



SECCION ARTICULO ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 6 Vol 1 No. 7 (Pags. 59 -66)

PREVALENCIA DE *SARCOCYSTIS sp.* EN HUMANOS EN EL ÁREA URBANA DE PASTO - NARIÑO

Juan Manuel Astaiza Martínez¹, Lucia Inés Castro Jay²,
Erika Susana Tumal Oviedo³, Arsenio Hidalgo Troya⁴

Fecha recepción mayo 9-2006

Enviado a evaluar mayo 24-2006

Aceptado julio 11-2006

RESUMEN

El presente estudio descriptivo, tipo cross sectional se realizó en el área urbana de Pasto, para determinar la prevalencia de *sarcocystis* en humanos habitantes del lugar y principales factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad, mediante prueba de ELISA en sangre y prueba de Inmunofluorescencia Directa (IFD) para zoitos en materia fecal. En el desarrollo de esta investigación se utilizó un muestreo con 95 personas, la toma de datos se realizó por medio de una encuesta con datos clínicos y medioambientales, aplicando estadística descriptiva y por medio del programa STAT GRAPHICS realizar un modelo de regresión logística. Las muestras fueron procesadas en la Fundación Colombiana de Estudios en Parásitos (FUNCEP) obteniendo como resultado una prevalencia de 78.94% y 100% en ELISA e IFD, respectivamente. Teniendo en cuenta la división sociopolítica de la ciudad, la prevalencia más alta con prueba de ELISA se obtuvo en las comunas 2 y 12 (100%) y la más baja se obtuvo en la comuna 11 (60%).

PALABRAS CLAVES: *Sarcocystis sp.* ELISA. Inmunofluorescencia directa.

ABSTRACT

This study descriptive cross sectional was made in the urban area of the Pasto city, to determinate the prevalence of *sarcocystis* in the human being of this place using the ELISA Test in blood and the direct immunofluorescence Test (DIF) for zoites on feces. In the developed of this research a

¹ M.V.Z Profesor asistente. Programa de Medicina Veterinaria. Universidad de Nariño. astaizajm@gmail.com

² Medica Veterinaria. Representante Agropecuaria La Hacienda. luciacastrojay@hotmail.com

³ Medica Veterinaria. eriquilla@msn.com.

⁴ Matemático, Estadístico, Esp. Epidemiología. Profesor Asistente Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. archi@udenar.edu.co

sampling of 95 people was used, the data capture was made by using a poll with clinical and environmental data which allowed the descriptive statistic and using a logistic regression model in the STAT GRAPHICS program. The samples were processed in the Colombian foundation for the parasite studies (FUNCEP) obtaining as result a prevalence of 78.94% and 100% in the ELISA and DIF Test. Considering the sociopolitical division of the city, the highest prevalence with test of ELISA was obtained in communes 2 and 12 (100%) and lowest it was obtained in commune 11.

KEY WORDS: *Sarcocystis* sp. ELISA. Direct Immunofluorescence Test.

INTRODUCCIÓN

La *sarcocystosis* es una zoonosis parasitaria producida por coccidios del género *sarcocystis*. En medicina humana las especies más relevantes son *S. suis-hominis* y *S. bovi-hominis*, que son capaces de realizar parte de su ciclo de vida en el tracto intestinal del hombre". (1)

Los parásitos del género *Sarcocystis* pueden afectar a los humanos produciendo dos tipos de enfermedad: una la *sarcosporidiosis*, que se refiere al desarrollo de la fase asexual del parásito con formación de quistes en el músculo estriado y en la cual el hombre actúa como huésped intermediario. El otro tipo es la *Sarcocystosis*, que esta relacionada con la fase sexual en el intestino del hospedador definitivo. (2)

Los huéspedes definitivos del *Sarcocystis* somos los depredadores, en otras palabras, somos todos los que matamos otros animales para consumir su carne, mientras que los huéspedes intermediarios son precisamente aquellos animales herbívoros que van a servir de presa de los depredadores. Esto implica que cuando un huésped definitivo mata una presa contaminada con el parásito, aquel se contamina para posteriormente eliminar las formas que infectaran a las presas. (3)

El Ministerio de Salud añade que: "Esta zoonosis desde el punto de vista clínico es reciente en el país, por lo tanto no se conoce aún su comportamiento como entidad patológica en el campo de la medicina". (4)

La *sarcocystosis* interna en humanos no parece ser una preocupación en nuestro entorno, de ahí que no se hayan hecho investigaciones al respecto en el municipio de Pasto y no se insista en la necesidad de realizar programas de prevención y concienciación. Sin embargo, las personas se ven atacadas por parásitos gastrointestinales que son la causa de problemas tales como diarrea, dolor abdominal y vomito, lesiones en diferentes órganos y síndromes musculares que generan mal funcionamiento fisiológico y disminuyen la calidad de vida.

Los animales domésticos con parásitos gastrointestinales se convierten en un factor de riesgo para las personas, quienes están propensas a adquirir enfermedades, principalmente los niños son la población más vulnerable ya que al estar en contacto con mascotas se encuentran más expuestos a manipular sus heces y contaminarse con los huevos de parásitos presentes en ellas y adquirir la zoonosis. La contaminación de los humanos también se da por medio de los subproductos obtenidos de los animales para el consumo en los hogares y además malos hábitos de higiene o cuando las personas ingieren carne cruda o mal cocida.

Actualmente en el departamento de Nariño no se encontró ningún estudio sobre *Sarcocystis* en humanos, a pesar de que ya se han elaborado estudios en la especie canina, Cadavid y Erazo (5), donde se diagnosticó la presencia del parásito, con

una prevalencia del 78,1% en perros, Benavides y Viteri⁽⁶⁾, los cuales encontraron en la especie bovina una prevalencia del 100%, Burbano y Unigarro⁽⁷⁾ quienes reportaron una prevalencia de 42.7% en porcinos, en felinos Aguirre y Cárdenas⁽⁸⁾ con una prevalencia de 36.7% y Cadena y López⁽⁹⁾ que encontraron que la zarigüeya es el portador definitivo del *Sarcocystis sp*; razón por la cual se realizó este trabajo sobre la determinación del *Sarcocystis* en humanos en el sector urbano del municipio de Pasto y así completar un ciclo de investigaciones.

El *Sarcocystis* junto con *Toxoplasma* son dos géneros de coccidios pertenecientes a la familia *Sarcocystidae*. Presentan un ciclo evolutivo heteroxénico caracterizado por requerir dos huéspedes. En el huésped definitivo se lleva a cabo la reproducción sexuada en la pared intestinal, eliminando formas infestadas para el huésped intermediario (presa), en quien ocurre la fase asexuada del ciclo, originando formaciones tisulares infectantes para el predador. La *sarcocystosis* intestinal humana es producida por la ingestión de quistes viables de *S. sui-hominis* o *S. bovi-hominis*, localizados en la musculatura de cerdos o vacunos, respectivamente. Ambas especies tienen ciclos vitales similares.⁽¹⁰⁾

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el casco urbano del Municipio de San Juan de Pasto. Donde según el DANE la población total se proyectó para el 2002 en 356.867 habitantes en la zona urbana de Pasto.⁽¹¹⁾

Para calcular el tamaño de la muestra se aplicó la fórmula para poblaciones finitas, con una prevalencia estimada del 72,5, error máximo admitido 10%, y un nivel de confianza del 95% obteniendo un tamaño de muestra de 95 personas.

Las 95 personas se distribuyeron proporcionalmente en cada comuna y el número mínimo a muestrear

en cada una de ellas, fue de 5, a quienes se les recolectó materia fecal fresca, en cajas apropiadas para este fin, con su respectiva identificación. La toma de muestras de sangre se realizó en la vena braquial, con agujas multitubo, en tubos de ensayo al vacío con y sin anticoagulante, con la respectiva identificación. Para este procedimiento se contó con la colaboración de las enfermeras de los Centros de Salud de la Alcaldía Municipal de Pasto y la Dirección Municipal de Salud. A estas personas se les tomó datos mediante encuesta.

Las personas a las cuales se les tomaron las muestras son personas que llegaron a los puestos de salud a exámenes de rutina y posteriormente las donaron, estudiantes de la Universidad de Nariño y personas interesadas en el estudio las cuales pidieron ser incluidas, la toma de las muestras se realizó en el domicilio de cada persona. Luego de esto los exámenes se refrigeraron para su conservación hasta la recolección total y finalmente su envío al laboratorio de la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos (FUNCEP) en la ciudad de Bogotá, donde se procesaron todas las muestras

- $H_0: \eta = 0,72$ (La prevalencia de *sarcocystis* en humanos en el área urbana del municipio de Pasto es igual a 72,5% valor tomado del estudio realizado en Bogotá).
- $H_1: \eta \neq 0,72$ (La prevalencia de *sarcocystis* en humanos en el área urbana del municipio de Pasto, es diferente a 72,5%).

Técnicas de laboratorio

Montaje de la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) para zoitos en materia fecal.

La técnica utilizada fue:

- Añadir en tubo 0,5 ml. de anticuerpos antisarcocystis marcados con fluoresceína.

- Añadir en estos tubos aprox. 0.01 g de materia fecal a examinar.
- Mezclarlos a profundidad.
- Incubar a 37°C por una hora.
- Centrifugar a 800 revoluciones por 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de PBS pH 7,2.
- Centrifugar a 800 revoluciones por 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0.3 ml de PBS pH 7,2.
- Tomar 0.02 ml y colocarlos en una lámina porta objetos, para realizar la lectura en el microscopio de fluorescencia.
- Los esporozoitos de *Sarcocystis* se verán como pequeñas estructuras de 4 a 6 micras en su diámetro mayor por 2 a 4 micras en su diámetro menor, con fluorescencia perinuclear, los ooquistes y esporoquistes además presentarán fluorescencia en la pared del quiste.⁽¹²⁾

Montaje de la prueba de ELISA para la cuantificación de Sarcocystina:

- Preparar una solución de Acc con el doble de la concentración de saturación.
- Mezclar en un tubo a partes iguales de suero problema y solución de Acc.
- Incubar a 37 °C por una hora.
- Añadir 50 µ .1 de esta mezcla/ pozo.
- Incubar a 37°C por una hora.
- Lavar 5 veces con PBS-Tween 0.5%.
- Añadir la solución reveladora.
- Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 5 a 10 minutos. Frenar la reacción y leer la absorbancia.⁽¹³⁾

PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Mediante la prueba de Inmunofluorescencia Directa (IFD) para zoitos en materia fecal, se encontró que el 100% de las personas muestreadas presentan *sarcocystis*, por lo que la tasa de prevalencia es igual

a 100% que indica que todos son portadores y que además eliminan el parásito al medio ambiente contaminando con sus eyecciones

TASA DE PREVALENCIA EN TITULACIÓN PARA SARCOCYSTINA

La titulación para Sarcocystina, se considera positiva en sangre, a partir de 80 UI/L según los valores de referencia aceptados en el laboratorio FUNCEP por el doctor JOSÉ LUIS AZUMENDI, especialista y pionero en la investigación del tema en el país y director del laboratorio. En el estudio se encontraron 75 casos positivos y 20 negativos resultando una prevalencia de 78.94%.

Por lo anterior, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, que dice H_1 : La prevalencia de *Sarcocystis* en humanos del área urbana del municipio de Pasto, es diferente a 72,5%.

Con un margen de error calculado de 0,038, la prevalencia es de 78,94%, con límites de confianza de:

$$LC = 0,7894 + 0,038 = 0,8274$$

$$LC = 0,7894 - 0,038 = 0,7514$$

El límite de confianza para la prevalencia de *Sarcocystis* en Pasto se encuentra entre 82,74% y 75,14%, ya que estos valores son mayores a 72,5% valor que se tomó como referencia para este estudio, se afirma que la prevalencia es estadísticamente significativa.

En cuanto a las características de la población, según edad, se encontró que el 90% de los negativos son mayores de 15 y solo el 10% son menores de 15 pero estadísticamente no tienen significancia dentro del estudio.

El porcentaje de positivos es mayor en hombres 54.7% que en mujeres 45.3%.

TABLA 1. Modelo Estimado de Regresión (Maximum Likelihood)

Parámetros	Standard Estimate	Estimated Error	Odds Ratio	Chi_Square		
CONSTANT	133,068	602,467			LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Edad	0,023568	0,0361584	0,976708	0,418057	0,909364392	1,049038785
Mascotas = 0	-103,916	0,850714	0,353751	11,442	0,193730094	0,64594905
Pescado = 0	161,908	108,106	504,845	212,056	218,4363648	1166,785916
Sexo = 1	0,768659	0,956663	0,534583	0,628173	0,113607888	2,515485406
Supermercado = 0	0,626269	147,229	215,687	128,685	85,22894817	545,8342848
Tcarne = 1	223,807	173,838	937,517	18,468	41,35261233	21254,71828
Tcarne = 2	137,493	104,798	395,482	18,468	25,85920852	6048,368116
Tverduras = 1	-241,222	125,114	0,0896157	101,619	0,056065234	0,143243381
Tverduras =2	254,787	120,502	127,799	101,619	49,76801158	328,174341
Verduras cocidas = 0	0,111156	140,962	111,757	0,252734	1,16E -06	10813459993
Verduras crudas = 0	0,450286	0,993761	0,637446	0,145946	0,063261519	6,423136992
Compra mercado = 0	-314,555	278,483	0,0430432	545,695	0,033058572	0,056043469
Compra super = 0	0,610053	11,387	184,053	0,00831485	3,81029E -47	8,89053E+50
Compra tercena = 0	112,313	151,893	307,446	150,065	122,9501738	768,791454
Compra tienda = 0	-325,426	186,317	0,0386093	324,531	0,027097195	0,055012264
Commercial = 0	0,310332	124,342	136,388	0,210184	1,02E -07	1,82544E+11
Comuna = 1	-359,761	374,569	0,02738 91	167,099	0,015873635	0,047258412
Comuna = 2	0,187805	439,204	0,828777	167,099	0,805509844	0,852716228
Comuna = 3	-760,707	366,143	0,000196925	167,099	0,000156808	0,001574758
Comuna = 4	-618,615	365,235	0,00205774	167,099	0,000805443	0,005257098
Comuna = 5	-575,213	36,018	0,00317601	167,099	0,001327719	0,00759727
Comuna = 6	-633,654	360,657	0,00177041	167,099	0,000677352	0,004627357
Comuna = 7	-47,166	363,403	0,00894554	167,099	0,004375424	0,018289129
Comuna = 8	-284,858	378,656	0,0579264	167,099	0,037609574	0,089218448
Comuna = 9	-361,909	401,131	0,0268072	167,099	0,015485884	0,046405228
Comuna = 10	-585,129	36,072	0,00287617	167,099	0,001184428	0,006984259
Comuna = 11	-952,336	399,321	7,31232E -05	167,099	1,72562E -05	0,00030986
Carne asada = 0	0,972395	0,910573	264,427	20,167	23,17865237	3016,639501
Carne cerdo = 0	-161,317	105,371	0,199254	324,103	0,167160008	0,237509898
Carne cocida = 0	-130,082	0,989235	0,272308	251,229	0,231846885	0,319830249
Carne frita = 0	-276,453	115,933	0,00630055	55,1512	0,050023554	0,079356478
Carne pollo = 0	374,238	449,038	421,984	0,421263	4,98201E -06	35742695114
Carne res = 0	388,381	426,582	486,093	0,691633	0,000226321	1044031961

TABLA 2. Factores de riesgo para la infección de *Sarcosystis sp* en humanos, área urbana de Pasto

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
Edad	0.418057	1	0.5179
Mascotas	11.442	1	0.2848
Pescado	212.056	1	0.1453
Sexo	0.6281 73	1	0.4280
Supermercado	128.685	1	0.2566
Tiempo carne	18.468	2	0.3972
Tiempo verduras	101.619	2	0.0062
Verduras cocidas	0.252734	1	0.12 00
Verduras crudas	0.145946	1	0.7024
Compra mercado	545.695	1	0.0195
Compra supermercado	0.00831485	1	0.9273
Compra tercena	150.065	1	0.2206
Compra tienda	324.531	1	0.1130
Compra verduras merca	0.210184	1	0.1168
Comunas	167.099	11	0.1556
Carne asada	20.167	1	0.0718
Carne cerdo	324.103	1	0.1130
Carne cocida	251.229	1	0.0789
Carne frita	551.512	1	0.05163
Carne pollo	0.421263	1	0.4056
Carne res	0.691633	1	0.0716

Likelihood Ratio Tests

En cuanto a comuna, no se encontró diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, existe la misma probabilidad de contraer la enfermedad en cualquier comuna.

Modelo de regresión logística

Variable dependiente hace referencia al resultado positivo o negativo a la enfermedad.

Factores o variables independientes:

Edad de las personas Género
 Comuna Tenencia de Mascotas
 Consumo de pescado, cerdo, res, y pollo.
 Consumo de carne asada, carne frita, cocida

Consumo de verduras cocidas y crudas
 Compra de la carne en la mercado, tercena o supermercado
 Compra de verduras en el supermercado, tienda o mercado
 Tiempo de cocción de carnes
 Tiempo de cocción de verduras

Según el modelo estadístico de regresión logística de la tabla número 1, se consideran con significancia estadística valores con p menor que 0.05, entre los cuales se encontró que son: el consumo de carne frita, la compra de verduras en el mercado y el tiempo de cocción de las verduras. Estos valores con significancia estadística se compararon con la tabla 2 donde se aplicó la siguiente fórmula, para realizar una adecuada interpretación.

No de riesgo = 1/OR

Carne frita: $1/0,0063 = 15,87$

Compra carne en el mercado: $1/0,043 = 23,23$

Tiempo de cocción de verduras 10 a 15 min:

$1/0,089 = 11,158$

Por lo anterior, se afirma que consumir carne frita es un factor de riesgo para contraer la parasitosis por *Sarcocystis sp*, ya que es 15,87 veces más riesgoso que consumirla en otra preparación. La compra de verduras en el mercado, también se constituye en un factor de riesgo puesto que es 23,2 veces más riesgoso comprarlas en el mercado que en el súper mercado o en la tienda, de igual manera, la cocción de las verduras es un factor de riesgo ya que es 11,15 veces más riesgoso consumir las verduras cocinadas de 10 a 15 minutos que más de 15 minutos.

De los 20 casos negativos para parasitosis, 14 consumen carne cocinada por lo que se puede pensar que el cocinar la carne disminuye el riesgo de contraerla, puesto que a más de 60 °C el parásito muere. Además, un factor de riesgo considerado con significancia estadística dentro del estudio, es el consumo de carne frita, que podría indicar que la temperatura necesaria para destruir el parásito con el modo de preparación sea correcta, pero no se realiza en el tiempo requerido.

CONCLUSIONES

Con base en el estudio y los resultados obtenidos con la prueba de inmunofluorescencia en la determinación de *Sarcocystis* y de ELISA para la detección de *Sarcocystis* se puede concluir:

1. El 100% de las personas muestreadas presentan *Sarcocystis* en materia fecal, por lo que la tasa de prevalencia es igual a 100% que indica que todos son portadores y que además eliminan el parásito al medio ambiente contaminando con sus eyecciones.

2. De los 95 casos enviados al laboratorio 75 fueron positivos a la prueba de ELISA para *Sarcocystis* en sangre, por lo cual la prevalencia estimada es de 78,94%.
3. Es una enfermedad subdiagnosticada, en el desarrollo diario de la medicina humana.
4. De los 95 casos analizados el porcentaje de prevalencia para las mujeres es de 45,3% y para el género masculino fue de 54,7%.
5. Los factores de riesgo para la infestación con *Sarcocystis* son: consumir carne frita, comprar verduras en el mercado y cocción de verduras en tiempos inferiores a 15 minutos
6. La población humana de la ciudad de Pasto esta en alto riesgo ya que esta enfermedad es zoonótica y se adquiere por el consumo de carne contaminada bovina y porcina.

RECOMENDACIONES

1. Realizar campañas de educación para los habitantes del área urbana de la ciudad de Pasto, empezando por las comunas de mayor prevalencia, donde se les explique de manera didáctica que el hombre es huésped definitivo e intermediario lo que conlleva a que sea la fuente principal de contaminación.
2. Fomentar y desarrollar adecuados hábitos de higiene para prevenir el contagio y transmisión de este parásito.
3. Realizar campañas de capacitación a los profesionales de la medicina humana en cuanto al diagnóstico de enfermedades zoonóticas
4. Insistir en adecuados hábitos de higiene en la preparación de las comidas como un buen aseo de las manos antes de manipular los alimentos,

lavar bien las frutas verduras y demás alimentos que puedan consumirse crudos y adquirirlos en lugares seguros

5. Consumir las carnes previamente congeladas por tres días a una temperatura de menos 20°C o en su defecto realizar la cocción a 60°C por 20 minutos ya que así el parásito muere.
6. Realizar un estudio mas detallado en personas menores de 15 años porque en la muestra, este grupo de edad quedó poco representado.
7. Proponer al Instituto Departamental de Salud, la Alcaldía en conjunto con la Universidad de Nariño, el establecimiento de un laboratorio o centro de investigación de enfermedades zoonóticas para continuar con este tipo de investigaciones que muchas veces pasan desapercibidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Atias, Antonio. Parasitología médica. Santiago de Chile: Publicaciones técnicas Mediterránea, 1991. p. 156.
2. Azumendi, José Luis. Enfermedades relacionadas con el *Sarcocystis*. Bogota: Diseño y recursos gráficos, 1997. p. 16.
3. Azumendi, J. L., op. cit., p. 16.
4. Ministerio de salud Colombia. Manual de enfermedades zoonóticas. Santa Fe de Bogota: El ministerio, 1999. p. 87.
5. Cadavid, Lascario y Erazo, Holman. Prevalencia de *Sarcocystis* en caninos en la vereda Gualmatan, corregimiento de Calambuco Dpto. de Nariño. Pasto, 2001, 15 p. Trabajo de grado (Medico Veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Departamento de Salud Animal.
6. Benavides, Katia y viteri, Néstor. Prevalencia de *Sarcocystis* en bovinos sacrificados en el matadero frigovito de San Juan de Pasto Nariño. Pasto, 2001, 50 p. Trabajo de grado (Medico Veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Departamento de Salud Animal.
7. Burbano, Leidy y unigarro, Julia. Prevalencia de *Sarcocystis* sp mediante prueba de tripsinación en porcinos sacrificados en el frigorífico Jongovito de San Juan de Pasto Nariño Colombia. Pasto, 2005, 89 p. Trabajo de grado (Medico Veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Departamento de Salud Animal.
8. Aguirre, María y cárdenas, Silvio. Prevalencia de *Sarcocystis* en felinos en el área urbana de la ciudad de Pasto mediante la técnica de disolución en éter. Pasto, 2005, 17 p. Trabajo de grado (Medico Veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Departamento de Salud Animal.
9. Cadena, Esteban y López, Erika. Determinación de la zarigüeya (*Didelphys marsupiales*) como posible hospedador definitivo del *sarcocystis* sp, agente etiológico de la mieleoencefalitis protozoaria equina, mediante análisis de laboratorio en muestras obtenidas en el área rural del municipio de Tumaco, vereda Vuelta Larga, departamento de Nariño. Pasto, 2005, 14 p. Trabajo de grado (Medico Veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Departamento de Salud Animal.
10. Atias, Antonio. Parasitología médica. Santiago de Chile: Publicaciones técnicas Mediterránea., 1991. p. 156.
11. Departamento administrativo nacional de estadística DANE, Pasto marzo de 2005.
12. Azumendi Olló José Luis, Director de la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos (FUNCEP). Carta. Pasto 14 de marzo de 2005
13. Azumendi Olló José Luis, carta op. cit.,
14. Thrusfield, Michael. Epidemiología Veterinaria. Zaragoza: Acribia, 1990. p 42.

