is not possible to complete the vaccine scheme or to administer a booster dose, with the same type of conjugated vaccine, this may be done with any other vaccine.

Key words: anti pneumococcal vaccines, new vaccines, non-inferiority criteria

VACUNA CONJUGADA HEPTAVALENTE

La vacuna conjugada heptavalente (PCV-7 -siglas en inglés-), contiene polisacáridos capsulares de 7 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F) todos conjugados a una mutante no tóxica de la toxina diftérica (CRM197). Su eficacia en los niños con esquema completo de 4 dosis es de 97,4% para Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI), también demuestra efectividad en la disminución de la incidencia de Otitis Media Aguda (OMA) y neumonía en todas las edades, con reducción de la tasa de hospitalización global por neumonía en 39% en menores de 2 años de edad y 65% de disminución en hospitalización por neumonía neumocócica (1-4).

Ha tenido un gran impacto sobre la incidencia de la ENI en Estados Unidos, porque protege no sólo a los niños vacunados sino también a los no inmunizados y a los adultos, a

través de la inmunidad de rebaño por la reducción de la transmisión del neumococo desde los niños inmunizados (2,3).

La vacuna produce disminución de la circulación de los serotipos contenidos en ella, pero se ha observado la emergencia de serotipos no vacunales, aun cuando el incremento en la incidencia de estos serotipos ha sido menor en relación a la reducción de la enfermedad producida por los serotipos vacunales (5).

En 2007, la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideró la ENI como un problema mayor de salud pública, por lo cual planteó la introducción de la vacuna neumocócica en los programas nacionales de inmunización, con alta prioridad en los países en desarrollo (6).

NUEVAS VACUNAS CONJUGADAS

Antes de su descripción se mencionarán algunos criterios importantes.

Correlato de inmunidad: nivel de anticuerpos capaz de inducir y predecir protección contra la enfermedad. En 2002, la OMS determinó que la PCV7 es el estándar de oro, con la cual debían ser comparadas las nuevas vacunas, por lo que definieron los siguientes criterios de no inferioridad, neces-

- (1) Pediatra- Infectóloga, Profesora titular UC, Presidenta del Comité de Vacunas de la SVPP
- (2) Infectólogo Pediatra Jefe Departamento de Pediatría Universidad de Oriente. Universitario Dr. Luis Razzeti, Barcelona, Edo. Anzoátegui
- (3) Pediatra, Neonatólogo. Profesor Titular de la Hospital Universitario de Maracaibo, Edo. Zulia

rios para su aprobación.

Criterios de no inferioridad:

- a.- Medición de la concentración de anticuerpos 4 semanas después del esquema primario y alcanzar un título de anticuerpos medidos por ELISA $\geq 0,35 \mu\text{g/mL}$ para los serotipos comunes a ambas vacunas y, para los adicionales, la respuesta inmune debe ser comparable a la de los serotipos incluidos en PCV7. En relación a este criterio algunos estudios de la vacuna 10 valente utilizaron un kit de ELISA que contempla una etapa previa que absorbe los anticuerpos para el serotipo 22F, esto produce un punto de corte menor con un valor de $0,2 \mu\text{g/mL}$, el cual es equivalente al $0,35 \mu\text{g/mL}$, determinado por el ELISA de referencia original no 22F, valor aprobado por la OMS (7-10).
- b.- Determinar y comparar el porcentaje de seroconversión a cada serotipo incluyendo los nuevos con el porcentaje alcanzado con la PCV7, los cuales deben ser similares.
- c.- Los anticuerpos obtenidos deben tener capacidad funcional, por lo que se debe medir y comparar el porcentaje de niños que alcanzaron una actividad opsonofagocítica (OPA -siglas en inglés-) de $\geq 1:8$ con los observados en la PCV7, los cuales deben ser similares.
- d.- Inducción de memoria inmune.

VACUNAS DISPONIBLES

Vacuna 10 valente o PCV 10 (PHID-CV -siglas en inglés-): su nombre comercial es Synflorix®, contiene $1 \mu\text{g}$ de polisacáridos capsulares para 7 de los 10 serotipos de Streptococcus pneumoniae, excepto 4, 18C y 19F que contienen $3 \mu\text{g}$. Los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (incluidos en la vacuna neumocócica conjugada heptavalente) están conjugados a $13 \mu\text{g}$ de la proteína D del Haemophilus influenzae no tipificable (NTHi -siglas en inglés-), a excepción del 18C que está conjugado a $8 \mu\text{g}$ de una proteína transportadora del toxoide tetánico y el 19F conjugado a $5 \mu\text{g}$ del toxoide diftérico; como adyuvante utiliza $0,5 \text{ mg}$ de fosfato de aluminio (10,11).

- *Inmunogenicidad:*

Estudios de inmunogenicidad han demostrado que posterior a la tercera dosis de PCV10, al menos un 95,4% de los vacunados alcanzaron una concentración de anticuerpos por ELISA $\geq 0,20 \mu\text{g/mL}$, excepto el 6B que fue 65,9% y, el 23F, 81,4%. En el análisis de la funcionalidad de los anticuerpos medidos por el porcentaje de sujetos con títulos de OPA ≥ 8 demostraron no inferioridad para los 7 serotipos comunes de ambas vacunas, incluyendo el 6B y el 23F. Luego de la dosis de refuerzo se observa un incremento en las cifras de anticuerpos medidos por ELISA y en los títulos de OPA, lo cual confirma que cumple con todos los criterios de no inferioridad (11).

La eficacia en prevención de OMA en niños con esquema vacunal completo es del 52,6% para los serotipos incluidos en la vacuna. Adicionalmente, hay un 35,3% de prevención

para OMA producidas por Haemophilus influenzae no tipificable. (12).

Indicación: prevención de ENI y OMA causada por los 10 serotipos de Streptococcus pneumoniae incluidos en la vacuna (13).

Vacuna conjugada 13 valente: su nombre comercial es Prevenar® 13, contiene polisacáridos capsulares de 13 serotipos de Streptococcus pneumoniae (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F -incluidos en la PCV7- más los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) todos conjugados a una mutante no tóxica de la toxina diftérica (CRM197). Cada dosis de $0,5 \text{ ml}$ contiene aproximadamente $2,2 \mu\text{g}$ de polisacáridos de cada serotipo, excepto el serotipo 6B que contiene $4,4 \mu\text{g}$ de polisacárido. La concentración total de CRM197 es aproximadamente $34 \mu\text{g}$, contiene además 0,02% de poliribosilfosfato 80 (P80) como adyuvante, $0,125 \text{ mg}$ de fosfato de aluminio (ALPO4), succinato como buffer y preservante no timerosal (14,15).

- *Inmunogenicidad:*

La PCV13 ha demostrado que induce niveles de anticuerpos comparables a los de PCV7 tanto para los serotipos comunes a ambas vacunas como para los nuevos; el porcentaje de niños con títulos de OPA igual o superior a 1:8 ha sido similar a los inducidos por PCV7. No hay datos disponibles sobre inmunogenicidad para grupos de niños específicos con riesgo incrementado para enfermedad neumocócica (15).

La PCV13 cumple con los criterios de no inferioridad.

SEGURIDAD DE LAS VACUNAS DISPONIBLES

PCV10 y PCV13 producen los siguientes efectos (16,17):

- Locales: dolor, edema y eritema con una frecuencia que varía entre 35 a 49%.
- Sistémicos: fiebre generalmente baja, solo en 5% de los casos puede ser igual o mayor a 39°C , disminución del apetito, aumento o disminución del sueño. Los perfiles de seguridad de PCV10 y PCV13 son comparables al de la PCV7.

Esquema de Vacunación sugerido para las vacunas anti-neumocóccicas Conjugadas

Cuadro 1. Esquema recomendado para Lactantes y Niños Sanos

Edad a la primera dosis (meses)	Serie primaria (con intervalos de 8 semanas)	Dosis refuerzo*
2 a 6	3 dosis	1 dosis de 12 a 15 meses de edad
7 a 11	2 dosis	1 dosis de 12 a 15 meses de edad
12 a 23	2 dosis	-----
24 a 59	1 dosis	-----

Fuente: CDC. MMWR December 201059(RR11):1-18

*Administrar la dosis de refuerzo al menos 8 semanas después de la dosis previa (15).

Recomendaciones del comité asesor sobre prácticas de inmunización (ACIP- siglas en ingles-). Diciembre 2010

- 1.- Administración rutinaria a partir de los 2 meses de edad.
- 2.- Todo niño de 24 a 59 meses no vacunado previamente o con esquema incompleto de PCV7 debe recibir una dosis de PCV13.
- 3.- Administrar dosis única adicional de PCV13 a niños de 24 a 59 meses previamente inmunizados con un esquema completo de PCV7 (15).

Intercambialidad entre vacunas conjugadas neumocólicas. Recomendación de OPS para Países de Latinoamérica y el Caribe 2001 (18).

- La intercambiabilidad de las vacunas conjugadas solo cuenta con evidencias indirectas.
- Es recomendable completar los esquemas con el mismo tipo de vacuna o con vacunas conjugadas al mismo portador proteico.
- Cuando no es posible completar el esquema con el mismo tipo de vacuna, se podría utilizar cualquier otra vacuna, estas posibilidades son:
 - * Cuando se inicia un esquema con PCV7, se puede completar la serie primaria con la vacuna disponible.
 - * Si se concluyó el esquema primario con la PCV7, puede recibir un refuerzo con la PCV10 o la PCV13.

Contraindicaciones para las vacunas conjugadas anti neumocólicas

Reacción alérgica severa a cualquier componente de las vacunas conjugadas o a cualquier vacuna contentiva de toxoide tetánico y diftérico (15,17).

VACUNA anti NEUMOCÓLICA NO CONJUGADA

Vacuna polisacárida 23 valente

La vacuna polisacárida 23 valente (PPSV23 -siglas en inglés-) cuenta con dos presentaciones comerciales (Pneumo23® y Pneumovax®) y contiene 23 antígenos polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

Una dosis de 0,5 ml contiene 25 µg de cada polisacárido en solución salina isotónica con fenol como preservativo (15).

La eficacia es de un promedio de 57% en mayores de 6 años de edad

En la actualidad se recomienda en niños ≥2 años de edad con alto riesgo para ENI y complicaciones debidas a condiciones médicas subyacentes y se administra en esquema mixto con vacunas neumocólicas conjugadas (19,20). La PPSV23 no se recomienda como vacuna única en estos niños por no ser inmunogénica. (21,22).

Estudios recientes reportan concentraciones menores de anticuerpos (hiporespuesta) con dosis sucesivas de PPSV23

o con administración posterior de PCV7, pero se desconoce su importancia clínica (23-25).

NIÑOS CON ALTO RIESGO DE ENFERMEDAD NEUMOCÓLICA O SUS COMPLICACIONES QUE DEBEN RECIBIR ESQUEMA MIXTO DE INMUNIZACIÓN

- 1.- Inmunocompetentes con:
 - a) Enfermedad cardíaca crónica (particularmente enfermedad cardíaca congénita cianótica y falla cardíaca)
 - b) Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y/o asma bronquial
 - c) Diabetes mellitus
 - d) Fístula fluido cerebroespinal e implante coclear
 - e) Asplenia anatómica o funcional
 - f) Enfermedad de células falciformes y otras hemoglobinopatías
 - g) Insuficiencia renal crónica
- 2.- Inmunosuprimidos: inmunodeficiencias congénitas o adquiridas como VIH, tratamiento con drogas inmunosupresoras o radioterapia, que incluye neoplasia, leucemias, linfomas, Enfermedad de Hodgkin o trasplante de órgano sólido (15).

Esquema mixto de Inmunización para pacientes de alto riesgo

Cuadro 2. Esquema mixto de inmunización para pacientes de alto riesgo

	PCV13	PPSV23	REFUERZO
24 a 71 meses de edad			
No vacunados o con esquema incompleto menos de 3 dosis antes de los 2 años	2 dosis con intervalo de 8 semanas	1 dosis mínimo a las 8 semanas de haber colocado la PCV13 en todos los casos	1 refuerzo 5 años post primera dosis de PPSV23***
3 dosis de PCV*	1		
Esquema completo de PCV	1		
6 a 18 años de edad		1 si nunca recibieron PCV13	

Fuente: CDC. MMWR December 201059(RR11):1-18
 (*) Puede ser con PCV7 o PCV13

- a.- Si recibieron PPSV23 antes de la PCV13 también deben recibir esta última vacuna.
- b.- En esplenectomía electiva, terapia inmunosupresora o implante coclear, el esquema de vacunación con PCV13 y/o PPSV23 puede ser completado al menos 2 semanas antes de la cirugía o inicio de la terapia
- c.- PPSV23 no debe administrarse antes de los dos años

de edad.

”” Indicar solo a niños con, asplenia anatómica o funcional e inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.

La SVPP (26) recomienda completar el esquema con cualquier vacuna conjugada disponible: PCV 10 o PCV13 (18)

Recomendaciones para PPSV23 en Adultos (27)

- 1.- Mayores de 65 años
- 2.- Personas de 19 a 64 años con:
 - a) Enfermedad cardíaca crónica excluyendo hipertensión arterial
 - b) Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), incluyendo asma
 - c) Diabetes mellitus
 - d) Enfermedad hepática crónica y/o cirrosis
 - e) Alcoholismo
 - f) Tabaquismo
 - g) Implante coclear
 - h) Asplenia funcional o anatómica
- 3.- Personas de 19 a 64 años inmunocomprometidas con: VIH, leucemia, Enfermedad de Hodgkin, trasplantes de órganos sólidos, tratamientos con drogas inmunosupresoras que incluye esteroides a largo plazo e insuficiencia renal crónica.

REFERENCIAS

- 1.- Pneumococcal Infections. En: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, Memillan JA. Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases. 27 ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics;2006:525-537.
- 2.- Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(3):187-195.
- 3.- Madhi SA, Whitney CG, Nohynek H. Lessons learned from clinical trials evaluating pneumococcal conjugate vaccine efficacy against pneumonia and invasive disease. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 2:B9-B15.
- 4.- Austrian R. Maxwell Finland Lecture. Random gleanings from a life with the pneumococcus. *J Infect Dis.* 1975;131(4):474-484.
- 5.- Espinosa-de los Monteros LE, Aguilar-Ituarte F, Jiménez-Juárez RN, Rodríguez-Suárez RS, Gómez-Barreto D. Reemplazo de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños con vacuna conjugada antineumocócica 7V en México. *Salud Pública Méx.* 2010;52(1):4-13
- 6.- World Health Organization. Weekly epidemiological record. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood Immunization-WHO position paper. 2007;82(12):93-104. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.who.int/wer/2007/wer8212.pdf> Consultado: 30/7/2011
- 7.- Jodar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt D, Kayhty H, et al. Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine.* 2003;21(23):3265-3272.
- 8.- WHO Expert Committee on Biological Standardization Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants WHO Technical reports Series Geneva 2005.
- 9.- Dagan R, Frasch C. Clinical characteristics of a novel 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine candidate (PHiD-cv). Introduction. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(4 Suppl):S63-65.
- 10.- Zamorano J. Nuevas vacunas antineumocócicas disponibles, 2009. Medwave. [en línea] 2010 [fecha de acceso: 30/7/2011]. URL Disponible en: <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/4448>
- 11.- Vesikari T, Wysocki J, Chevallier B, Karvonen A, Czajka H, Arsene JP, et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(4 Suppl):S66-76.
- 12.- Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet.* 2006;367(9512):740-748.
- 13.- Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Oficio PB-R-51/2009 Disponible en: <http://www.inhrr.gob.ve>. Consultado: 02/04/2010.
- 14.- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Licensure of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and recommendations for use among children-Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59(12):258-261.
- 15.- Nuorti JP, Whitney CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine-recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-11):1-18.
- 16.- Chevallier B, Vesikari T, Brzostek J, Knuf M, Bernal N, Aristegui J, et al. Safety and reactogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with routine childhood vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(4 Suppl):S109-118.
- 17.- Food and Drug Administration. Prevnar 13. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm201667.htm> Consultado: 30/7/2011
- 18.- Informe Final de la XVIII Reunión del Grupo técnico asesor sobre Enfermedades Prevenibles por vacunación. 2011. Disponible en: www.paho.org/spanish/ad/fch/im/epi_tag.htm. Consultado: 02/9/2011
- 19.- Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 1997;46(RR-8):1-24.
- 20.- Advisory Committee of Immunization Practices. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2000;49(RR-9):1-35.
- 21.- Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines. En: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines.* 5 ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company. 2008:531-68.
- 22.- O'Brien KL, Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am J Epidemiol.* 2004;159(7):634-644.

- 23.- O'Brien KL, Hochman M, Goldblatt D. Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect Dis.* 2007;7(9):597-606.
- 24.- de Roux A, Schmole-Thoma B, Siber GR, Hackell JG, Kuhnke A, Ahlers N, et al. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clin Infect Dis.* 2008;46(7):1015-1023.
- 25.- Torling J, Hedlund J, Konradsen HB, Ortqvist A. Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. *Vaccine.* 2003;22(1):96-103.
- 26.- Castillo O, Carrizo JT, Izaguirre J, Betancourt A, Narváez R. Esquema de inmunizaciones para niños y niñas en Venezuela. Recomendaciones para 2011. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/56866610/inmunizaciones-recomendaciones-2011> Consultado: 30/7/11
- 27.- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59(34):1102-1106.