

Conocimientos sobre leptospirosis en estudiantes de veterinaria y seropositividad, Villavicencio, 2011

Undergraduate veterinary students' knowledge about leptospirosis and its reactivity, Villavicencio, 2011

Conhecimentos sobre leptospirose em estudantes de veterinária e soro positividade, Villavicencio, 2011

Diana S. Cristancho-Torres¹, Karen A. Benítez-Cabrera¹, Agustín Góngora-Orjuela²

¹ MVZ, Especialistas en Epidemiología, Universidad de los Llanos

² MV, PhD Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal-Escuela de Ciencias Animales Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Email: nana88_75@hotmail.com.ar

Recibido: enero 10 de 2012

Aceptado: octubre 17 de 2012

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de anticuerpos a *Leptospira spp.* y los conocimientos frente a la enfermedad en estudiantes de veterinaria. Se utilizó la prueba MAT en sueros de 99 sujetos obtenidos previo consentimiento informado, además se aplicó una encuesta que contenía 8 preguntas sobre la enfermedad. Se exploraron las posibles asociaciones entre conocimientos, características sociodemográficas y filiación con la positividad. La seroprevalencia fue de 5,05% y la distribución por serovar fue *L. javanica* 1%, *L. wolffii* 1%, *L. grippityphosa* 1% y *L. pomona* 4%. No se encontraron reactores a otros serovares. La prevalencia fue mayor en los menores de 20 años, de los semestres finales de formación y con mayor conocimiento. El nivel de conocimiento de los sujetos a leptospira fue alto 17.17%, medio 67.67% y bajo 15.15%. Se concluye que la prevalencia fue baja en un grupo considerado de riesgo ocupacional, sin embargo se requiere reforzar los conocimientos sobre etiología, epidemiología y detección precoz de la enfermedad.

Palabras clave: leptospirosis, conocimientos, zoonosis, villavicencio, aglutinación

Abstract

This study was aimed at determining the seroprevalence of antibodies against *Leptospira spp.* in veterinary students and their knowledge concerning leptospirosis. The microscopic agglutination test (MAT) was used on 99 subjects' sera obtained following them having given their informed consent; a survey containing 8 questions about the disease was also used. Possible associations between knowledge, sociodemographic characteristics and affiliation with positivity were explored. Seroprevalence was 5.05% and serovar distribution was 1% for *L. javanica*, 1% for *L. wolffii*, 1% for *L. grippityphosa* and 4% for *L. pomona*; no reactivity to other serovars was found. Veterinary students' knowledge about leptospirosis was rated 17.17% high, 67.67% medium and 15.15% low. Antibody prevalence was higher in students aged less than 20 years-old, those in their final semesters of training and those having more knowledge. It was thus concluded that prevalence was low in a group considered to be at occupational risk; however, knowledge/understanding about the aetiology, epidemiology and early detection of leptospirosis must be reinforced.

Key words: leptospirosis, knowledge, zoonosis, Villavicencio, agglutination.

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos a leptospira spp e os conhecimentos diante á doença nos estudantes da veterinária. Foi utilizada, a prova MAT em soros de 99 indivíduos obtidos previa autorização informada, além disto, foi aplicado enquete com oito perguntas sobre a doença. Foram exploradas as possíveis associações entre conhecimentos, características sociodemográficas e filiação com a positividade. A soro prevalência foi 5,05% e a distribuição por serovar foi L javanica, 1%; L wolfii, 1%; L grippotyphosa, 1% e L pomona 4%. Não foram encontrados reatores a outros serovares. A prevalência foi maior em indivíduos menores de 20 anos e em semestres finais de formação e com maior conhecimento. O nível de conhecimento dos indivíduos a leptospira foi alto 17,17%, médio 67,67% e baixo 15,15. Em conclusão, a prevalência foi baixa num grupo ocupacional, porem, precisa-se reforçar os conhecimentos sobre etiologia, epidemiologia e detecção precoce da doença.

Palavras chave: leptospirose, conhecimentos, zoonose, Villavicencio, aglutinação.

Introducción

Entre más de 1.400 patógenos humanos reconocidos, el 64% tiene un origen zoonótico (Heeney, 2006) y de 177 patógenos emergentes o reemergentes, el 72% tiene su origen en los animales (Woolhouse *et al.*, 2005). La leptospirosis, causada por uno de estos patógenos, tienen una distribución mundial (WHO, 1999; Bharti *et al.*, 2003), siendo la Antártida el único continente en donde no ha sido reportada (Adler y De la Peña, 2010).

La Leptospirosis afecta a una variedad de especies animales, las cuales se constituyen en sus principales reservorios (Levett, 2001). En el humano es una enfermedad ocupacional debido a que la transmisión se relaciona con la actividad desarrollada por el contacto con los animales infectados, por tanto los veterinarios constituyen un grupo de alto riesgo (Spotts *et al.*, 2009). El riesgo de infección en este grupo pueden exceder al de otros grupos que tienen una mayor exposición a los animales (Whitney y Grey, 2009). Por la formación académica, los veterinarios están calificados y entrenados para ayudar en la prevención de las zoonosis, mediante la identificación de los animales potencialmente infectados, por lo que se constituyen en un eslabón para la entrada de estas enfermedades para el resto de la población humana (Glickman, 1992; Wright *et al.*, 2008).

En Colombia, la leptospirosis ha sido estudiada en diferentes especies animales como bovinos (Ochoa *et al.*, 2007), porcinos (Almenteros *et al.*, 2004) y caninos (Ardila y Mujica, 1997) y en menor grado en grupos humanos a riesgo (Góngora *et al.*, 2008). La enfermedad en humanos puede estar subestimada ya que los signos clínicos son similares a otras enfermedades tropicales como la malaria, el dengue, infección por hantavirus o fiebre tifoidea, lo que dificulta su diagnóstico y un tratamiento oportuno (Levett *et al.*, 2000). Hasta hace poco tiempo, el Ministerio de Salud y Protección social no la reconocía como un evento de notificación obligatoria. Igualmente, dentro de los profesionales del sector agropecuario es escasa la importancia que se da a las enfermedades zoonóticas (Cediel *et al.*, 2004).

Es comprensible que por la formación recibida, para ejercer en el futuro como profesionales, los estudiantes de veterinaria deberían tener un conocimiento superior sobre los aspectos etiológicos, de prevención, control y demás características importantes de la enfermedad. Esto serviría para disminuir su transmisión hacia los humanos.

El objetivo de este estudio fue identificar los conocimientos sobre leptospirosis que tienen los estudiantes de medicina veterinaria y zootecnia y determinar la prevalencia de anticuerpos a la enfermedad.

Materiales y métodos

Sujetos, toma de muestras y recolección de información

Se realizó un estudio transversal de seroprevalencia a partir de un muestreo no probabilístico en 99 estudiantes del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de los Llanos.

Previo consentimiento informado, se obtuvo 5 ml de sangre por punción venosa cubital en tubos de recolección Vacutainer® estériles y mantenidos a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 3.500 RPM por 10 minutos y el suero obtenido fraccionado en alícuotas de 1,0 ml y mantenidos a -70 °C hasta su análisis.

A los sujetos seleccionados se les aplicó una encuesta previamente validada mediante una prueba piloto que contenía 8 preguntas para determinar los conocimientos relacionados con 1) ¿cuál es el origen etiológico de leptospira?, 2) ¿cuál es la prueba diagnóstica para leptospirosis?, 3) ¿la leptospira es una enfermedad endémica en Colombia?, 4) ¿en Colombia, existe la vacuna contra leptospirosis?, 5) ¿en Colombia, la leptospirosis es un evento de notificación obligatoria?, 6) ¿cuál es la principal fuente de infección animal para el humano?, 7) ¿cuál es el factor de riesgo más importante para adquirir la leptospira?, 8) ¿con qué frecuencia los veteri-

narios deben realizarse exámenes para el diagnóstico de esta enfermedad?

Procedimiento de diagnóstico

Se realizó la prueba de microaglutinación (MAT – del inglés, *microscopic agglutination test*) la cual es aceptada como prueba de referencia por la OMS. Esta prueba consiste en una dilución en serie de suero que es puesta en contacto con un volumen igual de una suspensión de leptospiros en crecimiento a una cierta temperatura y por un periodo, con la posterior lectura al microscopio para estimar si se da una aglutinación del 50%, como punto positivo del título de una mezcla de reacción (Wolf, 1954) Con un título reactivo de 1:100, en personas tras 2 a 4 semanas de infección, en lugares de baja endemia (como parece ser el nuestro), se tendría una sensibilidad del 96,6% y una especificidad de 94,8%(Vijayachari *et al.*, 2001) Los sueros fueron probados en diluciones dobles a partir de 1:25 hasta techo final con los serovares *hardjoprajtino*, *canícola*, *icteroahemorragiae*, *wolfii*, *hebdomadis*, *bratislava*, *javanica*, *tarassovi*, *grippothyphosa* y *pomona*. Los serovares empleados como antígeno vivo, correspondían a la batería clásica, con garantía de identidad genómica empleada en el mismo laboratorio. Se consideró una dilución positiva aquella donde la lectura en el microscopio de campo oscuro presentaba 50% o más leptospiros aglutinadas con respecto al control en una dilución 1:100.

La prueba MAT se realizó en el Laboratorio de Leptospira y Leptospirosis de La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica-Ceisa) en Bogotá.

Análisis estadístico

Los conocimientos fueron mostrados en su frecuencia relativa y se consideraron adecuados, cada uno, cuando fueron respondidos correctamente por más de 70% de los encuestados. Para evaluar el nivel de conocimientos a la enfermedad se establecieron 3 categorías de acuerdo al número de preguntas contestadas como correctas Alto:7-8 Medio: 4-6, Bajo : 1-3

Se exploró la asociación entre sexo, edad, semestre, cada conocimiento y las categorías de conocimiento mediante la prueba estadística ji cuadrado. Toda la información se analizó mediante Epiinfo 3.5.4 (versión 2012)

Consideraciones éticas

A cada uno de los participantes en el estudio, les fue informado los objetivos y propósitos del mismo, la participación voluntaria, además el compromiso de

manejar la información de manera anónima y estrictamente confidencial y la utilización solo con fines investigativos. El consentimiento informado fue firmado por duplicado.

Resultados

La población muestreada estuvo constituida por 50 hombres y 49 mujeres, se presentó más participación de los estudiantes de mayores semestres (83 participantes), y de estudiantes mayores de 20 años (78). La sero-prevalencia general fue 5,05% mientras la distribución de reactores por serovar fue *javanica* 1%, *L. wolffi* (1%), *L. grippotyphosa* 1% y *L. pomona* 4%). No se encontraron reactores a los serovares *tarassovi*, *canícola*, *Hebdomadis*, *icteroahemorragiae*, *Hardjo pratjino* y *Bratislava*.

El mayor nivel de conocimiento se obtuvo para las preguntas: 2) ¿cuál es la prueba diagnóstica para leptospirosis?, 3) ¿la leptospirosis es una enfermedad endémica en Colombia?, 5) ¿en Colombia, la leptospirosis es un evento de notificación obligatoria?, y 6) ¿cuál es la principal fuente de infección animal de leptospirosis en humanos? Figura 1

En la tabla 1 se muestra la relación entre la respuesta adecuada a determinado número de preguntas y el resultado positivo o no a la prueba.

Discusión

La seroprevalencia obtenida en este estudio es baja y menor que la reportada por Góngora *et al* (2008) en un estudio que incluyó a otros grupos de riesgo, además de estudiantes de veterinaria (17%). En Perú, se demostró la exposición a leptospira a través del tiempo en estudiantes de veterinaria, el riesgo de infección fue 2.4 veces mayor (0.76-7.28) ($p=0.137$) cuando se compararon los estudiantes recién ingresados a la Universidad, frente a los estudiantes en las prácticas finales (Dammert *et al.*, 2009).

Contrastan estos resultados con la no presencia de reactores en veterinarios de Alemania (Elbers *et al.*, 1999), 2,5% en veterinarios de EEUU (Whitney y Grey, 2009) y 3,9% en veterinarios de Holanda (Elbers *et al.*, 1997), lo que sugiere que diferentes condiciones epidemiológicas intervienen en la transmisión de la enfermedad. Independiente del riesgo ocupacional en población urbana de Cali (Colombia) se encontró 23,3% de reactores y una asociación entre la seropositividad y el contacto con animales (Ferro *et al.*, 2006). Una mayor prevalencia de leptospirosis en población humana ha sido reportada en países tropicales frente

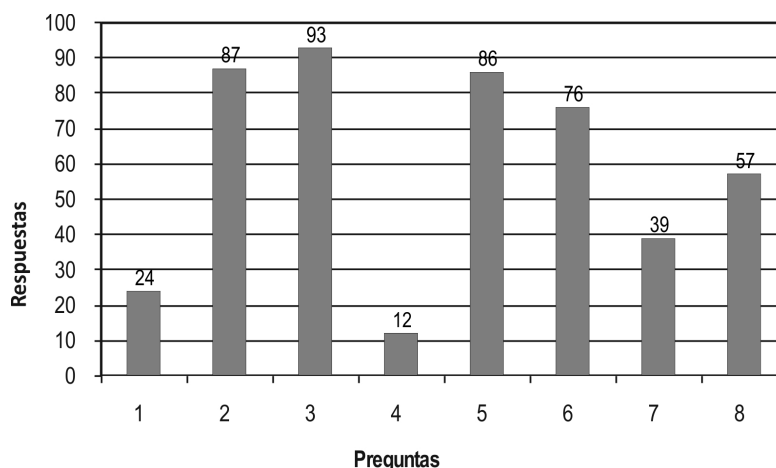


Figura 1. Resultado de la encuesta para determinar el nivel de conocimientos a leptospira 1: Etiología de la leptospira, 2: Prueba diagnóstica, 3: ¿La leptospira es endémica en Colombia?, 4: ¿En Colombia existe vacuna contra leptospirosis?, 5: ¿En Colombia la leptospirosis es de notificación obligatoria?, 6: ¿Cuál es la principal fuente de infección animal para el humano?, 7: ¿Cuál es el factor de riesgo más importante para adquirir la leptospira?, 8: ¿Frecuencia con que los veterinarios deben realizarse examen diagnóstico a leptospira?

a países templados (Barthi *et al.*, 2003), lo que sugiere menores condiciones de salubridad.

Respecto a los serovares actuantes, la mayor seropositividad al serovar *pomona* difiere de estudios previos en la misma región en donde el principal serovar encontrado fue *bratislava*, lo que evidencia un mayor contacto con el principal reservorio de este serovar, los cerdos (Morales-Cabezas *et al.*, 2007; Góngora *et al.*, 2008), es posible que dentro de las prácticas académicas regulares al interior de la granja de prácticas de la universidad o al realizar actividades extracurriculares se hayan expuesto a este serovar sin contar con las medidas de protección adecuadas.

La seroprevalencia de los diferentes serovares depende de sus reservorios animales, además de las condiciones ambientales, ocupacionales y prácticas agrícolas locales (Barthi *et al.*, 2003). Igualmente, es conocido que la gran biodiversidad de leptospirosis se ve afectada por factores como el clima, la geografía, las interacciones bióticas y antropogénicas entre otras (Vinetz *et al.*, 1996). Por esto, se hace necesario monitorear el estado de portador de las diferentes especies animal con las que tienen contacto los estudiantes y así prevenir el contagio.

El nivel de conocimientos de los estudiantes frente a la leptospira sugieren que la formación académica sobre transmisión de la enfermedad, situación en Colombia, fuentes de infección y factores de riesgo es de calidad, pero es necesario mejorar los conocimientos sobre

etiología, prevención, diagnóstico y notificación, por lo que se debe mantener un programa de educación continuada no solo sobre leptospira, sino con el resto de enfermedades zoonóticas más prevalentes en la región.

La falta de conocimiento en estos aspectos coincide con estudios realizados en Cuba, en una encuesta en 211 veterinarios sobre las más importantes zoonosis, solo el 31% aprobaron el cuestionario y los niveles más bajos fueron para leptospirosis y toxoplasmosis. Igual situación se evidenció en profesionales de la salud, en una encuesta en 41 pediatras del hospital "William Soler" del mismo país. Se encontraron deficiencias en los aspectos epidemiológicos y de diagnóstico microbiológico, además la falta de estudios de posgrado y la graduación después de más de 10 años fueron factores asociados con las calificaciones no satisfactorias (Verdasquera *et al.*, 2011).

La falta de una adecuada educación sobre esta enfermedad y de otras zoonosis supone una carga considerable para los propietarios de los hospitales y clínicas veterinarias no solo desde el punto de vista legal sino del ocupacional (Wright *et al.*, 2008). Las reclamaciones que realizan los veterinarios por casos de salud ocupacional en EEUU es tres veces mayor que la que presentan los profesionales de salud humana (Wright *et al.*, 2008), aunque dicha situación no ha sido estudiada en Colombia.

A pesar que en este estudio no se analizaron factores de riesgo y los estudiantes presentan fallas en los co-

Tabla 1. Conocimiento sobre la leptospirosis y su relación con la positividad en los estudiantes de medicina veterinaria y zootecnia, Villavicencio, 2011.

Evento	Positivos (n= 5)	Negativos (n=94)	OR	valor de p
Masculino	3	47	1.5	p>0,05
Femenino	2	47		
>20 años	0	21	0.00	p>0,05
<= 20 años	5	73		
Primeros semestres	0	16	0.00	p>0,05
Últimos semestres	5	78		
Conoce el agente etiológico para leptospirosis	0	24	0.00	p>0,05
	5	70		
Conoce cuál es la prueba diagnóstica para leptospirosis	0	87	0.00	p<0,05
	5	7		
Conoce si la leptospirosis es endémica en Colombia	0	93	0.00	p<0,05
	5	1		
Conoce si en Colombia existe vacuna contra leptospirosis	2	10	5,6	p<0,05
	3	84		
Conoce si la leptospirosis es de notificación obligatoria en Colombia	2	84	0.1	p<0,05
	3	10		
Conoce la principal fuente de infección animal para el humano	1	75	0.1	p<0,05
	4	19		
Conoce el factor de riesgo más importante para contraer la enfermedad	0	39	0.00	p>0,05
	5	55		
Conoce la frecuencia adecuada para realizarse exámenes para detección temprana	0	57	0.00	p<0,05
	5	37		
Alto conocimiento	2	13	4.5	p>0,05
	3	81		
Medio conocimiento	2	65	0.3	p>0,05
	3	29		
Bajo conocimiento	1	16	1.2	p>0,05
	4	78		

nocimientos sobre las medidas de protección, lo cual conlleva un mayor riesgo de infección, en estudios más extensos, se ha evidenciado que tienen gran valor para evitar la infección; esta situación explique posiblemente la contaminación con la bacteria de 37 personas en un hospital veterinario en Brasil, de las cuales 32 (85,5%) presentaron presencia de anticuerpos (Carneiro *et al.*, 2004). En EEUU, un alto porcentaje de veterinarios no estaban al tanto sobre el adecuado uso de las medidas de protección personal para evitar la transmisión de enfermedades zoonóticas (Wright *et al.*, 2008). En un caso legal de muerte de un trabajador de una clínica veterinaria atribuido a leptospirosis, las autoridades le atribuyeron responsabilidad al veterinario que atendió el caso por la falta de aislamiento del perro infectado y fallas en la instrucción impartida para proteger el resto de la población (Glickman, 1992).

Se concluye que la prevalencia encontrada en este estudio es baja, similar a lo reportado en otros países en el mismo grupo de riesgo, aunque el nivel general de conocimientos fue bueno se encontraron deficiencias en la etiología, vacunación y factores de riesgo, aspectos que deben ser mejorados a través de una educación continuada.

Agradecimientos

A la Universidad de los Llanos por la financiación del proyecto. A la bacterióloga Rocío Patiño, al doctor José Luis Rodríguez del Laboratorio de Leptospira de Corpoica-Ceisa. Igualmente al doctor Franklyn Prieto, docente de la especialización en epidemiología de la Universidad de los Llanos, por la revisión crítica del manuscrito.

Referencias

Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140: 287-296

Almenteros C, Arrieta G, Máttar S, Barguil A, Tamayo L, Padilla T, Bedoya Z, Mendoza S, Estereta F, Díaz N, Estrada C, Medina A, Rodríguez A, De la Ossa M, Pérez A, Ríos R. Seroprevalencia de leptospirosis porcina en el Departamento de Córdoba. *Rev Col Cienc Pec* 2004; 17(2): 141-147

Ardila RM, Mojica JD. Determinación de factores de riesgo a *L. canicola* en caninos de Clínicas Veterinarias en Villavicencio: Trabajo de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad de los Llanos 1997.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, and Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757-771

Carneiro M, Giacomini M, Costa JM. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: estudio clínico y epidemiológico. *Rev Chil Infect*. 2004;21(4):339-344

Cediel B, Natalia M, Villamil LC. Riesgo biológico ocupacional en la medicina veterinaria, área de intervención prioritaria. *Rev. Salud Pública* 2004;6 (1):28-43

Dammert N, Noé N, Falcón N, Lopera L, Rodríguez M. Exposición a *Leptospira sp.* en estudiantes de medicina veterinaria al inicio y término de la carrera. *Rev Inv Vet Perú* 2009; 20 (1): 114-119

Elbers A, Diepersloot R, Vecht U, Wisselink H, Tielen M. Occupational exposure to *Streptococcus suis* II, Hantavirus, *Brucella abortus*, Lymphocyte choriomeningitis virus, and leptospira in veterinarians and pig farmers in the southern Netherlands. *Epidemiol. Santé Anim.* 1997;31-32.

Elbers AR, Vecht U, Osterhaus AD, et al. Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands. *Vet Q* 1999;21:50-54.

Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica* 2006;26:250-257

Guerra MA. Leptospirosis. *JAVMA*. 2009; 234 (4): 472-478

Glickman LT. Implications of the human/animal bond for human health and veterinary practice. *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:848-851

Góngora A, Parra JL, Aponte LH, Gómez LA. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* En Grupos de Población de Villavicencio, Colombia. *Rev Salud Pública* 2008; 10 (2):269-278

Heeney JL. Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and prevention. *J Intern Med* 2006;260:399-408.

Levett PN, Branch SL, Edwards CN. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 112-114.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326

Morales-Cabezas RJ, Bravo-Tamayo D, Moreno-Velásquez D, Góngora A, Ocampo, A. Asociación serológica de la infección por leptospira en humanos, porcinos y roedores en una granja de Villavicencio, Colombia. *Orinoquia* 2007;11(2):73-80.

Ochoa JE, Sánchez A, Ruiz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2007; (5):325-331

Spotts, EA, Ailes E, Myers LM, Saliki JT, Berkelman RL. Prevalence of and risk factors for serum antibodies against *Leptospira* serovars in US veterinarians. *J Am Vet Med Assoc* 2009;234:938-944

Verdasquera D, Alpizar D, Vázquez AL, Romero AL, Galí L, Abad Y, Fernández C. Evaluación del nivel de conocimientos sobre leptospirosis humana en pediatras del hospital "William Soler", 2009. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2011, 24: 95-104

- Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Evaluation of microscopic agglutination test as a diagnostic tool during acute stage of leptospirosis in high & low endemic areas. *Indian J Med Res.* 2001;114:99-106.
- Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 794-798.
- Whitney B, Gray GC. A review of published reports regarding zoonotic pathogen infection in veterinarians *J Am Vet Med Assoc* 2009;234:1271-1278.
- Wolff JW. Laboratory diagnosis of leptospirosis. 1954. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois.
- Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1842-1847
- World Health Organization. Leptospirosis worldwide. *Wkly. Epidemiol Rec.* 1999;74:237-242.
- Wright JG, Jung S, Holman RC, Marano NN, McQuiston JH. Infection control practices and zoonotic disease risks among veterinarians in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:1863-1872