

Veterinaria Cuyana

Vol.

2

Publicación de la Facultad de Veterinaria. Universidad Católica de Cuyo (San Luis) Argentina

n°

1 y 2

ISSN 1850-356X



VC



AUTORIDADES

Universidad Católica de Cuyo

Rectora

Dra. María Isabel Larrauri

Vicerrector San Luis

Dr. Javier Vera Frassinelli

Vicerrector San Juan

Cr. Alfonso Osvaldo Martín

Presidente del Directorio

Dr. Alejandro Largacha

Decana de la Facultad de Filosofía y Humanidades

Mg. Lucía Ghilardi de Carrizo

Decano de la Facultad de Veterinaria San Luis

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Decano de la Facultad de Derecho y Ciencias Sociales San Luis

Dr. Carlos Guillermo Maqueda

Decano de la Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales San Luis

Cr. Carlos Gustavo Auché

Decano de la Facultad de Ciencias Médicas San Luis

Dr. Héctor Daniel Anziano

Secretario General Académico San Luis

Lic. Alejandro Valentín Guzmán Stefanini

Veterinaria Cuyana



Vol. 2 n° 1 y 2, 2007
Publicación de la
Facultad de Veterinaria
Universidad Católica de Cuyo (San Luis) Argentina

ISSN 1850-365X
Registro Propiedad Intelectual en trámite

Dirección postal
Veterinaria Cuyana
Felipe Velázquez 471 (D5702GZI)
San Luis, Argentina

Editor Responsable
Dr. Nestor Oscar Stanchi

Director
Méd. Vet. Daniel Osvaldo Arias

Comité Editorial
(Carrera de Veterinaria)
Guillermo A. Bavera
Gustavo Giboin
Cristina Gobello
Pablo Eduardo Martino
Alejandra Stornelli
Juan Carlos Reyna
Carlos Rossanigo
Ricardo Sager
Javier Vera Frassinelli

Evaluadores de trabajos de Veterinaria Cuyana
L Basso (Argentina), B. Brihuega (Argentina), R Cacchione (Argentina), F Capano (Uruguay), C Carfagnini (Argentina), A Conigliaro (Argentina), JA Coppo (Argentina), J de Filippo (Argentina), R de Torres (Argentina), A Fosatti (Argentina), LM Friche Passos (Brasil), E Gentilini (Argentina), E Gimeno (Argentina), G. González (Argentina), JM Gutiérrez (Costa Rica), C Gómez (Argentina), N Leardini (Argentina), C Lerena (Argentina), M Monina (Argentina), E Montero Gei (Costa Rica), E Moras (Argentina), A Parma (Argentina), J Pereira (Argentina), ER Pons (Argentina), L Samartino (Argentina), I Sommerfelt (Argentina), P Soto (Argentina) H Tersolo (Argentina), J Zorzopulos (Argentina).

La revista Veterinaria Cuyana es una publicación semestral de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Católica de Cuyo, Argentina.

Está destinada a la difusión de trabajos científicos, de revisión e información institucional de esta y de otras instituciones.

The Journal Veterinaria Cuyana is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the Catholic University of Cuyo, San Luis, Argentina.

It is destined to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated in this and in other institutions.

© Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen a esta revista no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o docentes mencionando la fuente.

Los nombres comerciales están destinados para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos; tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Todos los trabajos publicados en Veterinaria Cuyana son sometidos a revisores externos.

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de Veterinaria Cuyana.

All articles published in Veterinaria Cuyana are submitted to external scientific reviewers.

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of Veterinaria Cuyana

Revisión de estilo

Prof. Nora B. Vázquez

Diseño y diagramación

Lic. Sandra M. Cadelago



Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina

Se solicita canje - We ask for exchange - On demande l'échange - Si prega lo scambio
Pedese permuta - Man bitter um austauch - Oni petas intersangon

Editorial

No podemos menos que estar contentos, esta alegría es fruto del trabajo de la Universidad Católica de Cuyo que sumó el apoyo de diversas instituciones de San Luis y del resto de la Argentina. La **Carrera de Veterinaria** es una realidad en la **Facultad de Veterinaria** de la **Universidad Católica de Cuyo**, con sede en San Luis, Argentina a partir del año 2008. Nuestro agradecimiento está dirigido a todos (personas e instituciones) los que de una forma u otra han hecho posible este logro.

Por la resolución 456/07 la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU) ha aprobado el plan de estudios, hecho por demás importante ya que es la primer carrera de veterinaria de todo el país en que la CONEAU aprueba su curricula. Ahora comienza el mayor desafío, lograr la educación de calidad que pretendemos y así posicionar a la **Facultad de Veterinaria** de la **UCCuyo** como una de las más importantes facultades de nuestro país.

Esperamos que los futuros profesionales veterinarios cuyanos puedan aplicar sus conocimientos en beneficio de toda la región y la nación.

Prof. Dr. Nestor Oscar Stanchi
Decano

Dr. Javier Vera Frassinelli
Vice Rector

Índice

Artículos de Investigación Research articles	EFECTO DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN SOBRE LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE RICOBENDAZOLE EN OVINOS. Administration Route Effect on the Absorption Kinetic of the Ricobendazole in Sheep. EA Formentini, N Messtorino, E Reggiardo, M Marti Díaz, SH Reutemann, JO Errecalde	5-15
Revisiones Review	RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENÉTICO. Epididymal Spermatozoa Recovery Like a Tool for Genetic Material Conservation. CM Tittarelli, MC Stornelli, F Gimenez, CA Savignone, RL de la Sota, M A Stornelli	16-20
	CONFRONTANDO LAS ZONOSIS: RELACIÓN ENTRE LA MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA. Confronting Zoonoses, Linking Human and Veterinary Medicine LH Kahn*	21-27
	OTITIS EXTERNA CANINA APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO. Canine External Otitis. Approach to the Diagnosis. Dragonetti AM, Broglia G.	28-33
Comunicaciones breves Short communications	LEPTOSPIROSIS HUMANA: ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y AISLAMIENTOS DE CEPAS DE CANINOS A RAIZ DE UN CASO FATAL. Human Leptospirosis: Epidemiologic Study and Isolation of a Strain of Fatal Case From Dogs. R Caminoa, D Pássaro, V Schamunn, JC Garcia, N Fernandez, ND Di Croce	34-39

*Kahn LH. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2006 Apr [date cited]. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no04/05-0956.htm>. Reproducido de Emerging Infectious Diseases. CDC. Atlanta Georgia.

EFFECTO DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN SOBRE LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE RICOBENDAZOLE EN OVINOS

ADMINISTRATION ROUTE EFFECT ON THE ABSORPTION KINETIC OF THE RICOBENDAZOLE IN SHEEP

**E. A. Formentini¹, N. Mestorino², E. Reg-
giardo¹, M. Marti Díaz¹, S. H. Reutemann¹,
J. O. Errecalde²**

¹ Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral, ² Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. INCAM, Verónica-Cañuelas, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Se estudió el comportamiento farmacocinético del ricobendazole (RBZ) tras su administración intravenosa (i.v), intrarruminal (i.r) y subcutánea (s.c) en ovinos. El RBZ se administró como solución experimental al 10% por la vía i.v, como suspensión experimental al 10% por vía i.r y por vía s.c como solución comercial al 10% (Sintyotal-R®). En todos los casos la dosis administrada fue 5 mg.kg⁻¹. Los datos de concentración plasmática fueron analizados mediante el método no compartimental y la discriminación del orden y la magnitud del proceso de absorción tras la administración i.r se realizó por construcción de curvas de cantidades acumulativas de fármaco ingresado a la circulación general mediante el método de Loo-Riegelman. Tras su administración i.r, el orden de absorción se asimiló a un proceso de orden cero, pero la fracción de la dosis biodisponible fue de alrededor del 30% mientras que tras su administración s.c el RBZ se absorbió rápidamente y casi en su totalidad. Estos resultados muestran un mejor comportamiento farmacocinético de la formulación inyectable con respecto a la clásica suspensión administrada por la vía i.r.

Abstract

The pharmacokinetic behavior of ricobendazole (RBZ) was studied after its intravenous (i.v), intrarruminal (i.r) and subcutaneous (s.c) administration in sheep. Ricobendazole was administered as experimental 10 % solution by i.v route, as experimental 10 % suspension by i.r route and by s.c route as 10% commercial solution (Sintyotal-R®). In all the cases the administered dose was 5 mg.kg⁻¹. The plasma concentration profiles were analyzed by means non-compartmental methodology, and the discrimination of the rate and the order of absorption after i.r administration were performed by construction of cumulative curves of drug entered into the general circulation by means of the Loo-Riegelman method. After i.r administration the order of absorption was best explained as a zero order process, the bioavailability being around 30 %, while after s.c administration t RBZ absorption was fast and bioavailability almost complete. These results shown a best pharmacokinetic behavior of the injectable formulation in comparison with the classic suspension administered by i.r route.

Palabras clave ricobendazole, farmacocinética, biodisponibilidad, ovinos

Key Words ricobendazole, pharmacokinetics, bioavailability, sheep

INTRODUCCIÓN

El ricobendazole (RBZ), también conocido como albendazole sulfóxido (ABZSO) es el metabolito activo del albendazole (ABZ), ambos a su vez, son miembros del grupo de antihelmínticos benzoimidazólicos (BZDs). Este grupo de fármacos es ampliamente usado para el tratamiento de las infecciones parasitarias en humanos y animales.

Los benzoimidazoles se caracterizan por ser bases débiles (pK_a 6.8-7.8) con escasa solubilidad acuosa, lo cual representa una limitante para su formulación. Por esa razón, para ser utilizados en las especies rumiantes, estos compuestos se formulan como suspensiones para ser administradas por vía oral o intraruminal (i.r) (1).

Tal como fuera propuesto por Marriner (2), el rumen se comporta como un reservorio fisiológico de los agentes BZDs, los que al ser liberados lentamente hacia el tracto digestivo posterior prolongan el proceso de absorción.

Al mismo tiempo, estudios posteriores demostraron que la velocidad de pasaje de la ingesta a través de la cavidad ruminal y por ende de las partículas de los BZDs puede ser modificada por el ayuno previo al tratamiento (3). De manera similar, el tipo, cantidad y calidad de la dieta ingerida durante el tratamiento puede influir significativamente en la permanencia del antihelmíntico en el organismo hospedador (4).

Los múltiples factores que influyen sobre la biodisponibilidad y la permanencia de los agentes BZDs administrados por vía oral estimularon el desarrollo de soluciones inyectables y así poder evitar la incidencia de la dieta y de la fisiología digestiva, como también facilitar la administración de los mencionados agentes terapéuticos.

El RBZ ha demostrado tener una excelente potencia y un amplio espectro de actividad sobre *Fasciola hepática*, tenias, helmintos pulmonares y gastrointestinales luego de su administración en forma de solución por vía parenteral (5).

En el año 1995 el RBZ fue introducido en el mercado Latino Americano como solución inyectable para ser administrado por vía subcutánea (s.c) a bovinos. Esta vía de administración evita el rumen y de esa manera todos los factores relacionados con la fisiología digestiva, capaces de influir sobre la biodisponibilidad y el tiempo de permanencia del fármaco en el animal hospedador.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento farmacocinético del RBZ y su metabolito, ABZSO2, en ovinos; evaluando el efecto que diferentes formulaciones y vías de administración

tienen sobre la cinética de absorción, la biodisponibilidad y el tiempo de permanencia del RBZ en el organismo.

Materiales y métodos

Animales experimentales

Se utilizaron cinco ovinos hembra raza corriedale sanos y libres de parásitos con un peso comprendido entre los 40 y 50 kg. Durante la fase experimental los animales permanecieron en corrales consumiendo heno de alfalfa de buena calidad y teniendo libre acceso al consumo de agua.

Administración

El medicamento estudiado fue el metabolito activo de ABZ, también conocido como albendazole sulfóxido (ABZSO) o ricobendazole (RBZ), el que fue administrado por las vías i.v., s.c. e i.r. según un diseño de cross-over con tres fases, tres grupos de tratamiento y un periodo de espera de una semana entre cada fase experimental.

El RBZ fue administrado a la dosis de 5 mg.kg⁻¹ en tres formas farmacéuticas:

- Como solución experimental al 10% formulada en un vehículo acuoso para su administración i.v.

- Como solución comercial al 10% (Syntio-tal-R® Biogénesis Argentina) para su administración s.c.

- Como suspensión experimental al 10% formulada en un vehículo a base de carboximetilcelulosa para su administración i.r.

Las administraciones por vía i.v se realizaron en la vena yugular derecha previa depilación e higiene de la zona. Las administraciones por vía i.r se realizaron en la zona del ijar en el flanco izquierdo y las administraciones por vía s.c se realizaron en la región de la tabla del cuello del lado derecho.

Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción directa de la vena yugular, mediante jeringas heparinizadas, previamente a la administración del RBZ por las diferentes vías de administración y a los siguientes tiempos post administración: 1, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos; y 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48 y 60 h. El plasma fue separado mediante centrifugación dentro de la hora de la extracción y almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis cromatográfico.

Procedimiento analítico

Para la detección y cuantificación de RBZ y ABZSO2 se utilizó un equipo cromatográfico compuesto por una bomba isocrática GILSON Modelo 307 (Gilson Inc.), una columna de fase reversa Konik-TECH, SPHERISORB ODS2, 5 mm 25/0.4 y un detector GILSON UV/VIS-155 de longitud de onda variable siendo la máxima absorbancia para los analitos de 292 nm. Las condiciones operativas usadas fueron las descritas por Marriner et al., (2) utilizando mebendazole (MBZ) como estándar interno. La fase móvil se compuso de una mezcla de metanol: agua en proporción 80:20 + 1mL de ácido perclórico (1.1% p/v) por mL de solución preparada. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/minuto. Con estas condiciones operativas los tiempos de retención para ABZSO2, RBZ y MBZ fueron de 2.30 min, 3.03 min y 4.26 min respectivamente.

Las moléculas de RBZ, ABZSO2 y MBZ fueron extraídas de la matriz plasmática utilizando la técnica reportada por Galtier et al., (6) modificada. Un mL de plasma problema fue enriquecido con 1 mg de MBZ como estándar interno. A esta muestra se le adicionaron 10 mL de acetato de etilo calidad HPLC. Luego de agitar en vortex durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se lo evaporó a seco bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo seco se disolvió en 0.25 mL de fase móvil y se lo inyectó posteriormente en el equipo cromatográfico.

La cuantificación del RBZ y del ABZSO2 se realizó mediante el método del estándar interno en donde la concentración de estos en la muestra plasmática fue estimada sobre la base de la relación entre sus áreas y la del estándar interno. Los cálculos de las áreas de los analitos y del estándar interno, las rectas de calibración entre las relaciones analito/estándar interno y la estimación de las concentraciones de RBZ y ABZSO2 en las muestras experimentales fueron realizadas con el programa PC-Crom versión 280.

Análisis farmacocinético

Análisis farmacocinético del RBZ

El análisis de los perfiles de concentración plasmática de RBZ obtenidos tras la administración i.v fue realizado por el método no compartimental.

El área bajo la curva concentración plasmática versus tiempo desde tiempo cero hasta el tiempo correspondiente a la última concentración plasmática medida ($ABC_{(0-t)}$) fue estimada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ABC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$$

donde t_i es un tiempo al que se observa una concentración plasmática (C_i) y t_{i+1} es el tiempo al que se observa la concentración plasmática siguiente (C_{i+1}).

El área bajo la curva concentración plasmática versus tiempo extrapolada al infinito ($ABC_{(0-\infty)}$) fue estimada con la siguiente relación:

$$ABC_{(0-\infty)} = ABC_{(0-t)} + \frac{C_z}{\lambda_z}$$

donde C_z es la última concentración plasmática medida y λ_z es la constante de eliminación de primer orden aparente estimada a partir de la fase terminal.

El porcentaje correspondiente al ABC estimada desde C_z hasta el infinito fue calculada en base a la siguiente ecuación:

$$ABC(\% \text{ ext}) = \frac{ABC_{(0-\infty)} - ABC_{(0-t)}}{ABC_{(0-\infty)}} \times 100$$

El tiempo medio de residencia fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$TMR = \frac{ABMC_{(0-\infty)}}{ABC_{(0-\infty)}}$$

donde ($ABMC_{(0-\infty)}$) es el área bajo el momento de la curva concentración plasmática versus tiempo que fue estimada de la siguiente manera:

$$ABMC_{(0-\infty)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i t_i + C_{i+1} t_{i+1}) + \frac{C_z t_z}{\lambda_z} + \frac{C_z}{\lambda_z^2}$$

donde t_z corresponde al tiempo en el que se observa C_z . El Volumen de distribución al estado de equilibrio estacionario ($V_{d(ss)}$) fue estimado de la siguiente manera:

$$V_{d(s)} = \frac{\text{Dosis} \times ABMC_{(0-\infty)}}{ABC_{(0-\infty)}}$$

El volumen de distribución estimado durante la fase terminal de disposición plasmática o volumen de área ($V_{d(\text{area})}$) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$V_{d(\text{area})} = \frac{\text{Dosis}}{ABC_{(0-\infty)} \lambda_z}$$

El aclaramiento corporal o clearance total (Cl_B) fue estimado según la siguiente relación:

$$Cl_B = \frac{\text{Dosis}}{ABC_{(0-\infty)}}$$

La semivida de eliminación ($t_{1/2(\text{el})}$) fue estimada de la siguiente manera:

$$t_{1/2}(\text{h}) = \frac{0.693}{\lambda_z}$$

donde 0.693 es el logaritmo natural de 2.

El tiempo medio de absorción (TMA) fue calculado mediante el siguiente procedimiento:

$$\text{TMA} = \text{TMR}_{\text{ev}} - \text{TMR}_{\text{iv}}$$

donde TMR_{ev} y TMR_{iv} son los tiempos medios de residencia estimados tras las administraciones extravascular e intravascular respectivamente. La constante de primer orden de absorción aparente (k_a) fue calculada según la siguiente relación:

$$k_a = \frac{1}{\text{TMA}}$$

La constante de primer orden de absorción real (k_{01}) fue estimada a partir de la siguiente ecuación (ver apéndice):

$$k_0 = k_a \times F$$

donde F es la fracción de la dosis administrada que ingresó a la circulación general y que fue calculada según la siguiente relación:

$$F = \frac{ABC_{(0-\infty)\text{ev}}}{ABC_{(0-\infty)\text{iv}}}$$

donde $ABC_{(0-\infty)\text{ev}}$ y $ABC_{(0-\infty)\text{iv}}$ son las áreas bajo la curva concentración plasmática versus tiempo estimadas a partir de las administraciones extravascular e intravascular respectivamente. El tiempo de máxima concentración plasmática (T_{max}) y la máxima concentración plasmática (C_{max}) fueron estimados por inspección visual de los datos de concentración plasmática.

Cinética de absorción de RBZ tras su administración intraruminal

Dado que tras la administración intravascular, los datos de concentración plasmática log. transformados versus tiempo mostraron la presencia de una fase de distribución, el orden y la velocidad de absorción del RBZ fue discriminado mediante la construcción de curvas acumulativas de RBZ ingresado a la circulación sistémica en función del tiempo utilizando el método descrito por Loo-Riegelman (7), el que necesita de los valores de las constantes de primer orden aparente de eliminación (k_{10}), distribución (k_{12}) y redistribución (k_{21}) asociados a un modelo abierto de dos compartimientos. Estos fueron estimados mediante el ajuste individual de los datos de concentración plasmática de RBZ obtenidos luego de su administración intravascular mediante el empleo

del siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dX_1}{dt} = -(k_0 + k_2) X_1 + k_2 X_2$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_1 - k_2 X_2$$

$$C_p = \frac{X_1}{V_{d(c)}}$$

donde dX_1/dt y dX_2/dt son las variaciones de las cantidades de medicamento sobre la diferencial del tiempo en los compartimientos central y periférico respectivamente, X_1 y X_2 son las cantidades de medicamento presentes en los compartimientos central y periférico y $V_{d(c)}$ es el volumen del compartimiento central. El esquema de ponderación que logró una distribución homogénea y al azar de las residuales con respecto a la abscisa fue $1/y^2$.

Las gráficas de absorción acumulativa de RBZ fueron construidas mediante el método de Loo-Riegelman según la siguiente ecuación:

$$X_{A(0-t)} = C_{p(t)} V_{d(c)} + k_0 V_{d(c)} ABC_{(0-t)} + X_{p(t)}$$

donde $X_{A(0-t)}$ es la cantidad de medicamento acumulativa ingresado al organismo desde el tiempo cero hasta un tiempo dado, $C_{p(t)}$ es la concentración plasmática observada a un tiempo determinado, $V_{d(c)}$ es el volumen del compartimiento central estimado mediante análisis compartimental, k_{10} es la constante de primer orden de eliminación desde el compartimiento central y $X_{p(t)}$ es la cantidad de medicamento presente en el compartimiento periférico a un tiempo determinado. Las gráficas de absorción acumulativa de RBZ expresadas como porcentaje de la dosis administrada ($\%X_{A(t)}$) fueron construidas de la siguiente manera:

$$\%X_{A(t)} = \frac{X_{A(0-t)}}{X_{A(0-\infty)}} \times 100$$

donde $X_{A(0-\infty)}$ es la cantidad total de medicamento absorbido estimada individualmente según la siguiente ecuación:

$$X_{A(0-\infty)} = ABC_{(0-\infty)} C_B$$

Análisis farmacocinético de ABZ-SO2

Los perfiles plasmáticos de ABZSO2 fueron analizados mediante estimación de las ABCs por medio del método trapezoidal, T_{max} y C_{max} fueron

obtenidos mediante inspección visual de los mencionados perfiles. La relación entre las ABCs de ABZSO₂ y RBZ (SO₂/SO) fue calculada por medio de la siguiente relación:

$$SO_2/SO = \frac{ABC_{(0-\infty)}ABZSO_2}{ABC_{(0-\infty)}RBZ}$$

Análisis estadístico

Con el objeto de realizar el estudio estadístico mediante la aplicación de un test paramétrico se testeó la distribución normal de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Previa comparación de los valores de C_{1B} , $V_{d(ss)}$, $V_{d(areal)}$, C_{max} , ABC , TMR , TMA , k_d , $t_{1/2el}$ y F ; estos fueron logotransformados. En el caso de los datos transformados, la homocedasticidad de la varianza entre los grupos fue verificada por el test de Bartlett. Cuando las diferencias entre las varianzas no fueron significativas la comparación de las diferencias entre las medias de cada tratamiento se realizó empleando el test de t de comparación de medias o de Student de dos colas para muestras pareadas. Los valores de T_{max} , $t_{1/2el}$ y $t_{1/2el}$ fueron comparados sin transformación por medio del test no paramétrico Mann-Whitney. Para

ambos procedimientos el límite de significación (p) fue fijado en 0.05.

Resultados

Análisis farmacocinético del RBZ

Los perfiles de concentración plasmática de RBZ obtenidos tras las administraciones i.v, s.c e i.r se presentan en la Figura 1. Los valores de las concentraciones plasmáticas están expresados por su valor promedio y desvío estándar.

Los resultados del análisis no compartimental de los perfiles de concentración plasmáticas de RBZ y ABZSO₂ se presentan en la Tabla I.

La fracción biodisponible de la dosis de RBZ tras la administración i.r fue significativamente menor a la observada tras la administración s.c, la que fue casi completa. Al mismo tiempo el pico de máxima concentración plasmática fue más elevado y se alcanzó más tempranamente tras la administración s.c que tras la administración i.r. Esto se corresponde con la rápida absorción observada tras la administración s.c con respecto a la observada tras la administración i.r.

En la Figura 2 se presentan los datos experimentales de concentración plasmática de RBZ obtenidos tras la administración intravascular (valores

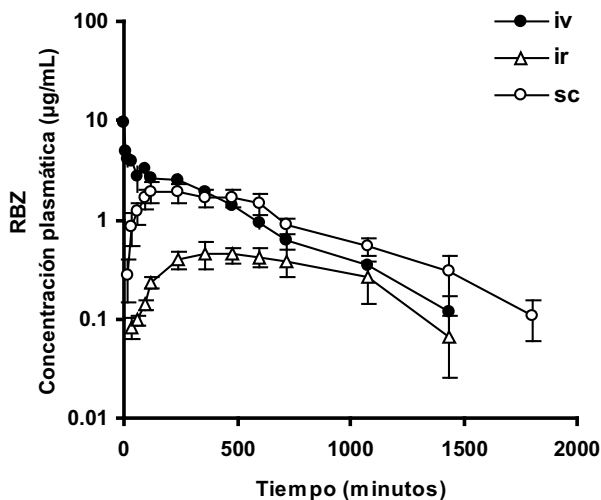


Figura 1. Perfiles de concentración plasmática de ricobendazole (RBZ) obtenidos tras su administración a ovinos por las vías intravenosa (i.v), intrarruminal (i.r) y subcutánea (s.c) a la dosis de 10 mg/kg. Las concentraciones plasmáticas están expresadas como valores promedio y desvío estándar.

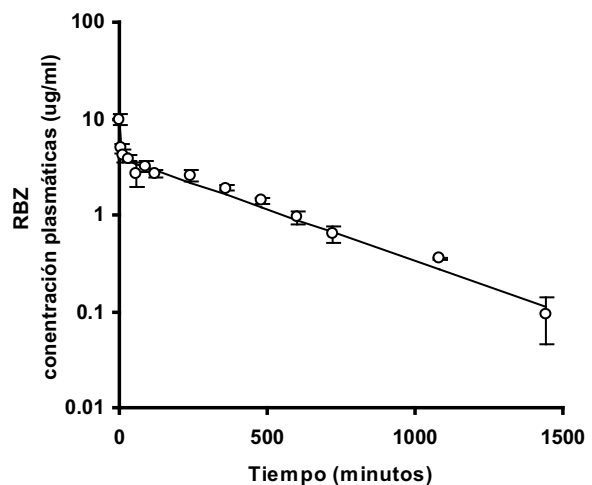


Figura 2. Perfil de concentración plasmática (valores promedio y desvíos estándar) de ricobendazole (RBZ) obtenido tras su administración a ovinos por la vía intravenosa (i.v) a la dosis de 10 mg/kg. Los valores estimados por el ajuste de los datos mediante análisis de regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con un modelo de dos compartimentos abierto están representados con una línea llena.

Tabla I. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de RBZ tras la administración en ovejas por vía intravenosa de una solución experimental al 10% en DMSO, por vía subcutánea como solución comercial al 10% (Sintyotal-R®) y por la vía intrarruminal como suspensión experimental al 10% a la dosis de 5 mg.kg⁻¹. Los valores están expresados como promedio ± desvío estándar.

Parámetros	Intravenoso	Subcutáneo	Intrarruminal
Cl_B (ml/minkg)	2.90 ± 0.080		
$V_{d(ss)}$ (ml/kg)	1069 ± 166		
$V_{d(areá)}$ (ml/kg)	1147 ± 96.2		
λ_z (min ⁻¹)	0.0028 ± 0.00040	0.0020 ± 0.00032	0.0021 ± 0.00074
$t_{1/2(e)}$ (min)	255 ± 40.1	344 ± 65.1	361 ± 120
ABC (µg.min/ml)	1723 ± 47.8	1706 ± 235	554 ± 182 *
ABC (% ext)	2.09 ± 1.36 *	3.16 ± 1.31 *	7.02 ± 3.66 *
MRT (min)	395 ± 26.5 *	628 ± 70.1 *	877 ± 152 *
t_{max} (min)		192 ± 65.7 *	432 ± 107 *
C_{max} (µg/ml)		2.17 ± 0.18 *	0.47 ± 0.10 *
TMA (min)		233 ± 95.1 *	482 ± 148 *
k_a (min ⁻¹)		0.0049 ± 0.0019	
k_{01} (min ⁻¹)		0.0048 ± 0.0019	
$t_{1/2(abs)}$ (min)		163 ± 63.5	
k_0 (µg/kg/min)			1.85 ± 0.74
T_{abs} (min)			846 ± 150
F		98.9 ± 11.9	32.1 ± 10.3

Cl_B : clearance corporal; V_{ss} : volumen de distribución al estado de equilibrio; $V_{areá}$: volumen de área; λ_z : exponente de la fase de disposición lenta y $t_{1/2(e)}$ es su correspondiente semivida; ABC: área bajo la curva concentración plasmática versus tiempo extrapolada al infinito; ABC (% ext): ABC parcial calculada desde la última concentración mensurable hasta el infinito, expresada como porcentaje del ABC total; MRT: tiempo medio de residencia; t_{max} : tiempo al que se observa la máxima concentración plasmática; C_{max} : máxima concentración plasmática observada; TMA: tiempo medio de absorción; k_a : constante de primer orden de desaparición del RBZ desde el sitio de absorción; k_{01} : constante de absorción de primer orden; $t_{1/2(abs)}$: semivida de absorción; k_0 : constante de absorción de orden cero; T_{abs} : tiempo estimado del proceso de absorción de orden cero; F: fracción absorbida o biodisponible de la dosis administrada; *: valor estadísticamente diferente a los demás, $p < 0.05$.

promedio y desvío estándar) junto con el promedio de los valores mejores estimados mediante el análisis compartimental. En la Tabla II se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio y desvío estándar asociados al modelo compartimental.

Las curvas individuales de absorción acumulativa de RBZ tras la administración i.r se presentan en la Figura 3. La curva de absorción acumulativa expresada como % de la cantidad absorbida de la dosis total se presenta en la Figura 4.

Estas gráficas ponen de manifiesto la existencia de un proceso de absorción de orden y magnitud complejos que se caracteriza por una absorción a débito constante con un pico que se produce aproximadamente a las 4 horas (240 min) de la administración.

Análisis farmacocinético del ABZ-SO2

Los perfiles de concentración plasmática de ABZSO2 obtenidos tras las administraciones i.v, s.c e i.r se presentan en la Figura 5. Los parámetros farmacocinéticos (promedio ± desvío estándar) de ABZSO2 obtenidos tras la administración i.v, s.c, e i.r de RBZ se presentan en la Tabla III. Los valores de T_{max} y C_{max} no presentaron diferencias entre las vías i.v y s.c y en el caso de la administración i.r el valor de C_{max} fue menor y se presentó más tardíamente. Los valores de las ABCs resultantes de la administración de RBZ por las vías i.v, s.c e i.r fueron diferentes entre si, siendo el valor más grande para el ABC obtenida tras la administración s.c y el menor para la obtenida tras la administración i.r. La relación

Tabla II. Parámetros farmacocinéticos que explican la disposición plasmática de RBZ en ovejas tras la administración intravenosa de una solución experimental al 10% en DMSO. Los mismos fueron estimados a partir de los datos individuales de concentración plasmática mediante regresión lineal ponderada de mínimos cuadrados utilizando un modelo de bicompartimental abierto. Los valores están expresados como promedio \pm desvío estándar.

Parámetros	Intravenoso
$V_{d(c)}$ (mL/kg)	383 \pm 33
k_{10} (min^{-1})	0.0075 \pm 0.0003
k_{12} (min^{-1})	0.313 \pm 0.102
k_{21} (min^{-1})	0.158 \pm 0.016

$V_{d(c)}$: volumen del compartimiento central; k_{10} , k_{12} , k_{21} : constantes de primer orden aparente de eliminación desde el compartimiento central, distribución y redistribución respectivamente.

SO2/RBZ presentó valores similares en las vías s.c e i.r mientras que presentó un valor más bajo en la administración i.v.

DISCUSIÓN

El RBZ administrado por vía i.v en ovinos presenta un patrón de disposición plasmática muy similar al observado tras su administración i.v a bovinos (8), en donde se observa una marcada fase de distribución, tal como se presenta en la Figura 2. El estudio comparativo de la cinética i.v de este fármaco en ambas especies mostró que aunque existen diferencias a favor de los ovinos a nivel de los valores de V_d , estas no son relevantes desde un punto de vista biológico (9).

Los V_d ($V_{d(ss)}$ y $V_{d(areal)}$) son mayores a 600 ml/kg, lo que sugiere la existencia de un reservorio de fármaco en el organismo. Parte de esta hipótesis ha sido corroborada por el efecto de dilución del fármaco que ejercen los volúmenes de líquidos presentes en el tubo digestivo de los rumiantes, los cuales representan aproximadamente el 12 al 15% del peso corporal (10). Estos, al presentar valores de pH inferiores al plasma favorecen el atrapamiento iónico de las bases débiles como el RBZ (pK_a 6.8) el que se concentra en el lumen del tubo digestivo (11), dando lugar a los elevados valores de V_d .

La capacidad de eliminación global del organismo del ovino para con el RBZ fue estimada y expresada como el coeficiente de extracción global o E (12) calculado como la relación entre el C_b y el débito cardíaco Q (volumen ventricular), este último estimado por alometría (ver apéndice). En este caso, el valor de E representa solamente el 3.1% \pm 0.9%

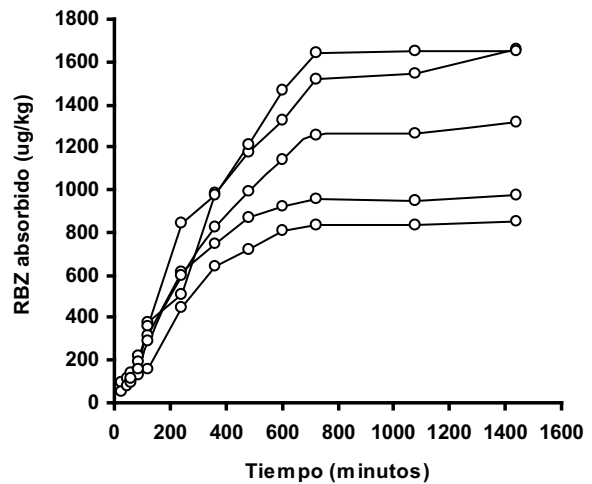


Figura 3. Curvas individuales de absorción acumulativa en función del tiempo de ricobendazole (RBZ) en ovinos tras su administración por vía intrarruminal (i.r) en forma de suspensión experimental al 10%. Las curvas fueron construidas con el método de Loo-Riegelman.

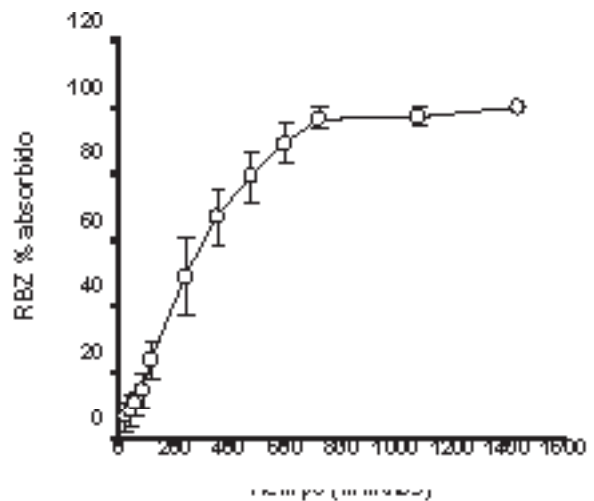


Figura 4. Curva de absorción acumulativa de RBZ (promedios y desvíos estándar) en función del tiempo tras su administración por vía intrarruminal (i.r) en ovinos. Los valores acumulados se expresan como porcentaje de la totalidad de la dosis biodisponible.

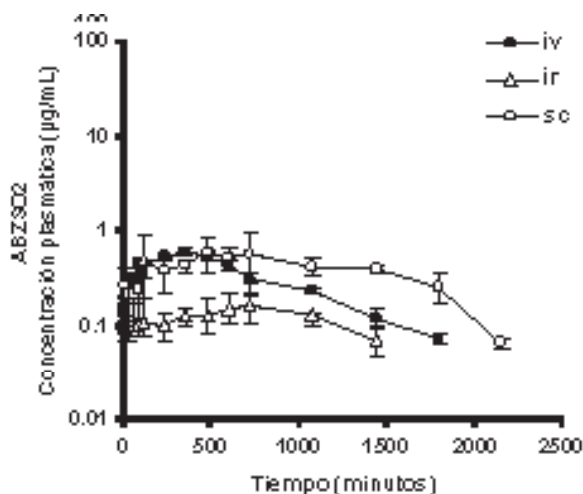


Figura 5. Perfiles de concentración plasmática de albendazole sulfona (TCBZSO2) obtenidos tras la administración de ricobendazole (RBZ) a ovinos por las vías intravenosa (i.v), intrarruminal (i.r) y subcutánea (s.c) a la dosis de 10 mg/kg. Las concentraciones plasmáticas están expresadas como valores promedio y desvíos estándar.

de Q lo que guarda relación con el valor de E del RBZ reportado para bovinos (9, 13), lo que coincide con un fármaco que puede ser clasificado como de bajo coeficiente de extracción (14).

La implicancia farmacocinética de este hallazgo está determinada por el hecho que siendo el valor del Cl_B el resultante de la sumatoria de las depuraciones parciales llevadas a cabo en todos los

tejidos u órganos (hígado, riñones o el metabolismo en la luz del tubo digestivo por nombrar algunos), entonces es lógico asumir que el valor del coeficiente de extracción hepático o E_H debe ser menor al valor de E global.

Diversos estudios “*in vitro*” han demostrado que la biotransformación de los compuestos BZDs puede llevarse a cabo en los fluidos digestivos, donde el RBZ puede ser oxidado de manera irreversible a su metabolito inactivo el ABZSO2. Sin embargo a partir de los resultados reportados por Lanusse y col. (15, 16) la cantidad de ABZSO2 formado a partir de RBZ en fluidos intestinales y ruminales no es relevante para inferir una pérdida considerable por metabolismo en la luz del tubo digestivo. De la misma manera, el metabolismo “*in vitro*” del RBZ por la fracción microsómica de los enterocitos muestra una escasa capacidad de formar ABZSO2 a partir de RBZ (17, 18).

Considerando que el E_H presenta un valor menor al E global, se podría suponer que tras una administración oral, en donde la totalidad de la dosis administrada se absorbiera e ingresara íntegramente a la circulación portal, la máxima fracción biodisponible (F_{max}) sería mayor al 97% de la dosis administrada (ver apéndice).

Lo expuesto se corrobora por los hallazgos reportados por Formentini y col. (19) en donde luego de la administración intraabomasal del RBZ en forma de solución comercial inyectable al 10% (Sintyotal-R® Biogénesis Argentina) se reportan valores de F mayores del 90%. La explicación de este hallazgo se basa en que la dosis administrada se encontró en

Tabla III. Comparación de los parámetros farmacocinéticos de ABZSO2 en ovinos calculados a partir de los datos de concentración plasmática obtenidos luego de la administración de RBZ como solución experimental al 10% en DMSO por vía i.v., como solución comercial al 10% (Sintyotal-R®) por vía s.c. y como suspensión experimental al 10% por la vía i.r. a la dosis de 5 mg.kg⁻¹. Los valores están expresados como promedio ± desvío estándar.

Parámetros	Intravenoso	Subcutáneo	Intrarruminal
ABC (µg.min/ml)	546 ± 43 *	841 ± 120 *	188 ± 50 *
ABC (% ext)	5.12 ± 1.02 *	3.68 ± 0.95 *	1.38 ± 1.92 *
t_{max} (min)	384 ± 54	576 ± 100	840 ± 224 *
C_{max} (µg/ml)	0.60 ± 0.03	0.76 ± 0.30	0.18 ± 0.05 *
\dot{e}_z (min ⁻¹)	0.0021 ± 0.00033	0.0020 ± 0.00031	0.0018 ± 0.00025
$t_{1/2}$ (el) (min)	325 ± 60	343 ± 55	366 ± 62
SO2/RBZ	0.31 ± 0.03	0.50 ± 0.07	0.40 ± 0.06

SO2/RBZ: relación entre las ABCs de ABZSO2 y RBZ; (*): valor estadísticamente diferente a los demás: $p < 0.05$. Los demás símbolos se hallan explicados al pie de la Tabla I.

solución y en condiciones para ser absorbida en su totalidad desde el duodeno. Los elevados valores de F permiten inferir que las pérdidas producidas por efecto de primer pasaje entérico y hepático fueron de poca magnitud.

En base a lo expuesto podemos decir que los bajos valores de F de RBZ obtenidos tras la administración intrarruminal son debidos fundamentalmente a factores extrahepáticos como adsorción de la molécula al material particulado de la dieta (20), eliminación de partículas sin disolución u oxidación irreversible del RBZ a ABZSO2 por acción de la flora digestiva entre otros.

La ausencia de factores asociados a la fisiología digestiva y la presencia del fármaco en solución constituirían una posible explicación de los elevados valores de F de RBZ ($98.9 \pm 11.9\%$) tras su administración subcutánea. Los elevados valores de C_{\max} ($2.17 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$) y su temprano T_{\max} ($192 \pm 65.7 \text{ min}$) indican la rapidez con la que se produce la absorción. En cambio, tras la administración i.r, los bajos valores de C_{\max} ($0.47 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$), la tardía aparición del T_{\max} ($432 \pm 107 \text{ min}$) y la inspección visual de los perfiles de concentración plasmática versus tiempo, en donde las concentraciones plasmáticas tienden a alcanzar un estado de "plateau" o meseta permiten inferir un proceso de absorción asimilable al de orden cero.

En el caso de la administración i.r es importante remarcar la diferencia hallada entre los valores de T_{\max} y T_{abs} , lo cual demuestra que cuando la absorción se asimila a un proceso de orden cero, el T_{\max} observado no siempre tiene relación con el final aparente del proceso de absorción.

Las curvas individuales de absorción acumulativa de RBZ construidas según el método de Loo-Riegelman (Figura 3) muestran que en cada uno de los animales las cantidades acumulativas de RBZ absorbido se incrementan en forma casi lineal hasta alcanzar un estado estacionario después de los 800 min post administración. Esto puede asociarse con la finalización aparente del proceso de absorción lo que también guarda relación con el tiempo de absorción estimado mediante el método no compartimental ($864 \pm 53 \text{ min}$).

En la Figura 4 se observa que las cantidades de RBZ absorbidas y expresadas como porcentaje de la fracción de la dosis biodisponible presentan un pico a los 240 min. Considerando que los animales recibieron su ración de fardo de alfalfa tres horas luego de haber comenzado la experiencia, este fenómeno se correlaciona con un aumento de la motilidad ruminal y un mayor pasaje de fármaco al tracto digestivo posterior desde donde este es

absorbido.

Farmacocinética del ABZSO2

Como este experimento se realizó utilizando los mismos animales en cada una de las fases, podemos asumir que el volumen aparente de distribución del ABZSO2 permaneció invariable cualquiera sea la vía de administración utilizada para el RBZ. De esta manera, la relación entre los valores de las ABCs de RBZ y ABZSO2 puede ser utilizada para estimar en forma relativa la cantidad de metabolito formado en cada una de las vías de administración empleadas. A pesar de la gran diferencia entre los valores de F observados, la razón entre los valores de las ABCs de ABZSO2 y RBZ (SO2/RBZ) obtenidas en las vías de administración s.c e i.r fueron similares, lo que sugiere que no hubo una cantidad adicional de ABZSO2 producido como consecuencia de un efecto de primer pasaje hepático tras la vía de administración i.r.

CONCLUSIÓN

El RBZ se comportó en ovinos como una droga de bajo E , exhibiendo grandes valores de V_d , lo que determina un comportamiento farmacocinético caracterizado por una lenta eliminación del organismo y una gran capacidad para difundir hacia el espacio extravascular.

La administración parenteral del RBZ presentó una fracción biodisponible cercana a la totalidad de la dosis administrada mientras que la administración i.r de una suspensión presentó una fracción biodisponible de alrededor del 30% de la dosis administrada.

El perfil de concentraciones plasmáticas, tras la administración s.c, caracterizado por una elevada C_{\max} y una temprana aparición del T_{\max} se asocia a un proceso de absorción veloz en contraposición a los bajos valores de C_{\max} y tardía aparición del T_{\max} , obtenidos luego de la administración i.r, los que pueden asociarse a un proceso de absorción lento asimilable al orden cero.

Por tratarse de una droga que presenta bajo coeficiente de extracción, a partir de los resultados obtenidos podemos inferir que la principal causa de los bajos valores de F obtenidos tras la administración i.r de RBZ es debida a un efecto de pérdida de fármaco por el tubo digestivo más que a un efecto de primer pasaje.

Queda claro en este estudio que la administración i.r presentó ciertas ventajas, como proporcionar una absorción lenta y sostenida asimilable a un proceso de orden cero. Pero al mismo tiempo pone de manifiesto la existencia de factores que pueden

ser de índole fisiológico y nutricional como posible causa de la baja fracción de la dosis administrada que ingresó a la circulación sistémica.

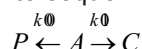
Estos hallazgos ponen de manifiesto un aparente mejor comportamiento farmacocinético de la solución inyectable de RBZ con respecto a la suspensión administrada por vía i.r, lo que podría ser explicado por el hecho de que la administración s.c evita las pérdidas de medicamento debido a factores relacionados a la fisiología digestiva de los rumiantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el soporte económico de una beca otorgada por la Universidad Nacional del Litoral dentro del Programa de Reforma de la Educación Superior y fue parcialmente financiada por el Banco Interamericano de Reconstrucción y Fomento (BIRF) de acuerdo a las estipulaciones y normas referidas al Manual de Operaciones del Fondo para el Mejoramiento de la Calidad Universitaria (FOMECA).

APENDICE

El significado de la constante de absorción aparente de primer grado (k_a) estimada por el método de los residuales o por el método no compartimental cuando en el sitio de absorción se produce en forma paralela un proceso de pérdida de medicamento fue explicado por Notari y col., (21) y se ilustra en el siguiente esquema:



donde P es el medicamento perdido, A es el medicamento en el sitio de absorción y C es el medicamento en el compartimento central, k_{00} y k_{01} fueron explicadas anteriormente. De lo anterior se deduce que k_a es igual a k_{01} cuando la pérdida desde el sitio de absorción es nula, lo que equivale a $k_{00} = 0$.

Considerando que los procesos operativos siguen una cinética de orden uno, entonces se deduce que el valor de k_{01} es una función lineal de F tal como se presenta a continuación:

$$k_{01} = k_a \times F$$

El débito cardíaco o Q puede ser estimado por aproximación alométrica, (22) según la siguiente ecuación:

$$Q = 186 \cdot w^{-0.19}$$

donde w es el peso del animal expresado en kg y el valor de Q se expresa como mL/min/kg.

Según el método de estimación reportado por

Benet & Zech (23), tanto el Cl_B como el Q_H son útiles para predecir la máxima fracción biodisponible (F_{max}) que podría obtenerse tras una administración oral.

$$F_{max} = 1 - \frac{Cl_B}{Q_H} = 1 - E$$

donde los símbolos fueron explicados anteriormente. Este método es útil solamente en el caso en que el hígado fuera el único responsable de las pérdidas de medicamento antes de su ingreso a la circulación sistémica.

REFERENCIAS

- 1.-McKELLAR, Q.A. & SCOTT, E. The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (1990) 13: 223-247.
- 2.-MARRINER, S. & BOGAN, J. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *American Journal Veterinary Research*. (1980) 41: 1126-1129.
- 3.-SANCHEZ, S. ; ALVAREZ, L. ; SALLOVITZ, J. and LANUSSE, C. Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (2000) 23: 193-201.
- 4.-SINGH, D.; SANYAL, P.; SWARNKAR, C.; KHAN, F. & BHAGWAN, P. Influence of the diet type and pre-treatment fasting on the disposition kinetics of albendazole in sheep. *Veterinary Research Communications*. (1999) 23: 229-240.
- 5.-CRUTHERS, L.; HAUGWITZ, R.; HASLANGER, M.; MAURER, B.; WATROUS, J. & LINKEHEIMER, W. Injectable benzimidazole anthelmintics effective against liver flukes, tapeworms and gastrointestinal roundworms. *Experientia*. (1978) 34: 1574.
- 6.-GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; STEIMER, J.; FRENCHETEAU, P.; PLUSQUELLEC, Y. & HOUIN, G. Simultaneous pharmacokinetic modeling of a drug and two metabolites: application to albendazole in sheep. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (1991) 80: 3-7.
- 7.-LOO, J.C.K. and RIEGELMAN, S. New method for calculating the intrinsic absorption rate of the drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (1968) 57: 918-928.
- 8.-FORMENTINI E. A.; MESTORINO O.N. and ERRECALDE J.O. Pharmacokinetics of ricobendazole in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (2001) 24: 199-202.
- 9.-FORMENTINI, E.A. Pharmacokinetics behaviour of ricobendazole in calves and sheep after its intravenous administration. *Revue Médecine Vétérinaire*. (2005a) 156: 37-42.
- 10.-BAGGOT, J. Principles of Drugs Disposition in Domestic Animals. W.B. Saunders Co. Philadelphia. (1977)
- 11.-LANUSSE, C.; GASCON, L. & PRICHARD, R. Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (1993) 16: 38-47.
- 12.-GIBALDI, P. & PERRIER, D. *Pharmacokinetics*, 2nd Ed. Marcel Decker Inc. New York. (1982)

- 13.-FORMENTINI, E.A.; REUTEMANN, S.H.; MESTORINO, N.O. & ERRECALDE, J.O. *Farmacocinética de Ricobendazole en terneros*. Revista de Medicina Veterinaria. (2005b) 85: 195-202.
- 14.-LABAUNE, J.P. (1987) *Pharmacocinétique: Principes Fondamentaux*. 2e Ed. Masson. Paris.
- 15.-LANUSSE, C.; NARE, B.; GASCON, L. & PRICHARD, R. Bioconversion of netobimin pro-drug by gastrointestinal fluids of ruminants. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. (1991) 17: 121-128.
- 16.-LANUSSE, C. & PRICHARD, R. Methimazole increases the plasma concentrations of the albendazole metabolites of netobimin in sheep. *Biopharmaceutic & Drug Disposition*. (1992) 13: 95-103.
- 17.-LAWRENZ, V.A.; EGLIT, S. and KROKER, R. Investigations on metabolism of albendazole in the isolated perfused gut of rats. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. (1992) 99: 416-418.
- 18.-REDONDO, P.A.; ALVAREZ, J.L.; GARCIA, O.M.; LARRODÉ, O.M.; MERINO, G. and PRIETO, J.G. Presystemic metabolism of albendazole: experimental evidence of an efflux process of albendazole sulphoxide to intestinal lumen. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (1999) 27: 736-740.
- 19.-FORMENTINI, E.A. Farmacocinética de ricobendazole en rumiantes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. (2003)
- 20.-HENNESSY, D.R.; ALI, D.N. and TREMAIN, S. The partition and fate of soluble and digesta particulate associated oxfendazole and its metabolites in the gastrointestinal tract of sheep. *International Journal of Parasitology*. (1994) 24: 327-333.
- 21.-NOTARI, R.E.; DEYOUNG, J.L. AND REUNING, R.H. Effect of parallel first-order drug loss from site of administration on calculated values for absorption rate constants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (1972) 61: 135-139.
- 22.-GIBBONS G., POKRAS, M. & SEDWICK, C. Allometric scaling in veterinary medicine. *Australian Veterinary Practitioner*. [1988] 18: 160-164.
- 23.-BENET, L.Z. & ZECH, K. Pharmacokinetics-a relevant factor for the choice of a drug? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 8 (Suppl. 1): 25-32. Campbell, W. (1990) Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitology Today*. (1994) 6: 130-133.

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENÉTICO

EPIDYDIMAL SPERMATOZOA RECOVERY LIKE A TOOL FOR GENETIC MATERIAL CONSERVATION

C M Tittarelli¹, M C Stornelli¹, F Gimenez¹, C A Savignone²,
R L de la Sota¹, M A Stornelli^{1*}

Instituto de Teriogenología¹, Cátedra de Histología y Embriología², Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

CC 296 B1900AVW. La Plata. Argentina

Tel +54-221-4236663/4, ext 457, fax: +54-221-4257980. astornel@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

La recuperación espermática postmortem así como la criopreservación y almacenado de espermatozoides epididimales son técnicas importantes para preservar gametas y obtener reservas de material genético en animales valiosos o en vías de extinción. Los bancos de material genético son potencialmente capaces de mejorar la posibilidad de conservación de animales en vías de extinción ya que permiten utilizar material genético luego de la muerte de los animales. Es así que la recuperación de espermatozoides epididimales es sumamente útil en especial en relación a las dificultades que implica la recolección de semen en animales silvestres. Sin embargo existen variados factores que influyen este procedimiento. La viabilidad de los espermatozoides epididimales depende de diversos factores incluyendo el tiempo transcurrido desde la muerte hasta la recuperación y procesado de los espermatozoides. En este trabajo se analizan los resultados obtenidos en relación al manejo y almacenado de los epidídimos así como a la recuperación espermática epididimal en diferentes especies. Se discuten los factores que influyen la calidad de los espermatozoides epididimales y las metodologías utilizadas para mejorar la calidad de las células recuperadas.

Abstract

Post-mortem spermatozoa recovery and Freeze-storage of epididymal sperm are important techniques for the preservation of gametes in animals and obtaining germplasm reserves from genetically valuable animals or endangered species. Genome resource banks are potentially capable of improving the propagation of endangered species in order that allows introduction of an exchange of genetic material after an animal has died. In the same way post-mortem seminal recovery from the cauda epididymis is useful, particularly in view of the difficulties involved in semen collection from wild animals. However, there are many factors that influence the outcome of this technique. Viability of epididymal spermatozoa is variable and depends on several factors; including the interval from death until spermatozoa recovery and processing. In this paper result obtained from epididymis handling conditions and epididymal spermatozoa recovery in several species are reviewed. Factors influencing the epididymal spermatozoa quality and methods used for improvement are discussed.

Palabras clave espermatozoide-epididimo-criopreservación

Key Words spermatozoon -epididimis- cryopreservation

INTRODUCCIÓN

La muerte inesperada de animales de alto valor genético ya sea zootécnico, o de interés para los zoológicos (animales en vías de extinción) así como la dificultad para obtener semen fresco en especies silvestres ha impulsado el desarrollo y la aplicación de técnicas de reproducción asistida que permiten preservar la biodiversidad animal. Es así que los investigadores han dirigido sus esfuerzos a la preservación tanto de gametas como de células somáticas con el fin de crear bancos de material genético para ser usado en el futuro.

La obtención de espermatozoides epididimales (EE), potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epidídimo puede ser la única opción para preservar el material genético de un macho de alto valor reproductivo, luego de la muerte o castración por motivos médicos. Este hecho es especialmente relevante en animales en vías de extinción. La recuperación post-orquiectomía o post-mortem de gametas a partir de los órganos reproductivos y la posterior criopreservación de las mismas, es una herramienta sumamente interesante tanto para resguardar el material genético como para crear bancos de reserva de este material.

Desarrollo biotecnológico

Hace 76 años, Walton 1930 recuperó espermatozoides vivos de vasos deferentes de conejos. A partir de allí, se han realizado estudios sobre recuperación y criopreservación espermática epididimal en ratones (An y col 1999; Sato y col 2004.), ciervos (Yonai y col 1998; Hishinuma y col 2003), equinos (Bruemmer y col 2002), ovinos (Kaabi y col 2003), caninos y felinos (Hay y col 1993, Pope y col 1998, Baterman y col 2000, Peña y col 2000; Pushett y col 2000; Stillely y col 2000.). El avance de la biotecnología ha demostrado que los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de EE en especies domésticas pueden ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizados en animales silvestres en vías de extinción. De esta manera aumentarían las posibilidades de preservación de material genético sumándose al esfuerzo mundial para evitar las pérdidas de especies en el planeta.. (Díaz y col 2000).

Desde las primeras observaciones realizadas por Walton hasta la actualidad, se han realizado diversos estudios para determinar si los EE pueden ser usados para producir embriones viables y nacimiento de crías vivas. Iwamatsu y col 1971, comunicaron fertilizaciones exitosas de ovocitos de ratón utilizando EE. Fuller y col 1996 informaron la obtención de fetos normales de ratones luego de FIV con EE

refrigerados a 4°C inmediatamente después de la colección. Los mismos investigadores obtuvieron crías vivas de ratas mediante el uso de EE y, más recientemente, a partir de espermatozoides recuperados de epidídimos (EPI) de ratones congelados y descongelados (Songsasen y col 1997). También en caprinos, se logró la producción de embriones hasta la etapa de blastocisto utilizando EE mediante FIV como así también, el nacimiento de crías vivas por inseminación artificial (IA) (Song y col 1988, Blash y col 2000). Por otra parte en bovinos, Graff y col 1996, obtuvieron preñeces implementando FIV realizada con EE y, más recientemente, Foote 2000, logró el nacimiento de crías vivas mediante IA de EE. Así mismo en equinos, Barker y col 1957 obtuvieron nacimientos de potrillos por IA con espermatozoides de EPI criopreservados y descongelados. Por último, en cebras, Meintjes y col 1997, comunicaron el uso de EE en FIV logrando el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocito.

Si bien se han realizado muchos trabajos sobre la recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo (Hay y col 1993; Stillely y col 2000), existen escasas comunicaciones en relación al efecto que poseen sobre la viabilidad espermática las diferentes condiciones de almacenamiento de los EPI (Savignone y col 2004; Tittarelli y col 2006). El tiempo, la temperatura y el medio utilizado en el transporte de los EPI pueden causar cambios que alteren la viabilidad de las células espermáticas. Estas variables deben ser tenidas en cuenta ya que ante la muerte repentina de un animal, la única opción para salvar las células reproductivas puede ser el transporte de los testículos y EPI a un laboratorio equipado para la recuperación y criopreservación espermática.

Agudo y col 1994, evaluaron la viabilidad de espermatozoides ovinos recuperados de EPI almacenados a temperatura ambiente por 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Estos autores obtuvieron mayor viabilidad espermática (precongelado y al descongelado) cuando la recuperación se realizó dentro de las 3 horas post-mortem. Por otra parte, bajo condiciones similares, Garde 1994, y col no encontraron diferencias en la capacidad fecundante de los espermatozoides de carnero obtenidos dentro de las primeras 24 horas luego de la muerte. Sin embargo, se evidenció un marcado descenso de la viabilidad espermática al prolongar el período de almacenado. En ciervos (*Cervus elaphus*) y muflones (*Ovis musimon*) se demostró que almacenando los EPI por más de 40 horas a temperatura ambiente, tanto la viabilidad como la capacidad fecundante descendía al aumentar el intervalo de tiempo entre la muerte del animal y la recuperación espermática (Garde y col

1994). Al comparar las dos especies mencionadas se observó una marcada diferencia en la capacidad de penetración de ovocitos de hámster, siendo significativamente más bajo el índice de penetración en los espermatozoides de ciervos. En estos estudios, no se analizó el efecto de la temperatura sobre la calidad de los espermatozoides obtenidos. Sin embargo, Foote 2000, comunicó que los espermatozoides de toros permanecieron viables al ser usados en IA aún después de haberlos almacenado por 60 horas a 5°C. Kikuchi y col 1998 en cerdos y Kishikawa y col 1999 en ratones, sugieren que, ante la muerte repentina de un animal, cuando no es posible recuperar y criopreservar inmediatamente las células, el almacenado temporal de los EPI a 4°C puede ayudar a conservar las gametas. De igual manera, Kaabi y col 2003 comunicaron que la capacidad fecundante de espermatozoides ovinos criopreservados y descongelados obtenidos de EPI almacenados a 5°C por 24 horas fue similar a los espermatozoides criopreservados y descongelados de eyaculado. Sus informes indican que la refrigeración del epidídimo permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparados con el almacenado de estos órganos a temperatura ambiente. El almacenado de los EPI a 4°C evita un rápido descenso de la motilidad de los espermatozoides en ratones (Kishikawa y col 1999) y ciervos (Hishinuma y col 2003). Los mejores resultados obtenidos en diferentes pruebas de contrastación, especialmente en la motilidad, cuando se almacenan EPI refrigerados podrían ser explicados por la disminución del metabolismo celular de los espermatozoides almacenados a 4°C o 5°C (Salamon y col 2000). En relación a estas observaciones, Sankai y col 2001, encontraron que la motilidad de espermatozoides de ratones disminuía con el aumento de la temperatura de almacenado, sugiriendo que estos cambios se relacionan con la variación en la actividad metabólica celular.

Stilley y col 2000 comprobaron en caninos que a temperatura ambiente (22°C) se produce autólisis de los tejidos a las 54 horas post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 horas. Además, observaron que cuando los EPI se almacenan refrigerados a 4°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día.

Por otra parte Kikuchi y col 1998 comunicaron que la motilidad de espermatozoides porcinos almacenados a 4°C por 1 ó 2 días baja significativamente comparada con la de los espermatozoides no refrigerados tomados como control. Este hecho podía relacionarse con la sensibilidad de los espermatozoides porcinos a las bajas temperaturas, habiéndose

comunicado que a temperaturas menores a 15°C ocurre cambio de fase en las membranas espermáticas (Ito y col 1948). Más recientemente se estableció como crítica, en porcinos, una temperatura inferior a 12°C (Althouse y col 1998). Yu y col 2002 observaron que la motilidad de EE caninos almacenados a 4°C bajó significativamente (de 50% a 30%) dentro de las primeras 5 horas de almacenado, aunque no hubo disminución significativa de la integridad de membrana ni en la integridad acrosomal dentro de las 48 horas de refrigeración. Estos resultados evidenciarían que existen diferencias entre las distintas especies en el mantenimiento de la viabilidad de los EE almacenados post-mortem en los EPI.

Trabajos preliminares realizados en chinchillas (Savignone y col 2004) comunican mejores parámetros espermáticos al recuperar espermatozoides de EPI almacenados a 4°C durante 24 h en TYH o MRA® comparados con los almacenados en SF. Los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en SF tuvieron menor motilidad, vigor y endósomosis positiva comparados con los almacenados en TYH o MRA®. Así mismo, los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron mayor motilidad, vigor, endósomosis positiva y acrosomas intactos comparados con los recuperados de EPI almacenados en MRA®. Estudios realizados en caninos y felinos mostraron que todos los parámetros evaluados fueron significativamente inferiores a las 72 h comparados con los resultados obtenidos al recuperar a las 24 h. (Tittarelli y col 2006) En caninos los EE almacenados en TYH tuvieron mayor porcentaje de acrosomas normales comparados con los espermatozoides de epidídimos almacenados en SF. En felinos, se observó mayor motilidad, integridad de membrana y vigor en los espermatozoides de epidídimos almacenados en TYH con respecto a los espermatozoides almacenados en SF. Estas diferencias entre especies de la viabilidad espermática al almacenar los epidídimos en distintos medios podrían asociarse al diferente tamaño y espesor de la pared de los epidídimos de chinchillas, gatos y perros (Kitt y col 1985). Si bien los EE son almacenados dentro del epidídimo, de manera que durante el refrigerado estarían protegidos del shock térmico directo (Sankai y col 2001, Yu y col 2002), la incorporación de un medio de almacenado mejoraría la protección de los espermatozoides al shock térmico. Las bajas temperaturas a las que son sometidos los espermatozoides pueden producir shock de frío con los consecuentes daños irreversibles en las células. La yema de huevo utilizada en los diluyentes de semen, brinda un efecto protector de las células debido a los fosfolípidos y proteínas de baja densidad que posee. Es así que

almacenar los epidídimos en un medio con yema de huevo podría mejorar la protección del shock de frío que el órgano ejerce sobre los espermatozoides y aumentar la viabilidad de los mismos al ser recuperados luego de un período de almacenado (Savignone y col 2004, Tittarelli y col 2006).

Por otra parte el medio de almacenado actuaría previniendo la deshidratación del epidídimo mejorando la conservación del mismo y de esta manera conservando las características del medio interno del órgano lo cual resultaría en una mejor conservación de los EE (Sankai y col 2001). La autólisis posmortem consecutiva a la hipoxia produce cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana celular, por lo tanto, el mantenimiento de la integridad celular del epidídimo, almacén de las células espermáticas, permitiría recuperar mayor cantidad de espermatozoides viables. De esta manera, un medio de almacenado que permita preservar los tejidos epididimales y enlentecer la muerte celular favorecería en forma indirecta la sobrevida de los espermatozoides dentro del epidídimo.

CONCLUSIONES

Los avances ocurridos en este tipo de biotecnología hacen posible que ante la muerte repentina o castración inevitable, la recuperación espermática epididimal y la criopreservación de gametas permita resguardar el material genético animal. Además, aún cuando no sea posible recuperar y criopreservar inmediatamente las gametas, el almacenado temporal de los EPI a 4°C al menos en solución fisiológica durante 24 ó 48 horas, permite recuperar espermatozoides viables en un laboratorio de Andrología equipado para la recuperación y criopreservación espermática. Estos hechos hacen posible recuperar material valioso que de otra forma se perdería, posibilitando las conservación de especies en el planeta.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado en parte por un subsidio de la UNLP V11/134 a RLS.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado MJ, J Garde, JM Madriadano, S Perez, D, Garrido V, Montoro. 1994. Congelación post mortem de semen de epidídimo de morrueco. En: resúmenes de las VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial;; Murcia, España; p 283.

Althouse GC, ME Wilson, C Kuster, M. Parsley. 1998. Characterization of lower temperature limitations of fresh-extender porcine semen. *Theriogenology* 50, 535-543.

An TZ, S Wada, K Edashige, T Sakuray , M Kasai. 1999. Viable spermatozoa can be recuperated from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34

Barker CAV, JCC Gandier. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci* 21, 45-51.

Bateman HL, MA Hay , GF Mastromonaco, DP Ryckman and KL Goodrowe. 2000. Characterization of canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 53, :486 abstr.

Blash S, Melican D, Gavin W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899-905.

Bruemmer JE, H Reger, G Zibinski, EL Squires. 2002. Effects of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407

Diaz GB, RA Ojeda. 2000. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos); Pp 106. Mendoza, SAREM.

Foote RH. 2000. Letter to the editor. *J Androl* 21, 355

Fuller SJ, DG Whittingham. 1996. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fertil* 108, 139-45.

Garde J, M Aguado, V Montoro, MD Perez Guzman, O García, S Perz, et al. 1994a . Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morrueco. Resultados preliminares. En: resúmenes de las XVIII Jornadas de la SEOC, España; pp. 533-7.

Garde J, SS Perez; M Aguado, D Garrido, E Ayllon, V Montoro, et al. 1994b. Evolución post-mortem de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflon. En: resúmenes de las XIX Jornadas de la SEOC, Burgos, Spain, pp. 542-5.

Graff KJ, JE Chandler, BC Reggio, JM Lim, A Canal, JA Carter JA, et al. 1996. Pregnancies obtained from IVF with noncapacitated epididymal bovine spermatozoa. In: Proceedings 3rd International Meeting of Biotechnology and Animal Reproduction, Cairo, Egypt, pp.19-21.

Hay MA and KL Goodrowe. 1993. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert Suppl* 47, 297-305.

Hishinuma M, K Suzuki, J Sekine. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59, 813-820.

Ito S, T Niewa, A Kudo. 1948. Studies on the artificial insemination in swine. *Zootech Exp Sta Min Agr For (Chiba)*, 55. (citado por Althouse, 1998).

Iwamatsu Y, MC Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 26, 197-208.

Kaabi M, P Paz, M Alvarez, E Anel, JC Boixo, H Rouissi, P Herraiz, L Anel. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem *Theriogenology* 60, 1249-1259.

Kikuchi K, T Nagai, N Kashiwazaki, H Ikeda, J Noguchi, A Shimada and col. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50, 615-623.

Kishikawa H, H Tateno, R Yanagimachi. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J Reprod Fertil* 116, 217-22

Kitt T, L Schulz y col. 1985. Tratado de Anatomía Patológica General. 2^{da} ed. Labor, Barcelona;

- Meintjes M, C Bezuidenhout, P Bartels, DS Visser, J Meintjes, NM Loskutoff, et al. 1997. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's Zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*). *J Zoo Wildl Med* 28, 251-9
- Peña A, C Linde-Forsberg. 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54, 703-718.
- Pope CE, CA Johnson, MA McRae, GL Keller, BL Dresser. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 53, 221-36
- Pushett DA, O Lacham-Kapln, IM Gunn, AO Trounson. 2000. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species. *Theriogenology* 53, 400 (abstract)
- Salamon S, WM Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62, 77-111.
- Sankai T, H Tsuchiya and N Ogonuki. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55, 1759-1768.
- Sato M, A Ishikawa. 2004. Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival. *Theriogenology* 61, 1455-1469.
- Savignone C, C Tittarelli, E Arnaudín, MC Stornelli, MA Stornelli, RL de la Sota. 2004. Survival of chinchilla laniger spermatozoa stored in the epididymides at 4°C and transported in three different media. *Proceedings of the 5th International Symposium on Companion and Exotic Animals*; aug 4-6; San Pablo, Brazil. pp 261 – 262.
- Song HB, D Melican, W Gavin. 1988. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J Anim Sci* 30, 636-42.
- Songsasen N, KJ Betteridge, SP Leibo. 1997. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* 56, 143-52
- Stilley K, CE Pope, SP Leibo, et al. 2000. Survival of canine epididymal sperm stored at 4°C in the testicles. *Theriogenology* 53, 489 abstr.
- Tittarelli C, C Savignone, E Arnaudín, M C Stornelli, M A Stornelli; R de la Sota. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* «en prensa».
- Walton A. 1930. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *J Exp Biol* 201-219.
- Yonai M, M Geshi, T Nagai. 1998. The effect of storage temperature of epididymis with testes on motility of sika deer (*Cervus nippon*) and equine spermatozoa. *Tohoku J Anim Sci Technol* 47, 20-23
- Yu I, SP Leibo. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179–1190.

CONFRONTANDO LAS ZONOSIS: RELACIÓN ENTRE LA MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA

CONFRONTING ZONOSSES, LINKING HUMAN AND VETERINARY MEDICINE

Laura H. Kahn*

*Princeton University, Princeton, New Jersey, USA

Resumen

Muchas de las enfermedades infecciosas emergentes, incluyendo aquellas causadas por agentes del bioterrorismo, son zoonosis. Desde que las zoonosis pueden infectar al hombre y los animales, las comunidades médicas y veterinarias deben trabajar juntas en los campos clínicos, de salud pública y de investigación. En el campo clínico, el ingreso de ambas profesiones mejoraría la relación costo beneficio de los propietarios de mascotas, particularmente aquellos propietarios inmunocomprometidos. En la salud pública, los sistemas de vigilancia son importantes en controlar las zoonosis como la producida por el virus de la influenza aviar, el virus del oeste del Nilo y los patógenos alimentarios. La medicina comparada es el estudio de los procesos de enfermedad a través de las especies, incluyendo a los seres humanos. Las investigaciones en medicina comparada de médicos y veterinarios debe ser promovida y recomendada para estudiar la interacción hospedador parásito en las zoonosis. Los esfuerzos deben dirigirse a incrementar nuestro entendimiento sobre cómo las zoonosis expanden su rango de hospedadores y poder así mejorar la prevención y las estrategias para su control.

Abstract

Many of the emerging infectious diseases, including those caused by bioterrorist agents, are zoonoses. Since zoonosis can infect both animals and humans, the medical and veterinary communities should work closely together in clinical, public health, and research settings. In the clinical setting, input from both professions would improve assessments of the risk-benefit ratios of pet ownership, particularly for pet owners who are immunocompromised. In public health, human and animal disease surveillance systems are important in tracking and controlling zoonosis such as avian influenza virus, West Nile virus, and foodborne pathogens. Comparative medicine is the study of disease processes across species, including humans. Physician and veterinarian comparative medicine research teams should be promoted and encouraged to study zoonotic agent-host interactions. These efforts would increase our understanding of how zoonosis expand their host range and would, ultimately, improve prevention and control strategies.

Palabras clave Zoonosis- medicina humana- veterinaria

Key Words Zoonosis- human medicine- veterinary

Kahn LH. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2006 Apr [date cited]. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no04/05-0956.htm>
Reproducido de *Emerging Infectious Diseases*. CDC. Atlanta Georgia.

INTRODUCCIÓN

Las zoonosis son enfermedades que pueden transmitirse de los animales salvajes y domésticos a los humanos y pueden constituir amenazas a la salud pública mundial. Debido a que estas enfermedades provienen de los animales, la prevención y las estrategias del control necesitan ser innovadoras y requiere los esfuerzos combinados de muchos campos. Por ejemplo, se necesitan colaboraciones más íntimas entre veterinarios, médicos y profesionales de salud pública en 3 áreas: la salud individual, salud de la población y la investigación de la medicina comparativa. En la salud individual, evaluando el potencial de transmisión de la enfermedad zoonótica de los animales a los humanos debe incluir tanto a médicos y veterinarios, sobre todo para los pacientes en riesgo alto como aquellos que están inmunocomprometidos. En salud de la población, los enfermedades zoonóticas deben evaluarse sus riesgos a través de sistemas de vigilancia que incluyan al animal doméstico y silvestres y a las poblaciones humanas que ayudarían a conducir a medidas de control eficaces. Puesto que médicos y veterinarios serían los profesionales importantes en reconocer e informar brotes, reforzar las comunicaciones entre los epidemiólogos hospitalarios, veterinarios y los oficiales de salud pública locales no sólo ayudarían expeditivamente en la respuesta local, sino también ayudar en identificar si enfermedades raras o brotes que involucren a los animales y humanos son eventos relacionados o separados. En investigación, la colaboración entre médicos y veterinarios en medicina comparativa mejoraría nuestra comprensión de las interacciones de agente hospedador en las zoonosis.

Colaboración en salud individual

En el nivel de salud individual, las enfermedades zoonóticas son una preocupación para todos los que viven o trabajan con animales. Este riesgo es especialmente problemático para las personas dueños de mascotas que están inmunocomprometidos. Grant y Olsen encontraron que los médicos generalmente no están cómodos discutiendo el papel de animales en la transmisión de las zoonosis y que preferirían que los veterinarios jueguen ese papel (1). Sin embargo, la mayoría de los pacientes no ve a los veterinarios como una fuente de información para salud humana. Los autores encontraron que en sólo el 21% de pacientes con HIV preguntaron a sus veterinarios por los riesgos de salud de las mascotas de su propiedad (1).

Los riesgos zoonóticos de los animales de compañía no se limitan a aquellos que viven con HIV. Un paciente que estaba tomando infliximab para la artritis reumatoidea crónica se infectó con *Cryptococcus neoformans* después de limpiar la jaula de una cacatúa una semana antes de la hospitalización (2). La infección con el Virus de coriomeningitis linfocitaria humana (LCMV) está asociada con roedores usados como mascotas y también causa infecciones serias en personas inmunocomprometidas (3). Estos riesgos se extienden más allá de los dueños de mascotas y pueden involucrar a los destinatarios de los dueños animales que donan órganos. Por ejemplo, el LCMV ha sido responsable de las muertes de 3 destinatarios de trasplante de órganos que los recibieron de donantes que habían poseído como mascotas roedores infectados (3).

Los animales domésticos exóticos o raros pueden proponer un riesgo a la salud. La salmonellosis se desarrolló en 4 niños, 1 madre y una mujer de 80 años después de la exposición a tortugas pequeñas tenidas como mascotas (4). La salmonellosis también ha sido asociada con roedores mascotas. Por ejemplo, durante el verano de 2004, dos niños jóvenes se enfermaron gravemente de salmonellosis poco tiempo después que de sus familias compraran roedores mascotas (5). Una búsqueda nacional en PulseNet (el Banco de datos Nacional de Salmonella) de diciembre de 2003 a octubre de 2004 se encontraron 28 casos humanos con aislamiento de Salmonella enterica serovar Typhimurium. De los 22 pacientes que fueron entrevistados, 13 (59%) habían estado expuestos a roedores durante los 8 días antes del ataque de la enfermedad (5).

Los animales domésticos exóticos pueden introducir patógenos previamente desconocidos en el continente. Por ejemplo, la erupción de la viruela de los monos en el medio oeste de Estados Unidos en el 2003 se originó después que roedores africanos importados infectaron a perros de la pradera (marmotas) (6). Los laboratorios confirmaron que 35 personas desarrollaron viruela de los monos (6). Nadie murió, pero la erupción requirió la vacunación de 30 personas con la vacuna de la viruela de los monos, 23 debido a la exposición profesional potencial (6).

Los riesgos profesionales para la exposición a las enfermedades zoonóticas son una preocupación para personas como granjeros, carniceros y empleados de tiendas de mascotas que trabajen con animales. Por ejemplo el *Streptococcus suis* puede causar meningitis u ocasionalmente sepsis fulminante en criadores de cerdos (7,8) la infección por *Campylobacter* es un riesgo profesional para

empaquetadores en pollerías, y *Streptobacillus moniliformis* pueden ser un riesgo profesional para los empleados de tienda de animales domésticos (9, 10).

Estos ejemplos ilustran que vivir y trabajar con animales pueden impactar a la salud humana a nivel individual. Los veterinarios que tratan animales que se infectan abruptamente deben evaluar el riesgo zoonótico potencial y deben informar a los dueños de los animales adecuadamente. Desde el punto de vista médico legal los veterinarios están obligados a hacerlo, pero no se aclara hasta qué punto deben informar a los dueños animales y si deben asegurarse que busquen la atención médica que varía y depende de las circunstancias (11). La severidad del riesgo de enfermedad zoonótica así como el nivel de comprensión por el dueño del animal en cuestión necesitaría ser considerado (11). Por ejemplo, el veterinario puede aconsejarles meramente a las personas potencialmente expuestas que busquen atención médica o puede instar vigorosamente y asegurarse que la persona reciba atención médica inmediatamente. Sin embargo, el rol del veterinario en evaluar el riesgo potencial para la transmisión de una enfermedad zoonótica podría extenderse más allá de este nivel.

Podrían pesarse las proporciones de riesgo beneficio en una exposición animal continuada y ser discutidas por veterinarios y médicos. Los papeles en estas relaciones del veterinario/médico necesitarían ser establecidas de entrada para que los veterinarios no estuvieran en el riesgo de parecer que practican medicina humana. Por ejemplo, los veterinarios podrían proporcionar una valoración del estado de salud de un animal a un médico cuyo paciente es inmunocomprometido y aconsejar conservar o no su animal de compañía. Desde que la propiedad un animal de compañía tiene beneficios psicológicos y fisiológicos, este tipo de colaboración y cooperación entre las 2 profesiones sería inestimable a los pacientes. El veterinario proporcionaría evaluaciones regulares al animal de compañía asegurando que su estado de salud sea supervisada estrechamente. En la escena profesional, la supervisión veterinaria regular de todos los animales involucrados en la salud no puede ser posible; sin embargo, si un trabajador fuera inmunocomprometido, entonces una valoración cuidadosa debe hacerse sobre su continuación en esa línea de trabajo. La acción veterinaria podría ser útil en estas decisiones difíciles. Talleres de trabajo conjunto entre médicos y médicos veterinarios en los riesgos de zoonosis a salud humana podrían ayudar a forjar lazos y facilitar oportunidades de establecer estos tipos de esfuerzos colaboradores.

Colaboraciones de Salud de la población

El reconocimiento de si las erupciones humanas y animales fueran simultáneas brindaría información importante, identificando los patógenos causales y el desarrollo de estrategias de manejo. Por ejemplo, los médicos que trataban a los pacientes en la Ciudad de Nueva York en 1999 infectados con el virus del Nilo Oriental (WNV) podrían haber sido beneficiados si hubieran sabido que durante el mes anterior y concurrentemente, los veterinarios en el área circundante habían estado viendo docenas de cuervos agonizantes con síntomas neurológicos similares a aquéllos de los humanos afectados (12). Dependiendo del estado, la vigilancia de la enfermedad animal puede fragmentarse. Por ejemplo, en Nueva York, la rabia humana y animal son responsabilidad de secciones de salud locales y estatales, el ganado es vigilado por la agencia de agricultura estatal y la fauna es responsabilidad de la agencia medioambiental estatal (12).

Ninguna agencia local o estatal asumió la plena responsabilidad por la fauna muerta en la investigación en 1999 en Nueva York, ya que no estaba inicialmente clara cuál era la agencia responsable (12). Esta situación impedía comunicaciones entre los veterinarios, oficiales de salud pública, y los médicos que estaban involucrados en la respuesta del brote a nivel local. Como en una emergencia la medida a corto plazo sería que los veterinarios pudiesen expresar sus preocupaciones directamente al epidemiólogo del hospital, entonces estos podrían estar al acecho de un posible impacto humano de una enfermedad desconocida que estaba causando amplios síntomas neurológicos y muerte en pájaros salvajes. Tal comunicación rápida, directa entre veterinarios y médicos epidemiólogos podría ser particularmente importante en estados en los que las agencias de salud públicas locales o no existen o no están involucrados en enfermedades zoonóticas informadas o en investigación.

En algunos estados, la información de una enfermedad animal y su respuesta son funciones a nivel estatal y está separada de la salud pública humana. Las agencias estatales con secciones de agricultura, ambiente, o de salud animal son los destinatarios primarios usuales de los informes de enfermedad animal. Sin embargo, estas agencias no pueden tener los recursos para dirigir prevención de la enfermedad animal y actividades de manejo a nivel local. Además, en el caso de secciones de agricultura, su misión, históricamente, ha sido promover la agricultura, no necesariamente para

controlar enfermedades infecciosas en todos los tipos de animales. Un mecanismo para mejorar la comunicación y colaboración por las agencias estatales, como entre el estado y la salud animal y los veterinarios de salud pública, sería importante que los veterinarios preferencialmente informaran a más a las agencias estatales “centradas en el animal”.

Además de trabajar con oficiales estatales durante los brotes de zoonosis serias, los veterinarios deben comunicar también y deben colaborar con oficiales de salud pública local. Durante la erupción del WNV (virus del oeste del Nilo) en 1999, los diagnósticos presuntos para los casos humanos iniciales incluyeron el síndrome de Guillain-Barré, encefalitis, meningitis y neumonía por aspiración (14). Los oficiales de salud pública asumieron que la causa de la erupción era la Encefalitis de San Luis (SLE) hasta que una patóloga veterinaria en el Parque zoológico de Bronx relacionó las erupciones animales y humanas (12). Ella consideró que la corneja (especie de cuervo) y otros pájaros ordinariamente resistentes al SLE estaban enfermando, por lo que el agente SLE no era probablemente la causa. Su trabajo ayudó a la fase para el descubrimiento de WNV en el Hemisferio Occidental (12).

Al nivel de la población, los patógenos zoonóticos causan brotes de enfermedades alimenticias, de origen hídrico, y mediada por artrópodos. Estos patógenos incluyen *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Cryptosporidium*, virus de fiebre amarilla, y *Borrelia burgdorferi* (15). Muchos de los agentes del bioterrorismo en la categoría A, B, y C, como el *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, y virus de Nipah, causan zoonosis (16,17).

La magnitud del problema de las zoonosis ilustra por qué los esfuerzos de la medicina, medicina veterinaria y la salud pública necesitan superponerse. Taylor y otros identificaron a 1.415 agentes infecciosos y encontraron que 868 (61%) podrían transmitirse entre los animales y humanos (18). Ellos encontraron que las enfermedades zoonóticas eran dos veces más probables de estar asociadas como emergentes o como infecciones recientemente descubiertas que los patógenos no zoonóticos. Los virus y protozoarios probablemente eran los patógenos zoonóticos más probables. En particular los virus ARN, muy probablemente serán identificados como emergentes (19). Estos agentes incluyen el WNV, el virus de influenza de aviaria, el hantavirus y el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo.

La unión de vigilancia de brotes de enfermedades zoonóticas animales y humanas ya está

brindando beneficios mundialmente. Por ejemplo, el reconocimiento del primer caso humano de influenza aviaria H5N1 en Hong Kong en 1997 fue facilitado por la vigilancia de patos, gansos y pollos en China del sur durante las décadas precedentes (20). En el frente doméstico, en 1999, los Centers for Disease Control and Prevention crearon ArboNET, un sistema de vigilancia cooperativo que supervisa la difusión geográfica de WNV en humanos, mosquitos, pájaros y otros animales en respuesta al brote de la enfermedad WNV (21). ArboNET ha mantenido un sistema inestimable rastreando la cobertura de la enfermedad y severidad en los Estados Unidos, identificando la actividad inicial del WNV, y justificando continuar con el apoyo para el control del mosquito (22). Deben continuarse estos tipos de sistemas de vigilancia y deben extenderse para incluir otras serias enfermedades zoonóticas como la peste y la tularemia.

Colaboraciones de Investigación en medicina comparativa

La necesidad de médicos y veterinarios de trabajar para controlar las zoonosis se extiende más allá del marco de salud individual y de población juntas y debe incluir colaboraciones en investigación en medicina comparativa. La medicina comparativa es el estudio del anatómico, fisiológico y el patofisiológico a través de las especies, incluyendo a los humanos. Se presta considerable atención a las enfermedades infecciosas, específicamente el estudio de interacciones del hospedador-agente.

Como una disciplina académica, la medicina comparativa no es nueva; la primera referencia en ella se estableció en 1862 en Francia (25). El campo tiene una historia ilustre. En 1893, Theobald Smith, médico, y F.L. Kilbourne, un veterinario, publicaron el papel que establece al agente infeccioso, la *Babesia bigemina*, como la responsable de la fiebre del ganado, que fuera transmitido por un vector artrópodo (25). Su trabajo ayudó a la fase para el descubrimiento de Walter Reed de la transmisión de la fiebre amarilla (25). Otro equipo de médicos y veterinarios, los Drs. Rolf Zinkernagel y Peter C. Doherty, ganaron el 1996 Premio de Nobel en fisiología/medicina por sus descubrimientos de cómo el sistema inmune distingue células normales de las células infectadas por un virus (26).

Estos 2 ejemplos ilustran que la medicina y la medicina veterinaria son complementarias; son sinérgicas generando nuevas visiones científicas para las especies. En esencia, las 2 disciplinas per-

sonifican la filosofía de la medicina comparativa. Y todavía, como sociedades necesitan crecer, tener científicos, trabajar entender y controlar zoonosis emergentes juntos, la evidencia sugiere que la próxima generación de científicos médicos y veterinarios médicos no estarán colaborando entre sí. La investigación en medicina biomédica y comparativa está perdiendo su apelación como una carrera entre médicos y veterinarios.

En el lado del médico, la disminución de médicos científicos es evidenciado a través de varias tendencias. Las facultades y escuelas médicas comprenden ahora 25% menos médicos científicos que hace 20 años (28).

Para los veterinarios científicos, la situación es considerada terrible. El informe de la Academia Nacional de Ciencias (NAS) en 2004 encontró que los miembros de la Asociación Médicos Veterinarios americana, < 1% fueron certificados en laboratorio de medicina animal y < 2% fueron certificados en patología (29).

Las razones para la falta de interés en investigación son similares para los estudiantes médicos y veterinarios: un énfasis en el cuidado clínico, deuda educativa, y una falta de mentores y oportunidades de investigación (30,31). Las escuelas médicas dan énfasis al cuidado primario ahora y quieren el servicio insuficiente y mientras ciertamente importante, este cambio en prioridades ha estado en el gasto de animar carreras de la investigación biomédicas.

Las escuelas veterinarias han cambiado su enfoque de la investigación de la medicina comparativa y medicina del ganado a la medicina animal de mascotas para cubrir la demanda social (32). Sin embargo, similar a la situación con las escuelas médicas, este cambio ha causado menor número de estudiantes veterinarios que siguen carreras de investigación. Además, los programas de medicina comparativos han estado cambiando de una investigación para limitar la orientación de veterinarios en el desenvolvimiento de la investigación a ser principalmente consejeros para los animales del laboratorio (32). Este cambio en orientación de la medicina comparativa ha descorazonado a muchos estudiantes veterinarios de seguir carreras en investigación y ha impedido la investigación en zoonosis de diversos animales hospedadores.

¿Qué puede hacerse? Aunque el NIH ha empezado un mapa de ruta para mejorar la investigación biomédica en el siglo 21, en ninguna parte se hace mención del plan de la medicina comparativa y la importancia de rol del veterinario que encajaría ciertamente en sus metas de promover investigación interdisciplinaria y las nuevas sendas al descubrim-

iento (33). Un informe de NAS reconoce la necesidad por la iniciativa del mapa de ruta de dirigirse a este problema y recomienda crear investigación veterinaria integrada a través de una interagencia unida para los programas colaboradores del NIH (34). Animar a la graduación de más veterinarios que sigan carreras en investigación son críticos si las sociedades serán desarrolladas.

DISCUSIÓN

Desde que las enfermedades zoonóticas son de los animales que pueden infectar a los humanos, los veterinarios, los médicos y los oficiales de salud pública necesitan trabajar más estrechamente unidos para controlar, prevenir y entenderlos. En la salud individual, la entrada en colaboración de veterinarios y médicos ayudaría a evaluar las zoonosis potenciales de un paciente y su riesgo de enfermar ante una exposición animal. Para los pacientes inmunocomprometidos de alto riesgo, estos esfuerzos de colaboración podrían ser tremendamente importantes, no sólo para su bienestar personal sino también para su subsistencia.

Con respecto a salud de la población, la declaración de la información de las enfermedades animales varía considerablemente del estado. Algunos estados tienen una agencia responsable para toda enfermedad animal, mientras otros se reparten los informes entre las varias agencias. Sin embargo, en muchos estados, la vigilancia de la enfermedad animal parece ser principalmente una función a nivel estatal. En algunas declaraciones, se esperan de agencias de salud públicas locales recibir información de enfermedades zoonóticas directamente de los veterinarios. Si el control de las enfermedades zoonóticas deberá ser mejorada, se necesitará mayor comunicación y colaboración entre veterinarios, médicos y oficiales de salud pública al nivel local. Un informe de la NAS recomienda un mecanismo nivelado federal para promover colaboración mayor entre todos los jugadores involucrados en salud animal (13); los mecanismos similares también podrían ser considerados en estados.

Unir los esfuerzos de la vigilancia de la enfermedad que han demostrando ser sumamente útil en el rastreo de zoonosis que incluyen redes electrónicas de información para la vigilancia, para la Resistencia de Antimicrobianos Nacional, y para la vigilancia población basado de patógenos alimenticios (36, 37). Estos programas deberían establecerse y verse apoyados y nuevos programas de vigilancia para otras zoonosis deben seriamente

ser desarrolladas. Las escuelas de salud médicas, veterinarias y públicas deben ofrecer cursos en riesgo zoonótico a salud humana que integra todas las 3 perspectivas.

La sociedad se beneficiaría si más proyectos de investigación compartiva de medicina fueran dirigidos por médicos y veterinarios para investigar interacciones de agente-hospedador en las zoonosis. Entre las muchas maneras de promover estos proyectos es patrocinar fondos de investigación multiagencias de medicina comparativas y más entrenamiento concedida a los veterinarios interesados en carreras en investigación. Estos esfuerzos aumentarían nuestra comprensión de cómo las zoonosis expanden su rango del hospedador y habría, finalmente, mejores prevenciones y estrategias de control.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a Nina Marano sus inestimables comentarios y sugerencias.

La investigación para este trabajo fue apoyada por el Josiah Macy Jr. Foundation of New York City.

Dr Kahn es internista general y miembro del personal de investigación en el Programa en Ciencia y Seguridad Global en la Escuela Pública y Asuntos Internacionales de Woodrow Wilson, Universidad de Princeton. Sus intereses de investigación incluyen política de salud pública y preparación de la emergencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grant S, Olsen CW. Preventing zoonotic diseases in immunocompromised persons: the role of physicians and veterinarians. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:159–63.
2. Shrestha RK, Stoller JK, Honari G, Procop GW, Gordon SM. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab: possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. *Respir Care*. 2004;49:606–8.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Update: interim guidance for minimizing risk for human lymphocytic choriomeningitis virus infection associated with pet rodents. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:799–801.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonellosis associated with pet turtles—Wisconsin and Wyoming, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:223–6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* associated with rodents purchased at retail pet stores—United States, December 2003–October 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:429–33.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate

outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2003;52:642–6.

7. Perseghin P, Bezzi G, Troupioti P, Gallina M. *Streptococcus suis* meningitis in an Italian blood donor. *Lancet*. 1995;346:1305–6.
8. Bartelink AK, van Kregten E. *Streptococcus suis* as threat to pigfarmers and abattoir workers. *Lancet*. 1995;346:1707.
9. Wilson IG. Airborne *Campylobacter* infection in a poultry worker: case report and review of the literature. *Commun Dis Public Health*. 2004;7:349–53.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Fatal rat-bite fever Florida and Washington, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;53:1198–202.
11. Tannenbaum J. Medical-legal aspects of veterinary public health in private practice. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1991;6:175–85.
12. US General Accounting Office. West Nile virus outbreak. Lessons for public health preparedness. Washington: The Office; 2000. GAO/HEHS-00-180.
13. National Academy of Sciences. Animal health at the crossroads: preventing, detecting, and diagnosing animal diseases. Washington: National Academy Press; 2005.
14. Asnis DS, Conetta R, Teizeira AA, Waldman G, Sampson BA. The West Nile outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience. *Clin Infect Dis* 2000;30:413–8.
15. Chomel BB. New emerging zoonoses: a challenge and an opportunity for the veterinary profession. *Comp Immunol Microbiol. Infect Dis*. 1998;21:1–14.
16. Davis RG. The ABCs of bioterrorism for veterinarians, focusing on category A agents. *J Am Vet Med Assoc*. 2004;224:1084–95.
17. Davis RG. The ABCs of bioterrorism for veterinarians, focusing on category B and C agents. *J Am Vet Med Assoc*. 2004;224:1096–104.
18. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans. R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:983–9.
19. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:991–9.
20. Shortridge KF, Peiris JSM, Guan Y. The next influenza pandemic: lessons from Hong Kong. *J Appl Microbiol*. 2003;94:70S–9S.
21. Marfin AA, Peterson LR, Eidson M, Miller J, Hadler J, Farell C, et al. Widespread West Nile virus activity, eastern United States, 2000. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:730–5.
22. O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, et al. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2004;4:61–70.
23. Belay ED, Maddox RA, Williams ES. Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:977–84.

24. Castillo-Olivares, J, Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res.* 2004;35:467–83.
25. Wilkinson L. *Animals and disease. An introduction to the history of comparative medicine.* Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1992.
26. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature.* 1974; 251:547–8.
27. Rosenberg LE. Physician-scientists—endangered and essential. *Science.* 1999;283:331–2.
28. Varki A, Rosenberg LE. Emerging opportunities and career paths for the young physician-scientist. *Nat Med.* 2002;8:437–9.
29. National Academy of Sciences. *National need and priorities for veterinarians in biomedical research.* Washington: National Academy Press; 2004.
30. Neilson EG. The role of medical school admissions committees in the decline of physician-scientists. *J Clin Invest.* 2003;111:765–7.
31. Barthold SW. Biomedical research and veterinarians: where's Waldo? *Comp Med.* 2002;52:95–6.
32. Barthold SW. Musings of a Connecticut Yankee in King Arthur's court: antemortem analysis of the veterinary profession. *J Vet Med Educ.* 2005;32:306–13.
33. Zerhouni E. The NIH roadmap. *Science.* 2003;302:63–72.
34. National Research Council. *Critical needs for research in veterinary science.* Washington: National Academy Press; 2005.
35. National Institute of General Medical Sciences. *Training and Careers.* [cited 2006 Jan 23]. Available from http://www.nigms.nih.gov/funding/trngmech.html#new_emphasis
36. Centers for Disease Control and Prevention. *NARMS website.* [cited 2006 Jan 23]. Available from <http://www.cdc.gov/narms/>
37. Centers for Disease Control and Prevention. *FoodNet website.* [cited 2006 Jan 23]. Available from <http://www.cdc.gov/foodnet/>

OTITIS EXTERNA CANINA APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO

CANINE EXTERNAL OTITIS APPROACH TO THE DIAGNOSIS

Dragonetti A.M. *, Broglio G.**

* Clínica de Pequeños Animales

** Hospital Escuela

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

adragon@fcv.unlp.edu.ar

gbroglio@fcv.unlp.edu.ar

Resumen *La presentación del presente trabajo tiene como objetivo una revisión y planificación diagnóstica de la otitis externa canina. De etiología variada y con diferentes formas de presentación, exigen, en la práctica diaria, una permanente actualización y búsqueda de recursos terapéuticos a fin de aliviar y/o curar a los pacientes.-*

Abstract *The presentation of the present work has as objective to make a revision on the physiopathology and planning diagnoses of the canine external otitis in, the whose consequences, varied etiologies, and presentation forms demand, actually daily one, a permanent update and knowledge of the techniques you diagnosis more suitable and modern than they allow us to define the problem clearly, for soon from a correct use of the therapeutic resources, to manage to alleviate and or to cure to the patients.*

Palabras clave Canino- Oído-Inflamación

Key Words Canine - Ear - Inflammation

INTRODUCCIÓN

La otitis canina representa un desafío al cual nos enfrentamos a diario los que practicamos la clínica de pequeños animales, dado la multiplicidad de causas y factores que propician su aparición indiscutiblemente debemos estar muy atentos durante el examen físico el cual debe responder a los principios generales de toda evaluación y solicitar los métodos complementarios orientados hacia las diferentes etiologías que dan inicio a la enfermedad ótica.

La otitis externa (OE) se define como la inflamación de la piel del conducto auditivo externo, pudiendo presentarse en un 5 a 20% de los pacientes caninos. El 50% de los casos son crónicos y la membrana timpánica puede encontrarse lesionada posibilitando la extensión de la infección dentro del oído medio (3).

En ocasiones, también está involucrado el pabellón auricular. Desafortunadamente muchos casos de OE no se resuelven y cada vez se hacen más refractarios a los tratamientos pudiendo transformarse en una otitis crónica, enfermedad complicada, provocada muchas veces por una etiología multifactorial en cuyo caso se hace imprescindible realizar una evaluación metódica y completa del paciente que derivará en la implementación de medidas terapéuticas específicas y seguras.

PREVALENCIA Y GRUPO DE RIESGO

Tanto la raza como la edad tienen poca incidencia en la enfermedad, aunque la edad de presentación más frecuente es entre los 5 y 8 años y respecto a las razas el Ovejero Alemán es uno de los más afectados.

Por causas anatómicas, estrechez del conducto auditivo externo (CAE), orejas péndulas y mucho pelo a la entrada del conducto la presentación en Cocker, Caniches y Pekineses son frecuentes. Los perros de caza, Pointer, Bracco, Terriers, también están predispuestos a la enfermedad sobre todo los que rescatan las presas en el agua al mantener mojado el CAE o bien por que están predispuestos a la presencia de cuerpos extraños.

Esta población padece con más frecuencia enfermedades por hipersensibilidad y trastornos de la queratinización por lo tanto la alta incidencia de enfermedades auriculares puede estar reflejando la prevalencia de enfermedades generalizadas de la piel que padece este grupo etario. No parece existir predilección de sexo para esta enfermedad (1).

ESTRUCTURA DEL OIDO EXTERNO

Un breve repaso de la anatomía del oído nos permitirá realizar facilitar el examen físico y de esta forma optimizar el diagnóstico.

Los componentes anatómicos básicos del oído canino son:

Aurícula o pabellón auricular

Conducto auditivo o meato auditivo externo

Membrana timpánica

El oído externo (OE) está formado por tres cartílagos clásicos: auricular, anular y escutiforme.

- El cartílago auricular es una lámina delgada y fácilmente plegable en su extremidad distal y más gruesa y menos plegable en su extremo proximal, donde presenta la base muy convexa terminándose en una especie de tubo espiralado.

- El cartílago anular es una lámina triangular enrollada sobre ella misma, constituyendo un tubo largo y estrecho que penetra en el interior de la base del cartílago auricular, por un lado, y se fija por el otro extremo sobre el tubo óseo.

- El cartílago escutiforme es cuadrado descansando en posición medial respecto al cartílago auricular dentro de los músculos auriculares que se insertan en la cabeza

Los cartílagos anular y auricular forman el conducto auditivo externo y el cartílago auricular se expande para formar el pabellón de la oreja. El pabellón de la oreja cumple con la función de localizar y recoger las ondas de sonido y transmitir las a la membrana timpánica sin embargo también tiene una función mímica y en menor medida de defensa. La oreja se mueve por la acción de tres grupos de músculos (rostral, ventral y caudal), innervados por ramas del nervio facial. La inervación sensitiva del pabellón auricular y del CAE proviene de 4 nervios: trigémino, facial, vago y segundo cervical

La forma y el tamaño del OE presentan importantes variaciones entre las diferentes razas caninas, en especial el cartílago auricular dándole a las orejas distintas características.

El CAE canino tiene entre 2 y 10 cm de longitud y entre 5 y 10 mm de ancho según la edad, tamaño y raza del perro y finaliza en la parte proximal de la membrana timpánica. Posee una porción inicial vertical que se puede extender hasta 2,5 cm. Tiene una dirección ventral y ligeramente rostral antes de curvarse para formar un conducto horizontal más corto, que tiene dirección medial y forma la porción horizontal del CAE.

La porción vertical y la mayor parte de la horizontal son cartilaginosas, pero la porción más profunda es ósea.

El conducto auditivo (CA) está recubierto por piel, ligeramente modificada con respecto al tegumento que contiene glándulas sebáceas y ceruminosas, y folículos pilosos. Las ceruminosas son glándulas sudoríparas tubulares apócrinas modificadas. Las secreciones combinadas de las glándulas sebáceas y ceruminosas forman el cerumen conjuntamente con las células de descamación.

Este cumple dos funciones protege al CAE al inmovilizar los objetos extraños y mantiene la membrana timpánica húmeda y flexible(4, 6).

FISIOPATOLOGÍA

La inflamación dentro del CAE por cualquier etiología redundante en alteraciones del canal, en ocasiones haciéndose crónica, las glándulas se agrandan (hiperplasia) y producen un exceso de cerumen. Se produce un engrosamiento epidérmico y dérmico (fibrosis) los pliegues del canal engrosados reducen de manera efectiva el diámetro de aquel que llega a estenosarse por completo.

La calcificación del cartílago auricular es un evento terminal la inflamación crónica.

La otitis media a menudo proviene de la extensión de una otitis externa a través de una ruptura en la membrana timpánica. La otitis media primaria puede presentarse a partir de los pólipos o neoplasias dentro del oído medio o bien infecciones que llegan a través de la trompa de Eustaquio (7). Rara vez la causa es hematológica.

CLASIFICACIÓN

Por tradición se han clasificado las OE como de naturaleza reactiva o infecciosa aunque esta tipificación no es adecuada para describir la etiopatogenia de la enfermedad por lo tanto es preferible clasificar los casos de OE basándose sobre los factores causales identificados, las alteraciones patológicas y a la infección bacteriana secundaria detectada.

Otra clasificación es de acuerdo a su evolución en agudas, subagudas y crónicas, siendo en estas últimas las más frecuentes las purulentas, las indurativas y las ulcerosas.

Muchos son los factores que contribuyen al desarrollo de OE.

Llamaremos primarios a aquellos específicos que inducen en forma directa a la OE; predisponentes a aquellos que colocan al paciente en riesgo de padecer la enfermedad y perpetuantes a aquellos que impiden la resolución del problema (1).

ANAMNESIS

Debemos partir del principio que la anamnesis debe involucrar un detallado y completo interrogatorio de todos los sistemas y aparatos así como una historia biopatográfica de enfermedades pasadas, planes de vacunación, higiene y desparasitación.

Cada día adquiere mayor relevancia la información que se obtiene a través de la misma en especial cuando se trata de casos crónicos.

Los datos específicos deben cubrir un amplio espectro obteniendo información acerca de: hábitos de vida, evolución del proceso, lugar de inicio de las lesiones, exposición a climas extremos, contacto con otros animales, antecedentes de prurito, o enfermedades dermatológicas, desequilibrios metabólicos, trastornos por hipersensibilidad, tratamientos previos, antecedentes familiares, frecuencia de los baños, sustancias usadas en los mismos, caída del

pelo, frecuencia, duración y características de los ciclos esterales y de preñeces y pseudogestaciones (5).

El signo más común y temprano de OE es el prurito aural o las sacudidas de la cabeza. A medida que progresa la otitis se genera un exudado leve a marcado. Muchas veces es necesario definir si el prurito o la secreción fue el signo más primitivo. Cuando la causa primaria es una reacción de hipersensibilidad, el canal auricular parece normal o tiene eritema restringido al pabellón.

Los cuerpos extraños a menudo comienzan con prurito antes de la aparición de un exudado.

Las parasitosis a menudo se inician con prurito pero son más variables.

Los defectos de queratinización, alteraciones glandulares, virosis y enfermedades autoinmunes suelen cursar con secreciones ceruminosas o escamosas antes de que aparezca el prurito. El olor puede ser descubierto en el curso temprano de la afección. Muchos casos, anteriormente diagnosticados como oído de nadador, en realidad son perros atópicos.

EXAMEN DEL CAE

La enfermedad ótica es una de las dolencias caninas observadas con mayor frecuencia en la práctica veterinaria. Entre el 15 y el 20% de los pacientes caninos tienen alguna clase de enfermedad ótica desde eritema leve hasta otitis media grave. Debemos observar la simetría de los pabellones, integridad de los mismos, su temperatura y estructura al igual que la presencia de costras de sangre o pus.

La piel normal del CA debe tener una coloración rosada con pequeños vasos sanguíneos superficiales visibles. La superficie debe ser brillante a causa de las pequeñas cantidades de cerumen que recubren el epitelio. Es común hallar pelos a la entrada del CAE.

El CA canino exhibe una curvatura suave de alrededor de 75 grados entre la porción vertical y la horizontal.

Si es necesario se tranquiliza el animal. El CAE se puede inspeccionar a simple vista o con lentes de magnificación ayudado con una linterna de punto o bien con el otoscopio.

Se debe efectuar una tracción suave del pabellón auricular en dirección ventral; en esta maniobra el CA se endereza porque el cartílago subyacente es normal y blando. El cono del otoscopio se debe hacer avanzar dentro de la porción horizontal a medida que se alinea el CA (2, 8).

EXAMEN FÍSICO

Eritema, tumefacción, descamación, costras, alopecia, pelos quebrados, actitud cefálica esquiva y dolor a la palpación del cartílago auricular junto con los otomatomas y dermatitis húmeda son algunos de los signos más comunes.

La palpación del canal auditivo nos permite determinar el espesor, firmeza, y flexibilidad de los canales vertical

Tabla 1 Factores predisponentes

CONFORMACIÓN	Canales estenóticos Pelos en los canales Orejas péndulas Pabellones auriculares cóncavos pilosos
ANATOMÍA DEL CAE	Labrador Retrievers Cocker Spaniels Ovejero Alemán Shar Pei Caniche Airedale Terrier
HUMEDAD EXCESIVA	Oído del nadador Climas de humedad elevada
DEFECTOS TERAPÉUTICOS	Traumatismos por hisopados Tópicos irritantes Infecciones por alteración de la microflora normal
OTOPATÍA OBSTRUCTIVA	Neoplasias Pólipos Atresia congénita Inflamación proliferativa Tumefacción extraluminal
ENFERMEDAD SISTÉMICA	Inmunosupresión/virus Debilidad Estados catabólicos negativos

y horizontal, así como la presencia de dolor. Los canales más gruesos, firmes y rígidos se asocian con cambios proliferativos y sugieren un pronóstico más reservado. Los canales calcificados rara vez se normalizan o se tratan con éxito mediante terapia médica. El dolor a la palpación de la articulación temporomandibular y región de la ampolla timpánica denota la presencia de otitis media.

El eritema de la zona cóncava del pabellón con una parte convexa normal, es muy sugestivo de atopía o con menor probabilidad de alergia alimentaria.

EXAMEN CITOLÓGICO DE LOS EXUDADOS

La evaluación citológica de los exudados de los oídos (Tinción 15 – Laboratorio Biopur - Argentina) nos brinda información inmediata sobre la respuesta inflamatoria, presencia de ectoparásitos, levaduras y tipo de microorganismos presentes en el canal auditivo (cocos o bacilos) y si realizamos la tinción de Gram de la muestra diferenciaremos el tipo de bacteria si son Gram positivo o negativo (8).

CULTIVO Y ANTIBIOGRAMA

Es el procedimiento indicado aunque eventualmente lo reservamos para los casos crónicos en los que se requiere la identificación del germen y evaluar su sensibilidad a los antibióticos por la sospecha de posibles resistencias y para cuando existe la sospecha de otitis media. En opinión de los autores sería una alternativa para utilizar en pacientes crónicos y no en todos los casos de otitis, en la mayoría de los cuales con la utilización de la citología y tinción de Gram los datos que se obtienen son suficientes para instaurar una terapéutica adecuada.

EXAMEN OTOSCÓPICO

Se emplea para detectar cuerpos extraños, determinar si hay otitis media y valorar que tipo de lesiones, exudados y cambios patológicos progresivos han ocurrido. También se debe determinar el grado de estenosis porque las alteraciones del tamaño luminal pueden contribuir a supervisar el tratamiento. El tipo de secreción puede ser un indicio sobre los factores primarios o perpetuantes intervinientes.

Los detritos que parecen granos de café secos son típi-

Tabla 2. Causas primarias

<u>CAUSAS PRIMARIAS</u>	
PARÁSITOS	Otodectes cynotis Demodicosis Sarna sarcóptica Sarna notoédrica Otobius megnini Eutrombicula aldreddugesi
MICROORGANISMOS	Dermatofitosis Sporothrix schenckii
HIPERSENSIBILIDADES	Atopia Alergia alimentaria Contacto Reacciones medicamentosas Dermatitis alérgica por picadura de pulgas
DESÓRDENES DE LA QUERATINIZACIÓN	Seborrea idiopática primaria Hipotiroidismo Desequilibrio de hormonas sexuales Producción anormal de cerumen Cuerpos extraños Pelos que impiden la aeración
ALTERACIONES GLANDULARES	Hiperplasia apócrina Hiper o hipoplasia sebácea Alteración del volumen secretorio Secreciones modificadas
ENFERMEDADES AUTOINMUNES	Lupus eritematoso Pénfigo foliáceo Pénfigo eritematoso
VIROSIS	Virus de moquillo canino

cos de otocariasis. La secreción marrón húmeda tiende a relacionarse con cocos y levaduras. Los exudados purulentos cremosos o amarillos son más comunes en las infecciones con gramnegativos, los detritos céreos grasientos, amarillos a pardos son típicos de la otitis ceruminosa a veces observada con la Malassezia. Las secreciones ceruminosas a menudo aparecen en los desórdenes alérgicos crónicos glandulares y de la queratinización (3).

En los últimos años se ha puesto a punto en nuestro país una técnica diagnóstica innovadora como lo es la otoendoscopia, que permite, fundamentalmente por la amplificación y nitidez de las imágenes que se logran, visualizar claramente las estructuras normales y los cambios patológicos del oído externo y fundamentalmente las alteraciones que se pueden producir a nivel de la membrana timpánica (2, 9, 10).

Respecto a la otitis media se puede diagnosticar mediante el otoscopio, observando la ruptura de la membrana timpánica o bien la convexidad de la misma y el cambio de coloración de rosa a morado. Generalmente la ruptura o perforación del tímpano es indicativo de otitis media

Si no contamos con un otoscopio podemos hacer uso

de la aguja de Spreull o un instrumento similar de punta roma. Si la membrana timpánica está rota oiremos un ruido que se produce al chocar el metal con la pared opuesta de la bulla. A través de la radiografía simple o contrastada evaluamos el contenido de la bulla timpánica que normalmente es radio lúcida, transformándose en radio densa por su contenido purulento. Además, en la otitis media las paredes de la bulla se encuentran engrosadas.

Para lograr el contraste se inyectaba en el CAE una solución aceitosa (lipiodol). Si la membrana timpánica se halla rota la imagen radiográfica muestra el pasaje de la sustancia opaca a la cavidad timpánica. Esta técnica se halla superada por el uso de otoendoscopia.

TRATAMIENTO

Aunque el tratamiento no se corresponde con el objetivo de este artículo, creemos que es oportuno comentar que consideramos que debería basarse en un método simple y lógico, que se podría resumir en los siguientes pasos:

1. Limpieza del/los oído/s con soluciones no ototóxicas y de ser posible bajo sedación o anestesia general según la gravedad del caso.

Tabla 3. Factores perpetuantes

**FACTORES
PERPETUANTES**

BACTERIAS

Staphylococcus intermedius
Proteus spp
Pseudomonas spp
Escherichia coli
Klebsiella spp

LEVADURAS

Malassezia pachydermatis
Cándida albicans
Varios

**CAMBIOS
PATOLÓGICOS
PROGRESIVOS**

Hiperqueratosis
Acantosis
Pliegues epiteliales
Edema
Hipertrofia y/o hiperplasia de glándulas apócrinas
Hidradenitis
Fibrosis
Calcificación

OTITIS MEDIA

Purulenta simple
Caseosa/queratinosa
Colesteatoma
Proliferativa
Osteomielitis destructiva

2. Tratamiento local con las soluciones tópicas adecuadas para cada caso, basándonos inicialmente en los resultados del examen clínico general, la otoscopia y el examen citológico de los exudados.

3. Tratamiento con antibióticos sistémicos y/o glucocorticoides orales en los casos que así lo requieran.

4. Tratamiento de las posibles complicaciones: estenosis del conducto auditivo externo y otitis media.

5. Cirugía, para disminuir el dolor y permitir un mejor drenaje del conducto auditivo externo.

BIBLIOGRAFÍA

1.- August JR. Otitis Externa En August JR. Enfermedades Del Oido. En Clinicas Veterinarias de Norteamérica Practica en pequeños animales Ed Intermédica Buenos Aires 1993 p 1 a 14

2.--Broglia GC y col. Otoendoscopia en caninos-Primera etapa. Publicado en los Resúmenes del 5º Congreso Nacional de AVEACA, Buenos Aires, Argentina.8, 9 y 10 de Julio de 2005.

3.-Broglia GC y col. Otoendoscopia en caninos – Segunda etapa. Publicado en los Resúmenes del 6º Congreso Nacional de AVEACA,

4.- Gotthelf LN. Examen del conducto auditivo externo En Gotthelf LN. Enfermedades Del Oido En Animales De Compañía Ed Intermédica Buenos Aires 2001 p 26 a 44

5.- Griffin CE. Otitis externa y media . En Griffin CE, Kwochka KW, Macdonald JM. Enfermedades Dermatológicas del Perro y el Gato Ed Intermédica Buenos Aires. 1994 p 289-310

6.- Kumar A, Margo RR. Anatomía del oído canino y felino. En Gotthelf LN. Enfermedades del oído en animales de compañía Ed Intermédica Buenos Aires 2001 p 2 a 23

7.- Rosser, EJ. Evaluación del paciente con otitis externa en August JR. Enfermedades del oido Clinicas Veterinarias de Norteamérica Práctica en pequeños animales Ed Intermédica Buenos Aires 1993 p 41 a 49

8.-Scott DW, Miller W, Griffin C. En Muller & Kirk. Dermatología en pequeños animales 6º Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires 2002. Cap.19 pág. 1251 a 1281

9.- Venker-Van Haagen, Gajentaan JE. Examen de las orejas en Rijnberk A. De vries HW. Anamnesis y exploración corporal de pequeños animales Ed Acribia Zaragoza España 1991 p 288 a 294

10.- Wermer AH .Otitis externa en Tilley LP, Francis WK, Smith (H) Mac Murray CMA. La consulta veterinaria en cinco minutos . Canina y felina. Ed Intermédica Buenos Aires 1998. p 938 a 943

LEPTOSPIROSIS HUMANA: ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y AISLAMIENTOS DE CEPAS DE CANINOS A RAIZ DE UN CASO FATAL

HUMAN LEPTOSPIROSIS: EPIDEMIOLOGIC STUDY AND ISOLATION OF A STRAIN OF FATAL CASE FROM DOGS

R Caminoa¹, D Pássaro¹, V Schamunn¹, JC Garcia²,
N Fernandez³, ND Di Croce³

¹Laboratorio Central de Salud Pública Provincia de Buenos Aires,

²Hospital de Magdalena, ³Zoonosis de municipalidad de Magdalena.

Resumen *La Leptospirosis es una zoonosis de gran difusión en el mundo producida por bacterias del género Leptospira. Dichas bacterias pertenecen taxonómicamente al orden Spirochaetales y presentan tres características esenciales: disposición helicoidal del citoplasma alrededor de un filamento axial, extrema flexibilidad y gran movilidad. El hombre es un hospedador accidental y final de la cadena epidemiológica pues la transmisión directa de persona a persona es rara. Las manifestaciones clínicas en los individuos afectados varían desde casos inaparentes hasta casos mortales. La enfermedad cursa con fiebre repentina, cefaleas escalofríos, mialgias, especialmente en las pantorrillas y muslos, con inyección conjuntival. Este cuadro puede agravarse, dando insuficiencia hepatorenal, trastornos meníngeos y respiratorios, hemorragias y muerte. El objetivo de este trabajo es informar las acciones realizadas y los resultados obtenidos a partir de un caso fatal ocurrido en la localidad de Magdalena, Provincia de Buenos Aires, Argentina en el verano del 2004.*

Abstract *Leptospirosis is a zoonosis of great diffusion in the world taken place by bacterias of the gender Leptospira. This bacterias belong taxonomically to the order Spirochaetales and they present three essential characteristics: helical disposition of the cytoplasm around a filament axial, extreme flexibility and great mobility. The man is an accidental and final host of the epidemic chain because person's direct transmission to person is strange. The clinical manifestations in the affected individuals vary from cases with no clinical signs until mortal cases. The illness studies with sudden fever, migraines chills, muscular pain, especially in the calves and thighs, with conjunctival injection. This signs can be increased, giving inadequacy hepatorenal, dysfunctions meninges and breathing, hemorrhage and death. The objective of this work is to inform the carried out actions and the results obtained starting from a fatal case happened in Magdalena's town, Buenos Aires Province, Argentina in the summer of the 2004.*

Palabras clave Leptospirosis-humano-canino

Key Words Leptospirosis-human-dog

INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una zoonosis de gran difusión en el mundo producida por bacterias del género *Leptospira*. Dichas bacterias pertenecen taxonómicamente al orden Spirochaetales y presentan tres características esenciales: disposición helicoidal del citoplasma alrededor de un filamento axial, extrema flexibilidad y gran movilidad. Estos movimientos son de 4 tipos: rotación, traslación, flexión y perforación en medios semisólidos. Esta propiedad sería la responsable de la penetración de las *Leptospiras* a través de la piel y mucosas. Debido a su extrema delgadez (0,1µm de espesor) atraviesan los filtros de membrana esterilizables con tamaño de poro de 0,22 µm.

El género *Leptospira* en la actualidad se divide en varias especies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. fainei*, *L. Weillii*, *L. inadai*, *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. parva* (16,17,18,19), pero desde el punto de vista serológico se mantiene la clasificación en 2 especies: *L. interrogans* agrupa a todas las *Leptospiras* patógenas y *L. biflexa* que reúne a todas las formas no patógenas de vida libre o acuícola.

La especie *L. interrogans* esta formada por 25 serogrupos que contienen a más de 250 serovares (1). Algunos serogrupos de *Leptospiras* están asociados a determinadas especies animales (*Canicola* a perros; *Pomona*, a cerdos, *Icterohaemorrhagiae* a las ratas y *sejroe* a bovinos). Aunque cada uno de estos serogrupos pueden infectar a otros hospedadores.

El hombre es un hospedador accidental y final de la cadena epidemiológica pues la transmisión directa de persona a persona es rara. Las manifestaciones clínicas en los individuos afectados varían desde casos inaparentes hasta casos mortales. La enfermedad cursa con fiebre repentina, cefaleas escalofríos, mialgias, especialmente en las pantorrillas y muslos, con inyección conjuntival. Este cuadro puede agravarse, dando insuficiencia hepatorenal, trastornos meníngeos y respiratorios, hemorragias y muerte.

Los datos de laboratorio indican eritrosedimentación acelerada superior a 50 mm durante la primera hora, neutrofilia y discreta plaquetopenia, entre otros.

El diagnóstico final se realiza con la ayuda del laboratorio específico que incluye: aislamiento del agente con técnicas y medios de cultivo especiales, y serología específica para Leptospirosis.

En Argentina las comunicaciones sobre aislamientos no son frecuentes. En el período 1934-1996 se aislaron a partir de muestras de animales y humanas cepas pertenecientes a los serogrupos

Icterohaemorrhagiae, *Canicola*, *Pomona*, *Ballum*, *Grippotyphosa*, *Bataviae*, *Sejroe*, *Pyrogenes*, *Tarassovi* y otras *L. interrogans* no identificadas. En el mismo período se aislaron numerosas cepas de la especie *biflexa* de fuentes ambientales (4).

La transmisión se realiza a través del contacto con orina o elementos contaminados con ella (agua, barro, alimentos, vegetales) de animales infectados. Las *Leptospiras* se reproducen en los riñones de los animales, se eliminan con la orina contaminando el medio desde donde otros animales susceptibles se infectan.

La reactividad serológica en perros urbanos de distintas localidades de la Republica Argentina, indica valores que oscilan entre el 10 y el 60% (3, 4, 5, 6, 9, 11). En esta especie pocos animales son diagnosticados clínicamente porque la infección pasa inadvertida por sus dueños. Estos desconocen que poseen perros eliminadores de *Leptospiras* y sólo el análisis de laboratorio puede demostrarlo.

El objetivo de este trabajo es informar las acciones realizadas y los resultados obtenidos a partir de un caso fatal ocurrido en la localidad de Magdalena, provincia de Buenos Aires, Argentina en el verano del 2004.

MATERIALES Y METODOS

A principios de enero del año 2004 se recibe en el Departamento Infectocontagiosos del Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires, una muestra de suero, proveniente del Hospital Municipal de Magdalena. La muestra correspondía a un individuo masculino de 28 años de edad, con diagnóstico clínico de Leptospirosis.

El paciente domiciliado en la zona urbana de la localidad de Magdalena, obitó a las pocas horas de habersele realizado la extracción.

En nuestro laboratorio se realizaron los análisis correspondientes y se confirmó serológicamente la presunción diagnóstica.

Magdalena es una localidad distante a 50 km al sur de la ciudad de La Plata, capital de la provincia de Buenos Aires sobre la ruta provincial nº 11. Posee una población de 16.495 habitantes (6), la actividad económica principal es agrícola ganadera, con una tasa de prevalencia de Leptospirosis humana de 6,06/100.000 en la población total y de 13,5/100.000 en la población masculina (10).

Para realizar el estudio del caso se planificaron las tareas epidemiológicas conjuntas con el Departamento de Zoonosis de la mencionada localidad: se confeccionó una ficha epidemiológica con datos de la enfermedad para casos humanos y otra para los datos de los cánidos convivientes en la casa del

occiso. Se buscaron rastros, presencia o evidencia de roedores en el domicilio del enfermo y lugares donde había concurrido durante los últimos 15 días al inicio de los síntomas.

Se obtuvieron muestras de suero de 39 familiares y vecinos asintomáticos. Del total de las personas examinadas a 23 se les pudo realizar una segunda extracción sanguínea para la obtención de suero (a los 7 días de realizada la primer toma de muestra). Se extrajeron muestras simples de sueros de 69 caninos y 2 muestras de orina de perro para el cultivo en un intento de aislamiento de *Leptospiras* (los sueros se mantuvieron a -19 °C hasta la realización de las pruebas serológicas.)

Las pruebas serológicas realizadas fueron:

a) Antígeno termoresistente (Ag TR)

Este antígeno se realizó cultivando una cepa de *Leptospira interrogans* sv *pomona*, Pomona en 500 ml de medio Tween Albúmina 80 (EMJH) por 10 días a 30 °C. Se agregó formol al 1% y se centrifugó a 10.000 revoluciones. Luego de 2 lavados con solución salina buferada (PBS) se recolectó en 20 ml de la misma solución. Esta concentración de leptospiras muertas por formol, se calentó a baño María de 100 °C durante 30 min con agitación manual continua. Una vez a temperatura ambiente, se llevó a una concentración del tubo n° 10 de la escala de Mc Farland con PBS. Se mantuvo a 4 °C hasta su utilización (7).

Para realizar la prueba se colocó sobre un espejo 25 µl de suero problema con 25 µl del Ag TR, se homogenizó con un palillo plástico realizando una aureola de 25 mm de diámetro. Con movimientos continuos rotatorios se mantuvo la reacción durante 4 minutos, realizando la lectura a ojo desnudo.

Una reacción positiva se manifestó con la formación de grumos en la mezcla suero-antígeno. El líquido sobrenadante quedó claro y la agitación suave por balanceo del espejo no rompió los grumos formados en el borde de la gota. La reacción negativa fue aquella en que la suspensión suero-antígeno queda con aspecto levemente lechoso y la agitación suave no revela la presencia de grumos. Como testigo se utilizó paralelamente la misma prueba con un suero positivo y otro negativo.

b) Prueba de microaglutinación con antígenos vivos (MAT)

Se enfrentó cada suero a una batería de antígenos de *Leptospiras* consistente en cultivos vivos de *Leptospiras* sembrados en medio EMJH, con un

desarrollo de 7 a 15 días, se utilizó la microtécnica, utilizando microplacas descartables en PST de 96 pocillos fondo en U (1).

La dilución de los sueros en PBS fue de 1/50 para sueros humanos y 1/100 para los sueros caninos. A los sueros reactivos se le realizaron diluciones en PBS en progresión geométrica de 2. Cada reacción fue acompañada con un testigo negativo de cada antígeno de *L. interrogans* empleado. Luego de homogeneizar la mezcla de antígeno-suero, se incubó durante 60 min a 37 °C en una incubadora para 8 placas. La lectura se realizó colocando 3 µl de la mezcla Antígeno-Suero sobre portaobjeto y se observó con microscopio binocular con 160x y condensador de fondo oscuro húmedo. Se consideró reactiva positiva aquella reacción que aglutinaba el 50% o más de leptospiras respecto al testigo negativo (200 leptospiras por campo).

Los antígenos empleados para enfrentar los sueros humanos fueron con las siguientes serogrupos (cepas entre paréntesis): australis (Ballico), ballum (Castellon 3), Icterohaemorrhagiae, (RGA), canicola (Hound Utrech IV), pomona (Pomona), grippotyphosa (Moskva V), bataviae (swart), wolffi (3705 o Hardjoprajitno), pyrogenes, (Salinem), y tarassovi (Perepelicin).

Serogrupo	Serovar	Cepa
AUSTRALIS	Australis	Ballico
BALUM	Castellonis	Castellon 3
BATAVIAE	Bataviae	swart
CANICOLA	Canicola	Hound Utrech 4
GRIPPOTYPHOSA	Grippotyphosa	Moskva 5
ICTEROHAEMORRHAGIAE	Icterohaemorrhagiae	RGA
POMONA	Pomona	Pomona
PYROGENES	Pyrogenes	Salinem
SEJROE	Wolffi	3705
TARASSOVI	Tarassovi	Perepelicin

Para los sueros caninos se utilizaron los antígenos: Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Tarassovi (3).

Para los urocultivos se eligieron dos caninos que tuvieron el mayor título a la MAT. Uno perteneciente al enfermo y otro a un vecino. La extracción de la orina se realizó por punción vesical, previo rasurado, desinfección de la zona post umbilical, en la línea media del abdomen, con jeringa de 5 ml y aguja 50/8 estériles.

Se tomaron 3 ml de orina e inmediatamente se colocaron 0,5 ml en un frasco ampolla violado con tapa de goma conteniendo 5 ml de medio Fletcher. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta la llegada

al laboratorio, 24 h después de la extracción. Se sembraron alícuotas de 0,5 ml a 3 tubos conteniendo 7 ml de medio EMJH con 200 µg/ml de 5-Fluorouracilo (5 FU) y a otros 3 tubos con medio Fletcher se incubaron a 30 °C hasta la observación de desarrollo. Estas se realizan semanalmente en fresco tomando 30 µl, entre portaobjetos y cubre objetos con condensador de fondo oscuro húmedo y un aumento de 25 x de objetivo y 10x de ocular.

Inmediatamente de la observación del desarrollo se repicaron en medio EMJH y se enviaron para su tipificación al Laboratorio del Departamento de Leptospirosis de DILACOT- SENASA.

RESULTADOS

El paciente fallecido mostró síntomas compatibles con leptospirosis: cefaleas, ictericia, mialgias generalizadas, fiebre superior a 39 °C, neumonía e insuficiencia respiratoria. En los lugares frecuentados por el mismo no se evidenciaron rastros de roedores.

Muestras humanas

Se estudiaron 40 personas, salvo el caso guía, todos sin evidencia de síntomas clínicos. Del total estudiado, en 23 (57,5 %) se les pudo realizar una segunda muestra serológica a los 7 días. En el primer análisis resultaron positivas 5 muestras (12,5%) a la prueba con el antígeno TR y 4 (10%) a la MAT. En el análisis de la segunda muestra de la paciente con suero MAT negativa y el TR positivo, la misma resultó positiva a ambas pruebas. (ver Grafico 1)

Muestras serológicas caninas

Se realizaron dos estudios

Grupo 1: Muestras de caninos que convivían con el enfermo con muestras de caninos de los vecinos del caso: Se estudiaron 19 caninos obteniéndose 12/19 (63,15%) de seroreactividad (Cuadro 1).

Grupo 2: Muestras de caninos del resto de la población de Magdalena):

Se extrajo sangre a 51 perros obteniéndose 6/51 (11,76%) de seroreactividad (Cuadro 1).

Urocultivos

Observación directa de las 2 orinas con fondo oscuro: se pudo apreciar escasa cantidad de elementos leptospiriformes móviles en ambas muestras.

Cultivos de orina: en ambos cultivos de orina se apreció un desarrollo de leptospirosis a los 25 y 30 días de incubación respectivamente. Ambas cepas pertenecen al serogrupo Canicola.

DISCUSIÓN

La leptospirosis humana rural se asocia al contacto con la orina del ganado durante las actividades propias del manejo animal, al contacto con la orina de los roedores, y la inmersión en aguas contaminadas, en cambio las fuentes de contaminación en las zonas urbanas son, las inundaciones, los roedores y el contacto accidental con orina de perros infectados, entre otras (11). En este estudio se trataría de un brote humano con punto de partida en la contaminación accidental con orina de caninos que convivían estrechamente con la familia.

De los cinco familiares del enfermo, tres (su esposa y dos de sus hijos de 1 y 3,5 años de edad fueron reactivos serológicamente pero asintomáticos. La esposa acostumbra estar descalza y los niños juegan en el patio de cemento, muchas veces también descalzos donde los perros depositan sus deyecciones. Es de hacer notar que el menor de un año gateaba en el mismo patio.

A los tres pacientes positivos al TR, se les administró ampicilina por vía oral durante 7 días.

El caso guía de 28 años de edad falleció con síntomas y título compatibles con Leptospirosis a los 5 días de iniciados los síntomas.

A pesar de que otros caninos del barrio fueron eliminadores de Leptospiras no ocasionan enfermos aparentes.

Se logró aislar dos cepas a partir de orina de caninos pertenecientes al serogrupo Canicola.

Todos los perros serológicamente reactivos, fueron tratados con oxitetraciclina 25 mg/kg en un intento de evitar la diseminación de leptospirosis por la orina.

Una vez más se demuestra que la precocidad en el diagnóstico de la enfermedad permite realizar el estudio del foco, determinar el origen del mismo, encontrar otros pacientes infectados, y realizar medidas preventivas y de educación para la salud para evitar la ocurrencia de otros enfermos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo desean agradecer la muy buena predisposición de los pobladores de la ciudad de Magdalena ante las tareas a campo realizadas por los profesionales y técnicos. También hacer extensivo el mismo especialmente al municipio de Magdalena que puso a disposición el traslado de los profesionales del Ministerio de Salud a la mencionada localidad. No queremos olvidar mencionar la colaboración en la lectura crítica y ayuda en la redacción del presente trabajo a los Sres. Med Vet. Alejandro Lozano, Bioq. Cesar Gatti y Bact. Analia Sencini, Dr. Oscar Linzitto y Dr. Nestor Stanchi.

Tabla I Prueba de MAT en perros de Magdalena: Grupos 1 y 2

	reactivos %	No reactivos %
Machos	6/10 60	3/27 11,11
Hembras	6/9 66,66	3/24 12,5
Total	12/19 63,15	6/51 11,76

Gráfico I Prueba de MAT en pacientes humanos de Magdalena

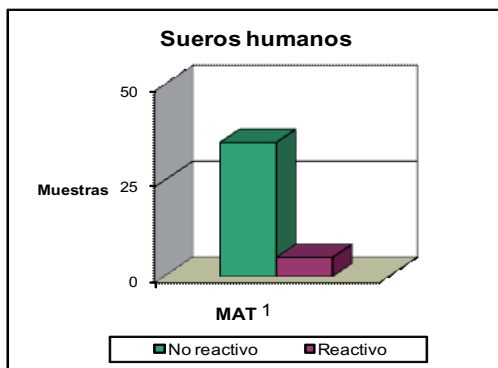


Tabla II. Caninos Magdalena Grupo 1

Grupo etareo	Positivos/examinados (%)		
	Machos	Hembras	Total
<1	0/0	1/1 (100)	1/1 (100)
1	1/1 (100)	½ (50)	2/3 (66.66)
2 a 3	1/3 (33.33)	1/1 (100)	2/4 (50)
4 a 5	2/4 (50)	0/1	5/7 (71.42)
6 a 7	0/0	0/1	0/1
8 a 13	0/0	0/0	0/1
Sin Datos	2/2 (100)	0/0	2/2 (100)
Total	6/10 (60)	6/9 (66.66)	2/2 (100)

Gráfico 2. Caninos de Magdalena. Grupo 1.

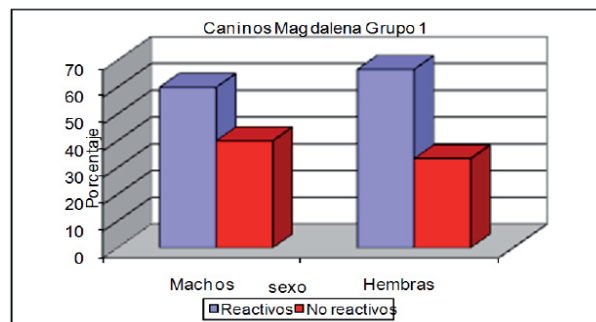
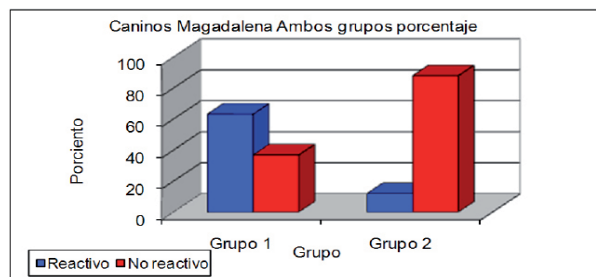


Tabla III Caninos Magdalena Grupo 2

grupo etareo	Positivos/examinados (%)		
	Machos	Hembras	total
<1	0/5	0/6	0/11
1	0/5	0/1	0/6
2 a 3	0/4	2 de 7 (28,57)	2 de 11 (18,18)
4 a 5	3/5 (60)	0/5	3 de 10 (30)
6 a 7	0/5	1 de 5 (20)	1 de 10 (10)
8 a 13	0/3	0/0	0/3
total	3 de 27 (11,11)	3 de 24 (12,5)	6 de 51 (11,76)



BIBLIOGRAFIA

- Levett, PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbio. Rev., 14(2):296-326.
- Arias R, Obregón Ana y Fernández Carmen. 2002. Taxonomía de las Leptospiras. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Habana, Cuba.
- Faine S. "Guideliness for the control of Leptospirosis W.H.O. Genova 1982
- Ribeiro MA, Cliquet MG, Santos MGS. "Leptospirosis: A problem for transfusion medicine?". Comunicación en el 2º Congreso Argentino de Zoonosis 13 al 17 de abril de 1998.
- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico. Manual de Leptospirosis . Comision Cientifica Permanente de Leptospirosis. 1994.
- Farace M, Zanini F, Labbè J. Estudio serológico de Leptospirosis en población canina de Buenos Aires y Usuahia. Tierra del Fuego. Argentina. En Libro de Resúmenes de 2º Congreso Argentino de Zoonosis y 1º Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina 14 al 17 de abril de 1998. Buenos Aires

- Caminoa R, Bergagna H. Leptospirosis canina en Neuquen. Estudio epidemiológico durante 1996. En Libro de Resúmenes de 2º Congreso Argentino de Zoonosis y 1º Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina 14 al 17 de abril de 1998. Buenos Aires
- Datos epidemiológicos obtenidos de sitio web Casa de la Provincia de Buenos Aires.
- Mazzonelli J, Dorta de Mazzonelli G, Maillux M. Recherches sur les Antigenes des Leptospires En Stuttgart Tropenmed Parasit. 26: 35-42, 1975
- Caminoa R, Alt M. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de Leptospirosis. Acta Bioquím. Clin. Lat XVIII 2,353-365, 1984.
- Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli C. Leptospira interrogans en una población en Rev. Panam Salud Publica. 1997, 2(2):102-5.
- Caminoa R. Leptospirosis periodo 2002 - 2003 en prensa.
- Seijo A, Draghi G, Dorta de Mazzonelli G, Mazzonelli J, Stiebel C, Argento E, Caminoa R,

Deodato Bl. Informe sobre leptospirosis en la Republica Argentina. Comision científica sobre Leptospirosis de Republica Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicacion monografica N°3.. Fundacion Mundo Sano. Buenos Aires. Octubre de 2002.

12. Caminoa R, Marino F, Di Lorenzo C, Mombiela A, Soncini A, Diorio J, Pássaro D. Hallazgos de anticuerpos contra *Leptospira* en caninos de diferentes barrios de la ciudad de La Plata. En Comunicaciones libres (posters) Actas del I congreso Bonaerense de Zoonosis de 2003. La Plata.

16. Brenner DJ, Kaufman AJ, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *L. alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Inter J Of Systematic Bacteriology*, 49:839-858.

17. Quinn PJ, Markey BK, Cate ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Editorial. Blackwell Science Ltd. 178-179.

18. Pérolat, P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov. isolated from pigs in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:851-858

19. Holt JG, Hrieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Ed., Baltimore, USA. 9th edición. 27-37.



Organisation
Mondiale
de la Santé

Animale World
Organisation
for Animal Health

Organización
Mundial
de Sanidad

PUBLICACIONES

Vacunación animal

Parte 1: desarrollo, producción y utilización de vacunas

Parte 2: aspectos científicos, económicos, reglamentarios y socio-éticos



P.-P. Pastoret, M. Lombard & A.A. Schudel (eds)

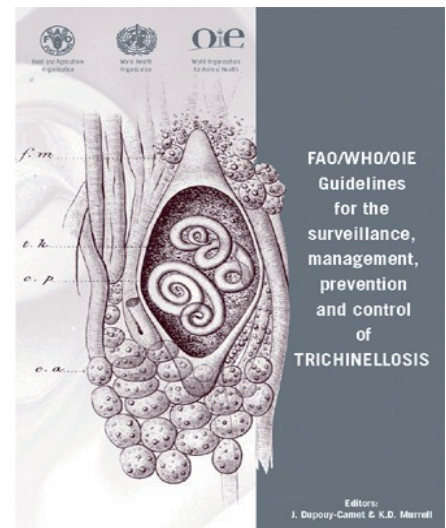
Revista científica y técnica Volumen 26 (1), abril de 2007 & Volumen 26 (2), agosto de 2007

La vacunación, cuando está disponible, es el medio más rentable para prevenir y controlar, incluso erradicar, enfermedades infecciosas. En los últimos años se ha utilizado con otros fines en el bienestar y la producción animales, por ejemplo la inmunocastración. Las vacunas son más que la mera lucha contra enfermedades infecciosas. La vacunación ayudará a cumplir los objetivos enunciados en la Declaración del Milenio (2005), considerando la revolución ganadera que se avecina. La percepción y desaprobación del gran público de medidas de profilaxis veterinaria, como el sacrificio masivo de rebaños para controlar enfermedades epizooticas, contribuyen a plantear la vacunación como alternativa. También los progresos de la vacunología veterinaria, como la elaboración de vacunas con marcador serológico. Este número de la Revista científica y técnica de la OIE aspira a proporcionar información general de utilidad, en lugar de proliferas descripciones técnicas de enfermedades o vacunas concretas.

Directrices FAO/OMS/OIE sobre vigilancia, gestión, prevención y control de la TRIQUINELOSIS

por J. Dupouy-Camet & K.D. Murrell (eds)

La triquinosis es una enfermedad parasitaria que constituye una amenaza para la salud pública. Hasta fechas recientes se pensaba que no tardaría en dejar de plantear problemas en ese ámbito, pero cada vez está más claro que sigue siendo peligrosa desde el punto de vista de la inocuidad de los alimentos, sobre todo en zonas que no disponen de muchos recursos. Aunque el paradigma clásico respecto a la triquinosis humana afirma que la función del hombre como huésped es la de una "vía muerta", que contrae *Trichinella spiralis* por ingestión de carne de cerdo infestada, este patrón epidemiológico característico se ha alterado sustancialmente en los últimos años. Se sabe ahora que hay por lo menos ocho especies de *Trichinella*, y que el ser humano puede resultar infectado por carnes diversas, entre otras la de caballo, caza, aves e incluso reptiles. Aunque el ciclo doméstico (con intervención de cerdos domésticos) sigue constituyendo una de las grandes fuentes de peligro, ha aumentado sobremanera la intervención de cerdos salvajes y animales domésticos no porcinos, cosa que ha obligado a revisar las ideas clásicas sobre epidemiología, vigilancia y control de la triquinosis.



Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)

12 rue de Prony

75017 Paris - France

tel.: 33 (0) 1 44 15 18 88

Información sobre los pedidos: pub.sales@oie.int

**Artículos de Investigación
Research articles**

EFFECTO DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN SOBRE LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE RICOBENDAZOLE EN OVINOS.

EA Formentini, N Mestorino, E Reggiardo, M Marti Díaz, SH Reutemann, JO Errecalde

**Revisiones
Review**

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENÉTICO.

CM Tittarelli, MC Stornelli, F Gimenez, CA Savignone, RL de la Sota, M A Stornelli

CONFRONTANDO LAS ZONOSIS: RELACIÓN ENTRE LA MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA.

LH Kahn*

**Comunicaciones breves
Short communications**

OTITIS EXTERNA CANINA APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO.

Dragonetti AM, Broglia G.

LEPTOSPIROSIS HUMANA: ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y AISLAMIENTOS DE CEPAS DE CANINOS A RAIZ DE UN CASO FATAL.

R Caminoa, D Pássaro, V Schamunn, JC Garcia, N Fernandez, ND Di Croce