

# Peritonitis Bacteriana Espontánea

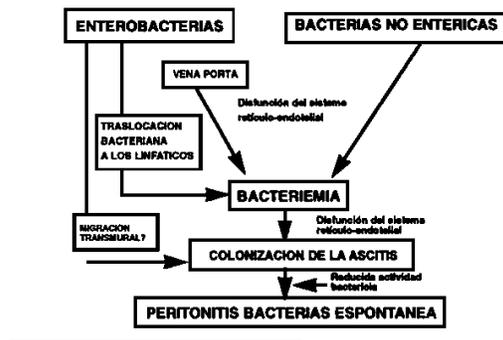
Dra. Isabel Cirera  
Dr. Miquel Navasa

Servicio de Hepatología  
Hospital Clinic de Barcelona

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es la infección de líquido ascítico que se produce en ausencias de focos infecciosos intraabdominales. Se considera que los gérmenes que colonizan la ascitis lo hacen a través de la circulación sistémica, es decir por vía hematógena. Esta infección es característica de los pacientes cirróticos con ascitis, siendo excepcional en pacientes con ascitis de otras etiologías como la secundaria a insuficiencia cardíaca, síndrome nefrótico, lupus eritematoso sistémico, etc.

Los gérmenes más frecuentes responsables de la PBE en la cirrosis hepática se indican en la Tabla 1. Puede observarse que aproximadamente el 75% de estos tienen un origen presumiblemente intestinal. El paciente cirrótico presenta diferentes alteraciones en la inmunidad que podrían justificar el paso de gérmenes que forman parte de la flora fecal habitual a la circulación sistémica. Posteriormente se produciría la colonización de la ascitis en el caso de existir una disminución de la capacidad defensiva del líquido ascítico (Figura 1) (1,2).

Figura 1. Patogenia de la peritonitis bacteriana espontánea.



Correspondencia y Separatas  
Drs. Isabel Cirera, Miquel Navasa  
Servicio de Hepatología

Hospital Clinic de Barcelona

© Los derechos de autor de los artículos de la Revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer SOLCA, Sede Nacional, Guayaquil - Ecuador

## I. Patología de la PBE.

### 1.1. Paso de gérmenes a través de la barrera intestinal.

Se ha demostrado que en los pacientes cirróticos existe sobrecrecimiento bacteriano a nivel de intestino delgado y que éste puede favorecer el paso de bacterias a través de la barrera mucosa intestinal. Por otra parte, la hipertensión portal podría ocasionar edema de la mucosa intestinal y soluciones de continuidad en el epitelio que favorecerían

el paso de gérmenes. Esta hipótesis se basa exclusivamente en modelos de hipertensión portal que tal vez no sean estrictamente aplicables a la fisiopatología humana. Parece evidente que características inherentes a los propios gérmenes como pueden ser la capacidad invasiva, la capacidad de adhesión a la pared intestinal, etc., también pueden jugar un papel determinante en el paso de los gérmenes desde la luz intestinal a la circulación sanguínea intestinal.

### 1.2 Paso de gérmenes de la circulación sanguínea o linfática intestinal a la circulación general.

Una vez los gérmenes de origen entérico han atravesado la barrera intestinal pueden seguir dos caminos que probablemente no sean mutuamente exclusivos. Uno de ellos es la circulación sanguínea intestinal, es decir el territorio portal. Si un germen alcanza esta vía, su progresión hacia la circulación general podría ser relativamente fácil en un paciente cirrótico con hipertensión portal. Por una parte el germen puede escapar al filtro hepático a través de las múltiples colaterales portosistémicas que tienen estos pacientes, por otra parte, si el germen alcanza el hígado vía portal se encuentra ante un sistema Retículo Endotelial (constituido por las células de Kupffer) con una actividad fagocítica muy disminuida (3) o ante múltiples comunicaciones intrahepáticas que hacen que la bacteria pueda fácilmente escapar hacia la circulación general (1).

El otro camino propuesto es la circulación linfática.

Las bacterias entéricas alcanzarían los ganglios linfáticos



mesentéricos y a través del conducto torácico llegarían a la circulación general sin pasar por el filtro hepático. Existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que esta vía linfática puede tener relevancia en la patogenia de la PBE aunque su papel real en la cirrosis humana no ha sido evaluado.

### 1.3 Paso de gérmenes de la circulación general a la ascitis.

En la cirrosis hepática se dan diferentes alteraciones inmunitarias que pueden afectar la depuración de los gérmenes que alcanzan la circulación general. De estas alteraciones se podrían beneficiar tanto aquellos de origen entérico como aquellos provenientes de focos extraintestinales como las vías respiratorias, la piel o las vías urinarias. Entre estas alteraciones cabe destacar la difusión del sistema retículoendotelial, la disminución de la capacidad opsonizante del plasma, o las alteraciones propias de los polimorfonucleares.

### 1.4 Colonización de la ascitis.

Para que se produzca la colonización del líquido ascítico es probable que se precise una serie de condiciones que faciliten el crecimiento bacteriano. Existe un umbral de concentración de proteínas en el líquido ascítico, muy útil desde el punto de vista clínico, que permite detectar con facilidad aquellos con ascitis y alto riesgo de desarrollar una PBE. La mayoría de las PBE se producen en pacientes con concentración de proteínas en el líquido ascítico inferior a 10 g/L, siendo muy infrecuentes en pacientes con una concentración de proteínas superior a 10 g/L (4-6). Es probable que este parámetro traduzca una disminución en la capacidad defensiva de líquido ascítico. De hecho, estos pacientes con concentración de proteínas en líquido ascítico inferior a 10 g/L, tienen un líquido ascítico con una menor concentración de complemento, una menor capacidad opsonizante y en general, una peor función hepatocelular. En definitiva, la capacidad bacteriana del líquido ascítico tiene un papel importante en el desarrollo de la PBE, siendo la concentración de proteínas en el líquido ascítico el indicador más sencillo y práctico de la capacidad defensiva frente a las bacterias.

## 2. Clínica y diagnóstico.

El cuadro clínico de la PBE es muy variable oscilando desde el típico cuadro de peritonitis con fiebre, escalofríos, dolor abdominal difuso y disminución de los ruidos intestinales, hasta PBE totalmente asintomáticas. El diagnóstico de PBE requiere de un elevado índice de

sospecha y como el examen del líquido ascítico es la única forma de confirmar o descartar el diagnóstico, es obligado realizar una paracentesis exploradora en cualquier paciente cirrótico que presente algún síntoma compatible (dolor abdominal, fiebre, leucocitos) o un empeoramiento progresivo de la función hepática y/o renal manifestado por encefalopatía, ictericia o desarrollo de un síndrome hepatorenal sin causa precipitante aparente. Además, es importante recordar que aproximadamente el 10% de pacientes cirróticos con PBE están asintomáticos en el momento del diagnóstico de la infección (1,2).

El hallazgo de laboratorio más importante en pacientes con PBE es el incremento del recuento de leucocitos en el líquido ascítico, exclusivamente a expensas de un marcado aumento en el número de polimorfonucleares. Actualmente se considera que el recuento mínimo polimorfonucleares que discrimina entre una ascitis no complicada y una PBE, y que permite establecer el diagnóstico e iniciar el tratamiento antibiótico, es de 250 polimorfonucleares por mL, dado que un recuento superior a esta cifra tienen una excelente sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica (1,2).

La positividad del cultivo del líquido ascítico no es una condición indispensable para el diagnóstico de PBE. Además de ser un método que requiere tiempo para su positivización en el 30% de los pacientes que desarrollan un cuadro clínico y biológico sugestivo de PBE el cultivo del líquido ascítico es negativo (ascitis neutrocítica) (7), a pesar de haber conseguido optimizar el rendimiento de los cultivos utilizando frascos de hemocultivo inoculados, inmediatamente tras la extracción, con 10 cc de líquido ascítico. La concentración de bacterias en la ascitis de paciente con PBE es generalmente muy baja (< 1 microorganismo/mL), ello implica la escasa utilidad de la tinción de Gram en el diagnóstico de PBE y la elevada frecuencia de cultivos negativos. Finalmente, otra situación clínica que se observa alrededor del 5% de pacientes cirróticos con ascitis hospitalizados a los que se practican cultivos de rutina, es el hallazgo de un cultivo positivo en ausencia de criterios clínicos y biológicos de PBE. Esta entidad denominada bacteriascitis asintomática podría corresponder a la fase de colonización de la ascitis. Algunos pacientes acaban desarrollando una auténtica PBE, mientras que en otros se asiste a la negativización espontánea de los cultivos (8). La actitud más razonable ante una bacteriascitis asintomática es la repetición del cultivo del líquido ascítico y administrar antibióticos únicamente en caso de desarrollo de signos de peritonitis o de reiterada posibilidad de los cultivos para un mismo germen.

Otros hallazgos de laboratorios como la disminución de pH de la ascitis (<7,35), el gradiente pH ascitis / arterial (>20 mg/dL), el aumento de la concentración (>25



mg/dL) y el gradiente lactato ascitis / arterial (>0,1), son en la actualidad de utilidad clínica limitada por su baja sensibilidad diagnóstica.

La principal entidad con la que se ha de establecer diagnóstico diferencial es con la peritonitis bacteriana secundaria a un proceso intraabdominal. A menudo, ni los síntomas ni la exploración física son de utilidad en el diagnóstico diferencial. Una peritonitis secundaria puede sospecharse cuando la ascitis presenta un recuento de leucocitos superior a 10000 / mL, concentración de proteínas superior a 20 g/L, glucosa inferior a 50 mg/dL, lactato deshidrogenasa superior al límite de la normalidad en suero, así como un cultivo polimicrobiano, con anaerobios u hongos. Además, debe considerarse la posibilidad de encontrarnos ante una peritonitis secundaria si el cultivo del líquido ascítico positivo o si el recuento de polimorfonucleares de la ascitis no disminuye o incluso aumenta una vez iniciado el tratamiento antibiótico (9).

### 3. Pronóstico.

En los últimos quince años el pronóstico de la PBE ha mejorado considerablemente. Ello ha sido debido a un mejor reconocimiento de los síntomas y signos asociados a esta infección lo que permite el diagnóstico más temprano de la misma, la práctica rutinaria de paracentesis diagnósticas en todo paciente cirrótico que ingresa en el hospital con ascitis y, especialmente, la utilización de terapéuticas antibióticas más eficaces y no nefrotóxicas. De tasas de curación de la PBE entre el 25 y el 50%, y de supervivencia de los pacientes al final de la hospitalización entre 0 y el 20% publicadas en estudios anteriores a 1980, se ha pasado en las series más recientes a tasas superiores al 75 y al 60% respectivamente. Sin embargo, es importante destacar que hasta un 20-30% de los pacientes todavía fallecen a pesar de haberse conseguido la resolución de la infección.

Un estudio reciente que incluía 252 consecutivos de PBE, ha demostrado que el desarrollo de insuficiencia renal tras el diagnóstico de la infección es el factor predictivo de mortalidad más importante en aquellos casos que respondieron al tratamiento con cefotaxima (10). Otros factores pronósticos de mala evolución observados en diferentes estudios son el carácter nosocomial de la infección, la existencia de una insuficiencia hepática avanzada y la existencia de complicaciones relacionadas con la peritonitis como shock o íleo paralítico (10,11). Además, recientemente se ha descrito que aquellos pacientes que presentan una marcada respuesta inflamatoria a la infección del líquido ascítico, estimada por niveles más elevados de TNF-a e IL-6 en sangre y líquido ascítico, presentan una mayor incidencia de insuficiencia renal durante el episodio

infeccioso y una mayor mortalidad hospitalaria que aquellos pacientes con niveles inferiores de estas citoquinas (12).

Un factor importante a tener en el pronóstico a largo plazo de los pacientes que superan un episodio de PBE, es que la probabilidad de supervivencia en estos pacientes es muy baja, estimándose aproximadamente del 30% al año e inferior al 20% a los tres años (13).

### 4. Tratamiento.

Dada la gravedad de este tipo de infección, el tratamiento antibiótico debe iniciarse tan pronto se haya realizado el diagnóstico clínico y biológico de la infección, sin esperar la confirmación microbiológica. Se tratan también los episodios sintomáticos de bacterioascitis, y los que presenten dos cultivos positivos sucesivos del líquido ascítico. Es prudente mantener el tratamiento antibiótico hasta un mínimo de 24 a 48 horas después de la desaparición de los signos clínicos de infección (desaparición de la fiebre, dolor abdominal y signos de irritación peritoneal) y la normalización de la cifra de polimorfonucleares del líquido ascítico.

Atendiendo a la amplia variedad de gérmenes que pueden ser responsables de una PBE (Tabla 1) es necesario utilizar un antibiótico que cubra un amplio espectro de gérmenes Gram-positivos y Gram-negativos.

Tabla 1

*Microrganismos aislados en 123 episodios de peritonitis bacteriana espontánea (PBE). (16).*

PBE con cultivo positivo	82 (67%)
Bacilos Gram-negativos	61
E. coli	45
Klebsiella spp.	7
Otros	9
Cocos Gram-positivos	21
S. pneumoniae	12
Otros estreptococos	8
S. aureus	1
PBE con cultivo negativo	41(33%)



#### 4.1 Tratamiento con cefotaxima.

Hasta hace unos años, la combinación de aminoglucósidos (gentamicina o tobramicina) con ampicilina o cefalosporinas de 1ª o 2ª generación constituían la base de los diferentes regímenes terapéuticos caracterizados fundamentalmente por una baja eficacia y un elevado riesgo de nefrotoxicidad (14).

En 1985 el estudio de Felisart y col (15), donde se comparaba la eficacia y seguridad de la combinación ampicilina más tobramicina usada hasta entonces frente a cefotaxima, demostró la superioridad de cefotaxima en términos de mayor tasa de resolución de la infección, menor incidencia de complicaciones (nefrotoxicidad y sobreinfección) y mayor supervivencia. Desde entonces, la cefotaxima ha sido considerada como el tratamiento empírico de primera elección de las infecciones graves en pacientes cirróticos.

#### 4.2 Tratamiento con otros antibióticos parenterales.

Otras cefalosporinas como ceftreixona, cefonicid y ceftizoxima, tienen una eficacia terapéutica similar a la cefotaxima. El aztreonam no es adecuado para el tratamiento empírico de la PBE dado que sólo cubre el 75% de los gérmenes habitualmente responsables de la PBE, lo cual explicaría su baja eficacia terapéutica. Finalmente, la combinación amoxicilina-clavulánico puede ser eficaz en cuanto a la resolución de la infección. Sin embargo, y al igual que sucede con otros regímenes que incluyen derivados penicilínicos, existe un riesgo no despreciable de sobreinfección por gérmenes no sensibles, especialmente *Enterococcus* y *Candida*, que ha de tenerse en cuenta a la hora de su utilización.

#### 4.3 Tratamiento con antibióticos orales.

Aunque la PBE puede estar complicada con shock séptico, fleo, hemorragia digestiva o encefalopatía hepática y, por tanto, requiere un tratamiento antibiótico parenteral, un número no despreciable de pacientes con PBE se encuentran en condiciones clínicas relativamente buenas y pueden ser tratados por vía oral. Se han utilizado quinolonas (16) que se caracterizan por cubrir ampliamente los gérmenes habitualmente responsables de la PBE y tener una elevada biodisponibilidad y una rápida difusión en el líquido ascítico tras su administración oral.

Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio controlado y aleatorizado en 123 episodios consecutivos de PBE no complicadas (ausencia de shock

séptico, hemorragia digestiva o fleo y creatinina sérica inferior a 3 mg/dL) (16). En este estudio, ofloxacina oral (400 mg/12h) se ha demostrado igual eficaz que cefotaxima endovenosa (2 g/6h) en cuanto a resolución de la infección, supervivencia, incidencia de sobreinfecciones y duración del tratamiento antibiótico. Además, e independientemente del tratamiento recibido, el subgrupo de pacientes que presentaban insuficiencia renal o encefalopatía hepática al momento del ingreso, no desarrollaron complicaciones durante la hospitalización y pudieron ser dados de alta en su totalidad. Estos alentadores resultados indican que la ofloxacina por vía oral puede ser el tratamiento de elección en la PBE no complicada y que, aquellos pacientes que no presentan insuficiencia renal ni encefalopatía en el momento del diagnóstico podrían ser tratados en régimen ambulatorio lo cual resultaría en una mejoría de la calidad de vida de estos pacientes, además de una importante reducción del coste económico del tratamiento.

### 5. Profilaxis de la PBE.

La profilaxis de una infección bacteriana está indicada en aquellos pacientes con elevado riesgo de padecerla y si dicha infección comporta una elevada morbimortalidad. La PBE tiene una mortalidad asociada del 30% por cada episodio. Por otra parte, un paciente que ha presentado una PBE tienen probabilidad de volver a presentar otro episodio durante el primer año del 70% (13). Por tanto, aquellos pacientes que han superado un episodio de PBE son los candidatos idóneos para la profilaxis. La norfloxacina, se ha demostrado eficaz en la prevención de la recidiva de la PBE en los pacientes con cirrosis hepática. La norfloxacina (400 mg/día) produce una descontaminación intestinal selectiva, con eliminación o reducción de la concentración fecal de enterobacterias Gram-negativas y conservación de la flora Gram-positiva y anaerobia. Se ha sugerido que a través de este mecanismo, la norfloxacina es capaz de disminuir la probabilidad anual de recidiva de la PBE del 70% al 20% (17). Sin embargo, datos recientes sugieren que a lo largo del tratamiento profiláctico se desarrollan resistencias en la flora fecal de forma que no se mantiene la descontaminación intestinal. A pesar de ello, la eficacia en la prevención de la recidiva de la PBE por la norfloxacina parece mantenerse por lo que es posible que otros mecanismos, como por ejemplo efectos inmunomoduladores de las quinolonas, puedan tener un papel importante en la prevención de la recidiva de la PBE por la norfloxacina.

Otro grupo considerado de elevado riesgo en cuanto a la probabilidad de presentar un episodio de PBE lo constituyen aquellos pacientes con concentración de proteínas totales en el líquido ascítico inferior a 10 g/L. La probabilidad anual de presentar una PBE en estos



pacientes oscila entre el 20% y el 40% (5,6). La administración profiláctica de norfloxacin se ha demostrado eficaz en la prevención de la PBE en estos pacientes durante el ingreso hospitalario, reduciendo la incidencia de PBE del 23% al 0% (18). No obstante, parece evidente que deben obtenerse marcadores que permitan delimitar con mayor exactitud aquellos pacientes con elevado riesgo de presentar una PBE. La administración profiláctica indiscriminada de quinolonas sólo puede favorecer la aparición de resistencias y conllevar serios problemas terapéuticos en un futuro no muy lejano.

Otros antibióticos se han evaluado en la profilaxis de la PBE en la cirrosis hepática. La ciprofloxacina, administración semanal única de 750 mg, se ha demostrado eficaz en la prevención de la PBE en pacientes con concentración de proteínas en el líquido ascítico inferior a 15 g/L, si bien en este estudio también se incluyeron pacientes con episodio previo de PBE (19). El trimetoprim-sulfametoxazol, ha resultado eficaz en la prevención de la PBE en un grupo heterogéneo que incluía pacientes con antecedentes de PBE y pacientes con proteínas en líquido ascítico inferior y superior a 15 g/L (20). Estas pautas sugieren que puede disminuirse el coste de la profilaxis ya sea por la utilización de dosis inferiores o por la utilización de antibióticos más baratos. No obstante, debe tenerse en cuenta que la profilaxis mejor y más económica es aquella basada en la adecuada selección de los pacientes tributarios. Por último, debe recordarse que la PBE comporta un mal pronóstico. La probabilidad de supervivencia anual de los pacientes que han superado un episodio de PBE es inferior al 50%. Ello obliga a plantear el trasplante hepático en estos pacientes a los que puede ofrecer una supervivencia y calidad de vida claramente superiores (21).

## Bibliografía

1. Rimola A. infections in liver disease. In: McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodés J, editors. Oxford Textbook of Clinical Hepatology. Oxford: Oxford Medica Press, 1991: 1272-1284.
2. Garcia-Tsao G. Spontaneous bacterial peritonitis. Gastroenterol Clin North Am 1992; 1:257-275.
3. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodés J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. Hepatology 1984; 4:53-58.
4. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. Gastroenterology 1986; 91:1343-1346.
5. Llach J, Rimola A, Navasa M, Ginés P, Salmerón JM, Ginés A, Arroto V, Rodés J. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein concentration. Hepatology 1992; 16:724-727.
6. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, Coll S, Oliver MI. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis cirrhotic patients with ascites. Gastroenterology 1993; 104:1133-1138.
7. Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. Hepatology 1984; 4: 1209-1211.
8. Chu CM, Chang KY, Liaw YF. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. Dig Dis Sci 1995; 40: 561-565.
9. Akriavidis EA, Runyon BA. Utility of an differentiating spontaneous from secondary bacterial peritonitis. Gastroenterology 1990; 98: 127-133.
10. Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Fornis X, Francitorra A, Rimola A, Gassull MA, Arroyo V, Rodés J. renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. Hepatology 1994; 20: 1495-1501.
11. Toledo C, Salmerón JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, Ginés A, Ginés P, Rodés J. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. Hepatology 1993; 17: 251-257.
12. Navasa M, Francitorra A, Follo A, Filella X, Jiménez W, Rimola A, Arroyo V, Rodés J. Predictive value of tumor necrosis factor and interleukin 6 in spontaneous bacterial peritonitis. J Hepatol 1994; 21 (supl 1) S48.
13. Titó L, Rimola A, Ginés P, Llach J, Arroyo V, Rodés J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. Hepatology 1988; 8: 27-31.
14. Cabrera J, Arroyo V, Ballesta AM, Rimola A, Gual J, Elena M, Rodés J. Aminoglycoside nephrotoxicity in cirrhosis: value of  $\beta_2$ -microglobulin to discriminate



- functional renal failure from acute tubular damage. *Gastroenterology* 1982; 82: 97-105.
15. Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Pérez-Ayuso RM, Quintero E, Ginés P, Rodés J. Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhosis with severe infections. *Hepatology* 1985; 5: 457-462.
  16. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vergas V, Rimola A, Marco F, Guarner C, Forné M, Planas R, Bañares R, Castells L, Jiménez de Anta MT, Arroyo V, Rodés J. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1011-1017.
  17. Ginés P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forné M, Miranda ML, Llach J, Salmerón JM, Esteve M, Marqués JM, Jiménez de Anta MT, Arroyo V, Rodés J. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990; 12:716-724.
  18. Soriano G, Guarner C, Teixidó M, Such J, Barrios J, Enríquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; 100:477-481.
  19. Rolachon A, Cordier L, Bacq Y, Nousbaum JB, Franza A, Paris JC, Fratte S, Bohn B, Kitmacher P, Stahl JP, Zarski JP. Ciprofloxacin and long-prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial. *Hepatology* 1995; 22: 1171-1174.
  20. Sigh N, Gayowski T, Yu VL, Wagener MM. Trimethoprim-Sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 1995; 122:595-598.
  21. Navasa M, Cirera I, Rodríguez D, Andreu H. Indicaciones de transplante hepático. *Medicine* 1996; 7:451-455.

