



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

“PREVALENCIA DE *Burkholderia mallei* en *EQUINOS Equus caballus* CON ELISA DE DOBLE ANTÍGENO”

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Médica Veterinaria

AUTORA: BERNARDA MARICELA MOLINA RUILOVA

TUTOR: ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA, MSc.

Cuenca - Ecuador

2022

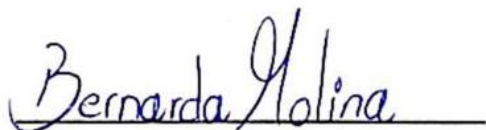
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Bernarda Maricela Molina Ruilova con documento de identificación N° 0105259907,  
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad  
Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el  
presente trabajo de titulación.

Cuenca, 24 de octubre del 2022

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink that reads "Bernarda Molina". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Bernarda Maricela Molina Ruilova

0105259907

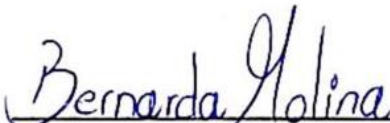
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Bernarda Maricela Molina Ruilova con documento de identificación N° 0105259907, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Prevalencia de *Burkholderia mallei* en equinos *Equus caballus* con ELISA de doble antígeno”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médica Veterinaria, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 24 de octubre del 2022

Atentamente,



Bernarda Maricela Molina Ruilova

0105259907

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mauricio Xavier Salas Rueda con documento de identificación N° 0603329681, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “PREVALENCIA DE *Burkholderia mallei* en *EQUINOS Equus caballus* CON ELISA DE DOBLE ANTÍGENO”, realizado por Bernarda Maricela Molina Ruilova con documento de identificación N° 0105259907, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 24 de octubre del 2022

Atentamente,



---

Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda, MSc.

0603329681

## **DEDICATORIA**

Dedico el siguiente trabajo a Dios por ser el centro de mi vida y a quien retribuyo toda la gloria de mis metas cumplidas; a nuestro director de carrera Dr. Garnica por ayudarnos a resolver los problemas cuando se presentaron; a mi tutor Ing. Salas por siempre ser dedicado y comprensivo por los problemas contra reloj que se presentaron al realizar el presente trabajo; al Dr. Masache, la Dra. Brito por ser excelentes profesores y amigos en todo tiempo.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer sobre todo a Dios que siempre fue mi apoyo y mi sustento, haciendo presencia de su persona en cada pequeño rincón en todos estos años estudiando en esta carrera; a mis hermanos; David Molina y Elizabeth Molina y padres Fernando Molina y Maricela Ruilova ,que siempre tuvieron palabras de aliento cuando los momentos eran más bajos y llenos de ansiedad y estrés; a mi tutor Ingeniero Mauricio Salas por ser un apoyo y exigirme trabajar con el tiempo en contra; mis profesores que supieron cuando ayudar, cuando exigirnos un poco más para alcanzar la excelencia como profesional y cuando ser amigos sin descuidar sus deberes como tutores; a mis amigos: Karla, Daniel, Sebastián y Geovanny por alivianar la presión de la universidad pasando buenos ratos y por ser en muchas de las ocasiones maestros que enseñaban cuando tenía dudas; a mi Familia por haber escuchado cuando necesitaba decir algo y animándome recordando que Dios siempre tiene el control.

## INDICE GENERAL

RESUMEN: .....	13
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Problema.....	15
1.2 Delimitación.....	16
1.3 Explicación del problema.....	16
1.4 Objetivos .....	17
1.4.1 Objetivo general.....	17
1.4.2 Objetivos específicos .....	17
1.5 Hipótesis.....	17
1.6 Fundamentación teórica .....	17
2 REVISION Y ANALISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL.....	18
2.1 El Caballo.....	18
2.2 Parámetros fisiológicos del caballo.....	18
2.2.1 Temperatura .....	18
2.2.2 Frecuencia Cardiaca .....	19
2.2.3 Llenado capilar.....	20
2.2.4 Frecuencia respiratoria.....	20

2.3	Fisiología del sistema respiratorio del caballo .....	21
2.4	Principales patologías infectocontagiosas del equino .....	22
2.4.1	Adenovirus equino .....	22
2.4.2	Virus del Nilo occidental .....	22
2.4.3	Rinitis equina .....	23
2.4.4	Brucelosis equina .....	23
2.4.5	Mieloidosis.....	23
2.4.6	Salmonelosis .....	24
2.4.7	Talasemia .....	24
2.4.8	Fiebre Q .....	24
2.4.9	Anemia infecciosa equina .....	25
2.4.10	Influenza equina.....	25
2.5	Bacterias gram negativas.....	26
2.6	Generalidades del Muermo´ .....	27
2.7	Historia del Muermo .....	28
2.8	Epidemiología del Muermo.....	28
2.9	El Muermo en el Ecuador.....	29
2.10	Características microbiológicas de la <i>Burkholderia mallei</i> .....	29
2.11	Zoonosis .....	30
2.12	Patogenia del Muermo .....	30



2.13	Sintomatología en el equino.....	31
2.14	El muermo en el Ser humano .....	31
2.15	Sintomatología en el ser humano .....	32
2.16	Diagnóstico del muermo .....	33
2.16.1	Diagnostico diferencial .....	33
2.16.2	Diagnóstico clínico .....	33
2.16.3	Diagnóstico definitivo.....	33
2.16.4	Diagnostico post mortem .....	34
2.17	Tratamiento .....	34
2.18	Control.....	35
2.19	ELISA.....	36
2.20	Tipos de ELISA.....	36
2.21	ELISA de Doble antígeno .....	36
2.22	Resumen del estado del arte del estudio del problema.....	37
3	MATERIALES Y METODOS.....	38
3.1	Diseño.....	38
3.2	Materiales.....	38
3.2.1	Físicos .....	38
3.2.2	Biológicos .....	39
3.2.3	Diseño experimental .....	40

3.3	Población y Muestra.....	40
3.4	Estadística.....	40
3.5	Toma de muestras.....	41
3.6	Prueba ELISA de doble antígeno.....	41
3.6.1	Preparación de la muestra.....	41
3.6.2	Preparación de la solución de lavado.....	41
3.6.3	Procedimiento para realizar la técnica de ELISA de doble antígeno.....	42
3.6.4	Validación y análisis de resultados.....	43
3.7	Operalización de variables.....	43
3.8	Consideraciones éticas.....	44
4	RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
4.1	Discusión.....	45
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
5.1	Conclusiones.....	47
5.2	Recomendaciones.....	47
6	BIBLIOGRAFÍA.....	48
7	APENDICE/ANEXOS.....	52

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Materiales de oficina</i> .....	38
Tabla 2 <i>Materiales de campo</i> .....	39
Tabla 3 <i>Materiales biológicos</i> .....	39
Tabla 4 <i>Estatus de pruebas de ELISA</i> .....	43
Tabla 5 <i>Variable dependiente</i> .....	44
Tabla 6 <i>Variable independiente: animales</i> .....	44
Tabla 7 <i>Interpretación S/P% machos</i> .....	45
Tabla 8 <i>Interpretación S/P% hembras</i> .....	45

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> ELISA Sándwich .....	37
--------------------------------------	----

**RESUMEN:**

En el siguiente documento encontraremos un trabajo que se dedicó a calcular la prevalencia de la enfermedad del muermo "*Burkholderia mallei*" en equinos en el cantón Cuenca y sus alrededores, puesto que el Ecuador carece de información sobre esta patología. El estudio se realizó en ejemplares con muestras de sangre de un grupo finito para evaluar mediante una prueba ELISA de doble antígeno. El muermo "*Burkholderia mallei*" es una enfermedad infecciosa de tipo zoonótica, considerada como una enfermedad reemergente por el aumento de casos en los últimos 20 años y debe su éxito principalmente a la falta de información y de forma secundaria por el clima que apremia a la prevalencia en el medio aquí en Sudamérica. Desde que la enfermedad fue descubierta en Brasil hace un par de décadas pocas han sido las medidas tomadas por países vecinos en comparación, medidas de bioseguridad adoptadas en países como Uruguay y el mismo Brasil a investigaciones de casos sospechosos en Chile y Perú. Como podrán ver a continuación la evaluación da como resultado una prevalencia del 0%, existe un caso con resultado negativo de alta reactividad a los anticuerpos de la prueba de ELISA de doble antígeno que se usó para evaluar el suero sanguíneo, lo que sugiere una sospecha de desafío de campo sin embargo se deberá probar con una muestra más grande.

## ABSTRACT

In the following document we will find a work that was dedicated to calculating the prevalence of glanders disease "*Burkholderia mallei*" in equines in the canton of Cuenca and its surroundings, since Ecuador lacks information on this pathology. The study was performed on specimens with blood samples from a finite pool for evaluation by a double antigen ELISA test. The glanders "*Burkholderia mallei*" is a zoonotic infectious disease, considered a re-emerging disease due to the increase in cases in the last 20 years and owes its success mainly to the lack of information and secondarily to the climate that urges the prevalence in the environment here in South America. Since the disease was discovered in Brazil a couple of decades ago, few measures have been taken by neighboring countries in comparison, from biosafety measures adopted in countries like Uruguay and Brazil itself to investigations of suspected cases in Chile and Peru. As you can see below, the evaluation results in a prevalence of 0%, there is a case with a negative result of high reactivity to the antibodies of the double antigen ELISA test that was used to evaluate the blood serum, which suggests a suspicion field challenge however should be tested with a larger sample.

## 1. INTRODUCCIÓN

El muermo es una enfermedad con el agente causal de la bacteria *Burkholderia mallei*, es de naturaleza zoonótica e infectocontagiosa; se caracteriza por las lesiones nodulares hasta ulcerativas que puede presentar en las vías respiratorias y la piel.

El ser humano rara vez se encuentra afectado en su salud por esto, sin embargo, si son algunos los casos de un brote importante que amenazo a una población, pero en general están más involucrados los que se dedican a trabajar con caballos, como veterinarios, criadores y sus empleados; es más grave la manera en que afecta el sector económico ya que actualmente no existe un tratamiento efectivo contra la infección.

La forma crónica tiene un degeneramiento progresivo que puede durar varios años sirviendo como foco de infección, sus signos clínicos son leves, con fiebre baja e intermitente, pero con un desarrollo constante de lesiones características en la forma cutánea que lleva a un debilitamiento general progresivo, en algunos casos los animales pueden presentar inflamación de articulaciones, claudicación, hematuria, poliuria, diarrea, orquitis y epistaxis. (Barrandeguy y Crossino, 2019)

### 1.1 Problema

El muermo es una enfermedad que tiene gran recorrido en la historia, nunca se le consideró de baja importancia, hasta fue utilizada como un arma biológica y debido al riesgo se buscó erradicarla cuanto antes, si bien hay registros de su desaparición otros nuevos serían escritos años después alertando de su regreso. (Bossi. 2004)

Tal fue el caso en Brasil en 1999 cuando en un estudio experimental se descubrió que la enfermedad de la *Burkholderia mallei* se encontraba extendiéndose desde un establo en el estado

de Pernambuco, la falta de información permitió que la enfermedad no sea detectada y el clima tropical característico de casi toda América del sur permitió que sobreviviera por años. (Salazar, Tascon, Palacio, Vélez, Ocampo, Ulloa, y Rodríguez, 2018)

## 1.2 Delimitación

### 1.2.1 Espacial

La investigación se realizó en el cantón de Cuenca, Azuay, Ecuador y sus alrededores, con unas coordenadas referenciales de: 2°54'40" S 78°58'27" W.

### 1.2.2 Temporal

El tiempo que se invirtió para realizar esta investigación experimental fue de 400 horas.

### 1.2.3 Académica

El área académica ocupada por el presente trabajo se encuentra en el área de la Sanidad Animal.

## 1.3 Explicación del problema

Como este caso pueden existir muchos que podríamos estar ignorando y así los registros digan lo contrario a la posible presencia de esta enfermedad no lo sabemos con certeza por que hasta la fecha no existen trabajos de investigación dedicados al tema. Uruguay estableció sus parámetros de precaución y realizó su propio estudio para asegurarse de estar libre de muermo, no está demás que nosotros hagamos lo mismo. (Cajes Bidart, 2016).

¿Cuáles serían las consecuencias de ignorar un posible problema así?, probablemente iríamos por el mismo camino que aquel caso en Brasil, ¿y si no y resulta que obtenemos positivo en su prevalencia en nuestro territorio?, pues nos dará una oportunidad de actuar pronto y el caso que



sería más popularmente aceptado, es una prevalencia igual a cero que nos dará la certeza de la sanidad de nuestros equinos y personal dedicado a ellos. (Cajes Bidart, 2016).

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de *Burkholderia mallei* mediante la técnica de ELISA con doble antígeno en la provincia del Azuay.

### 1.4.2 Objetivos específicos

Detectar anticuerpos dirigidos contra la *Burkholderia mallei* en caballos con suero sanguíneo mediante la técnica de ELISA con doble antígeno.

Calcular la prevalencia de *Burkholderia mallei* en equinos de la provincia del Azuay

## 1.5 Hipótesis

### 1.5.1 Hipótesis alternativa.

H1: La prevalencia de *Burkholderia mallei* en los equinos de la provincia del Azuay es alta.

### 1.5.2 Hipótesis nula.

H0: La prevalencia de *Burkholderia mallei* en los equinos de la provincia del Azuay es baja.

## 1.6 Fundamentación teórica

En el siguiente trabajo se buscó empezar con un registro de la prevalencia de *Burkholderia mallei* en el cantón de Cuenca-Ecuador y sus alrededores con el fin de dar a conocer sobre la enfermedad, pero sobre todo su prevalencia en el sector donde la investigación se dio a cabo.

## 2 REVISION Y ANALISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL

### 2.1 El Caballo

El caballo "*Equus caballus*" es un mamífero ungulado perisodáctilo, es decir que posee extremidades que terminan en dedos impares, que ha compartido la historia del ser humano desde hace varios siglos en donde vemos un constante cambio y adaptación según las necesidades que el hombre ha tenido. (Scott y Martín, 2016).

A diferencia de la actualidad, el caballo fue un animal muy importante en cuanto a trabajo, transporte y apoyo se trata, su participación a la hora de trabajar la tierra, como parte de los ejércitos de defensa o conquista y facilitando la vida sedentaria como animal de carga, hoy en día el caballo se le considera una herramienta recreativa, varios son los programas de equino terapia, dentro de la industria del entretenimiento como exhibiciones o concursos de salto y siendo participes de operativos de autoridad nacional para control de masas. (Scott y Martín, 2016).

La crianza de esta especie se ha vuelto una actividad popular que se encuentra en constante evolución a tal punto de aislar los ejemplares más finos y caros, invirtiendo millones de dólares en la crianza, domesticación, reproducción he importación de ejemplares; el mercado alrededor de todo el mundo está en constante movimiento debido a este hecho, lo cual significa una puerta abierta para el transporte de patógenos y distribución de enfermedades infecciosas. (Scott y Martín, 2016).

### 2.2 Parámetros fisiológicos del caballo

#### 2.2.1 Temperatura

La temperatura usual corporal de un caballo es entre 99.5°F y 101.5°F. La temperatura de un caballo puede alterar a lo extenso del día debido a componentes internos y del medio como

puede ser el ejercicio, excitación, clima caliente, dolor y patología. Cuando la temperatura llega a 102°F, el caballo tiene una fiebre baja. Una fiebre moderada es de 104°F y una fiebre alta es de 106°F. Si la temperatura asciende arriba de 106°F, el caballo está muy enfermo. La esperanza de recuperación de un caballo con esta temperatura tan alta es bastante baja ya que entran en shock, siempre hay que tener la precaución de tomar la temperatura del animal regularmente para determinar cuál es la temperatura común como individuo. Si la temperatura está por encima de 101°F, puede ser señal de precaución, dependiendo de qué es lo usual para aquel caballo. (Scott y Martín, 2016).

Un termómetro veterinario es eficaz para tomar la temperatura de un caballo, el mercurio debería estar al nivel de 95 a 97°F. Meter el bulbo del termómetro en un lubricante limpio como vaselina hace la inserción más simple. Los caballistas constantemente toman la temperatura de caballos por el recto. Se debería cuidadosamente insertar el termómetro del lado del bulbo primero en el recto. Sujetar con el cordón a la cola del caballo es una precaución para no perder el termómetro. La mayoría presentan la temperatura alrededor de al minuto que están en el recto, no obstante, un lapso de tres min es más preciso y debería ser suficiente en todos los casos, se remueve el termómetro cuidadosamente y se limpia, no olvidar lavar el termómetro con jabón y agua gélida, después se mete en una solución sanitizante y se enjuaga otra vez. Botar o agitarlo puede afectar su confiabilidad, es mejor evitar hacerlo. (Scott y Martín, 2016).

### 2.2.2 Frecuencia Cardiaca

La frecuencia cardiaca es más rápida en caballos adolescentes que en adultos. Los caballos clásicos poseen un ritmo entre 28 a 40 latidos por minuto, mientras que el de potros recién nacidos es entre 80 a 120, potros mayores entre 60 y 80, y de un año entre 40 y 60 latidos por minuto. Para establecer un ritmo de corazón más preciso, el caballo debería estar calmado, gélido, descansado

y relajado ya que el ejercicio, excitación, temor y clima caliente tienen la posibilidad de incrementar el ritmo cardíaco. Un caballo enfermo puede tener un ritmo de corazón de 80 a 120 latidos por minuto por períodos largos. Para determinar el pulso se puede presionar los dedos contra la arteria o usar un estetoscopio, el mejor sitio para descubrir el latido del corazón con un estetoscopio es detrás del codo izquierdo del caballo, es la mejor forma de saber la condición física después de ser sometido a ejercicio, el ritmo volverá a regular de 15 a 1 hora luego de entrar en reposo. Los Caballos en pruebas de resistencia y carreras a campo traviesa en buena condición llegan al puesto de control con ritmos de corazón de 125 latidos por minuto o más, todavía hasta 200 latidos por minuto. Dichos caballos usualmente se recuperan a menos de 70 latidos por minuto de 10 a 15 min después. Caballos que ejercitan estrenuamente tienen la posibilidad de conseguir ritmos de 240 a 250 latidos por minuto. (Scott y Martín, 2016).

### 2.2.3 Llenado capilar

El tiempo de llenado capilar de un caballo sano es alrededor entre 3 a 5 segundos, esto puede ser evaluado al analizar las encías del caballo. Utilizando su dedo pulgar, presione las encías del caballo con presión suficiente para que el tejido pierda color, quite la presión y el color usual del tejido de la encía debe volver en alrededor entre 3 a 5 segundos. Si el color no regresa en el tiempo detallado, vuelva a hacer la prueba en el animal. Si la era de llenado capilar continúa siendo despacio, debería consultar con un veterinario. (Scott y Martín, 2016).

### 2.2.4 Frecuencia respiratoria

El ritmo usual de respiración de un caballo es de 8 a 16 respiraciones por minuto. Las respiraciones se triplican una vez que el caballo camina y si se ejercita ampliamente en temperaturas altas, el ritmo puede incrementar a 120 respiraciones por minuto; en un caballo con buena condición física, el ritmo debería reducir a 40 o 50 respiraciones por minuto en un tiempo

de 10 o 15 minutos. El ratio del ritmo del corazón al ritmo de respiración en caballos es habitualmente alrededor de 4:1. Aquello desea mencionar que el corazón late 4 veces por cada respiración que toma el caballo. Si el ritmo de respiración es más elevado que el ritmo del corazón podría presentar un problema severo, se debería parar y descansar hasta que la condición se enmiende por sí misma. Si la condición no se corrige por sí misma, es necesario llamar al veterinario. Cualquier tipo de sufrimiento como: dolor, fiebre, toxicidad, patología o trabajo tienen la posibilidad de aumentar el ritmo de respiración, si este se encuentra muy por encima de lo normal sin razón aparente es una clara señal de dolor. (Castejón, 2018).

Para establecer el ritmo de respiración uno puede mirar los costados del caballo o las fosas nasales. El vientre asciende y baja con cada respiración lo cual causa que los costados se muevan hacia adentro y hacia el exterior. Las fosas nasales se expanden y contraen con cada respiración. Colocar la mano enfrente de las fosas nasales del caballo puede ayudarle a determinar cuán seguido respira el caballo. (Castejón, 2018).

### 2.3 Fisiología del sistema respiratorio del caballo

El sistema respiratorio del caballo se caracteriza por tener un volumen pulmonar doble y un área de trueque de gas 1.6 veces superior al bovino, que tiene un tamaño parecido al caballo. De igual manera tiene una ventilación nasal impuesta, lo cual supone una virtud que tienen los herbívoros al poder ingerir y olfatear el alimento para identificarlo de manera simultánea, De esta forma como la función de notar a un viable predador. En otros términos, posible por la disposición anatómica del paladar blando que está en estrecho contacto con la base de la laringe, con lo cual no es posible la comunicación entre orofaringe y nasofaringe. El registro espirométrico nos da el tamaño de diferentes parámetros respiratorios. El caballo en reposo mueve 60 litros de viento por

minuto, que puede incrementar con el ejercicio profundo hasta 1400-1800 L/min, y con el ejercicio más alto hasta 3000 L/min.

La frecuencia respiratoria se incrementa a partir de 12 rpm en reposo hasta 120 en ejercicio. En el caballo la frecuencia respiratoria a lo largo del galope está ligada al tranco del caballo para mejorar su efectividad, de tal forma que el caballo inspira a lo largo de la fase de suspensión y expira a lo largo de la etapa de apoyo. Esto hace que a lo largo del galope los aumentos del volumen minuto se realizan preferentemente a expensas de aumentos del volumen corriente o volumen tidal. (Castejón, 2018).

## 2.4 Principales patologías infectocontagiosas del equino

### 2.4.1 Adenovirus equino

El adenovirus es una enfermedad que afecta más a potrillos menores de 3 meses, colonizando las vías respiratorias superiores; presentan síntomas como tos, disnea, conjuntivitis y fiebre, la enfermedad puede durar hasta 7 semanas, desde un punto de vista patológico se puede llegar a observar atelectasia de pulmón, exudado mucoide muy espeso e inflamación serosa de ganglios linfáticos; entre las razas más susceptibles se encuentra la árabe aunque de pasar los 4-5 meses de edad los síntomas respiratorios se presentan de manera más suave. (Berríos, 2005)

### 2.4.2 Virus del Nilo occidental

El virus del Nilo Occidental (VNO) pertenece a la familia *Flaviviridae* y es similar a otros flavivirus transmitidos por artrópodos causantes de encefalitis, es transmitido por mosquitos hembra que infecta aves, equinos y humanos. Su expansión ha ocurrido rápido a través de EE. UU. y Canadá, y desde estos a diferentes países de América y el Caribe. La vigilancia epidemiológica en aves y equinos ha demostrado su amplia circulación en México, el Caribe, Centro América y Sur América. La mayoría de los aislamientos virales han sido a partir de mosquitos, aves y

mamíferos la minoría a partir de muestras humanas. En los caballos se presentan signos clínicos como la pérdida de apetito, claudicación, depresión, contracción muscular, parálisis, pérdida de la vista, dolor de cabeza, convulsiones, debilidad en miembros posteriores y tienden a caminar el círculo. (Pupo, Cabrera, Vázquez, Drebot, Andonova, Dickinson, y Santos 2011).

#### 2.4.3 Rinitis equin

El serotipo que se encuentra en el medio es el ERBV-3 disuelto en Australia, Japón y Reino Unido, la transmisión se propaga por secreciones nasales o de forma indirecta por aerosoles. Los signos dan lugar a fiebre, secreción nasal, anorexia y edema en miembros distales. Existe una vacuna de prevención con licencia no oficial en Estados Unidos, sin embargo, no se produce de manera comercial. (Sellon y Long, 2013).

#### 2.4.4 Brucelosis equina

También conocida como mal de Cruz, es una enfermedad que consiste en una bursitis supurativa con alta secreción, pus amarillento y muchas veces complicada por la artritis. Como su nombre lo indica se encuentra en la regio topográfica de la cruz, como agente causal se encuentra la *Brucella abortus*. (Amasino , 2010).

#### 2.4.5 Mieloidosis

Es una infección que tiene como agente causal una bacteria gramnegativa llamada *Burkholderia pseudomallei*, originaria del sur de Asia y norte de Australia. La gravedad en este caso es que tiene una alta capacidad de infección por sus características al moverse por agua y suelo contaminados, otras vías puede ser la inhalación o la ingestión. Aunque su periodo de incubación no pasa de los 21 días esta podría no manifestar síntomas o complicación hasta 62 años después de haberse contagiado. Algunos de los síntomas presentados en los caballos son la fiebre,

septicemia, edema, diarrea y muerte dentro de las primeras 24 h. (Andersen, Mackay, y Ryan, 2016).

#### 2.4.6 Salmonelosis

La salmonelosis tiene una agente causal de tipo bacteria gramnegativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, esta clase de organismos atacan principalmente el tubo digestivo, desencadenando infecciones con variabilidad clínica en cuanto a su sintomatología. Los caballos tienden a presentar cuadros diarreicos y rara vez evolucionan a cuadros sépticos; es necesario que de tener un espécimen infectado se apliquen las correctas normas de bioseguridad al manejar las deposiciones, en algunos casos el animal se recupera, pero queda como portador asintomático. (Terrier y Martínez, 2006).

#### 2.4.7 Talasemia

O fiebre de los conejos es causada por una bacteria llamada *Francisella tularensis*, la sintomatología puede variar de leve a severa y permanecer en los órganos de los animales contaminados por mucho tiempo. La transmisión se da por todo medio, agua, aire, aerosol, superficies contaminadas o por ingesta de carne de animales enfermos. Entre la sintomatología podemos encontrar erupción cutánea, inflamación de ojos, tos, dolor, trastornos respiratorios y neumonía. (Evans, Gregory, Schaffner, y McGee, 1985)

#### 2.4.8 Fiebre Q

Es una enfermedad causada por una bacteria llamada *Coxiella burnetii*, tiene gran capacidad de infección entre mamíferos, aves, reptiles e incluso artrópodos, a pesar de esto no se trata de una enfermedad que afecte de gravedad a los animales, a excepción de fiebre, dolor de cabeza, fatiga o malestar, lo que realmente importa es que provoca abortos y mortinatos. (Roca, 2007)



#### 2.4.9 Anemia infecciosa equina

En la anemia infecciosa equina (AIE) se han señalado los cursos agudo, subagudo y crónico, pudiendo también presentarse animales infectados asintomáticos (formas latentes). Algunos animales pueden haber tenido antecedentes clínicos de AIE y presentar aparente normalidad, en forma espontánea o provocada, por tratamiento de los síntomas ya que aún no se conoce la existencia de tratamiento específico. La AIE es una enfermedad que, a medida que transcurre, suele originar crisis revelables. El descubrimiento de los animales asintomáticos no es sencillo aunque ahora su hallazgo se ha simplificado aplicando el método de Coggins-Norcross (C-N), debe recordarse que el descubrimiento de animales asintomáticos mediante inoculaciones experimentales a equinos tiene varias exigencias, entre éstas que si el material infectante es suero sanguíneo y la dosis no es apropiada (puede requerirse una tan voluminosa como de unos 100 CC.) los resultados pueden ser negativos; que a veces se requiere el empleo de volúmenes elevados de sangre total siendo mejor que aplicar suero sanguíneo solo; que se requieren animales susceptibles que se haya demostrado que no están infectados con virus AIE, por lo que se debe ser precavido al emplear animales procedentes de áreas donde la AIE es prevalente. Los animales inoculados, a su vez, deberán controlarse cuidadosamente, en ambientes adecuados, pudiendo ocurrir que no necesariamente en todos los casos se produzca la reproducción de la enfermedad con típicas evidencias extraserológicas. (Monteverde, 1974).

#### 2.4.10 Influenza equina

El virus Influenza afecta a équidos de todas las razas y edades, aunque es más típico de caballos jóvenes sin historia de vacunación previa. Tiene un periodo de incubación corto, los caballos comienzan con signos de fiebre y excreción de grandes cantidades de virus en secreciones nasales a las 48 horas post-infección. Son frecuentes las infecciones bacterianas secundarias. La

tasa de morbilidad puede ser del 20% hasta el 90%, con tasas de mortalidad menores del 1%. Pueden ocurrir brotes en cualquier época del año, aunque se ha visto una cierta estacionalidad ligada a la convergencia de factores de riesgo (reuniones de caballos, tiempo frío, etc.). La infección se produce por contacto directo con caballos infectados, transmisión de gotas de secreciones nasales por la tos y por vía aérea. El virus tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes húmedos durante 72 horas y en ambientes secos durante 48 horas. Tras la infección, los caballos excretan virus durante 6-7 días. Los caballos con inmunidad parcial pueden tener infección subclínica y pueden excretar virus. (Berríos, 1986)

## 2.5 Bacterias gram negativas

Se denominan bacterias Gram negativas a los microorganismos que tienen una reacción con la tinción Gram en su pared celular diferente a las Gram positivas, pues no se tiñen de color azul oscuro o violeta, sino de color rosa.

Las bacterias Gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas. (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

Hay muchas especies de bacterias Gram negativas, agrupadas en varias familias y existen diferentes formas de clasificarlas según su: forma, óptimo de temperatura, pH en el que se desarrollan, requerimiento de oxígeno para poder permanecer con vida, ésta última clasifica a estos microorganismos en: bacterias aerobias estrictas, bacterias anaerobias estrictas y bacterias anaerobias facultativas. (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

La patogenicidad de estas bacterias se debe a la presencia de lipopolisacáridos en la parte externa de la membrana celular, estas moléculas desencadenan una respuesta inmune, pues su

antígeno genera un amplio espectro de efectos fisiopatológicos, que pueden desencadenar un shock endotóxico o incluso la muerte. (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

## 2.6 Generalidades del Muermo´

El muermo es una de las enfermedades infecciosas con data más larga a través de la historia; es contagiosa y zoonótica cuyo agente causal es la bacteria *Burkholderia mallei*, un bacilo gran negativo, aeróbico, inmóvil y capsulado. (Barrandeguy y Carossino, 2019)

Se caracteriza por presentar lesiones nodulares y ulcerativas en las vías respiratorias superiores y en la piel en donde pueden tener un periodo de incubación desde unos días a varios meses; gracias a las lesiones podemos identificar 3 formas clínicas de la enfermedad: nasal, pulmonar y cutánea; a su vez puede tratarse de un curso agudo (más común en burros) o crónico (refiriéndose a caballos en áreas endémicas). (Mangana-Vougiouka, 2013)

En la forma aguda podemos encontrar fiebre, pérdida de peso, disminución de apetito, depresión, tos, disnea y lesiones nodulares ulcerativas en los pasajes nasales; puede evolucionar a abscesos pulmonares y bronconeumonía, teniendo así un desenlace fatal a las pocas semanas de haberse infectado. (Barrandeguy y Crossino, 2019)

La forma crónica tiene un degeneramiento progresivo que puede durar varios años, sus signos clínicos son leves, con fiebre baja e intermitente, pero con un desarrollo constante de lesiones características en la forma cutánea que lleva a un debilitamiento general progresivo, en algunos casos los animales pueden presentar inflamación de articulaciones, claudicación, hematuria, poliuria, diarrea, orquitis y epistaxis. (Barrandeguy y Crossino, 2019)

## 2.7 Historia del Muermo

Desde un principio en la antigua Grecia se usó la palabra “muermo” para referirse toda enfermedad con secreción nasal aun sin saber su origen o naturaleza, por un tiempo se creía que estaba relacionado con una enfermedad parasitaria con gusanos como la dracunuculiasis, explicando así las protuberancias e hinchazones subcutáneas del muermo. (Hernando, López; 2019)

Fue un problema de gran impacto al ver las pérdidas que cobrara con los caballos del ejercito e impulso a los antiguos mariscales a escribir textos sobre la enfermedad al carecer de recursos para saber cómo tratarla o evitarla; fue gracias a esto que surgió la hipiátrica griega, una amplia obra que fue usada para los profesionales en la cría y tratamiento de los équidos con hasta 22 manuscritos diferentes, obra de 7 autores diferentes (Seró, Campos, Vallés, 2018)

Los textos de la hipiátrica griega describen los síntomas, los tipos de muermo que identificaban en ese entonces y el si podían ser curados con algún tipo de tratamiento que describen en sus recetas de pienso o bebidas, los manuscritos fueron traducidos a muchos idiomas y se aprecia este registro que ayuda a estudiar la enfermedad a los médicos veterinarios aun en tiempos modernos. (Seró, Campos, Vallés, 2018)

## 2.8 Epidemiología del Muermo

El muermo es una enfermedad de tipo zoonótica cosmopolita, es decir que amplio fue y es su distribución por el mundo, tiene una mortalidad de más del 95% en animales que carecen de un tratamiento y del 50% a ejemplares tratados, la morbilidad varia de un 5 a 30%. El periodo de incubación puede durar desde algunos días a meses dependiendo de la exposición al agente causal.

Lo que favorece como factores predisponentes es la insalubridad en fómites (espuelas, aperos, bocados, sillas, mantas, capas, jáquimas) y en instalaciones (pisos, bebederos, comederos, potreros, establos), alimento contaminado; establos sobrepoblados. Formas de Transmisión: Directa (contacto con exudados o secreciones respiratorias, inhalación de aerosoles, ingestión); Indirecta a través de fómites, y como especie sensible todos los equinos. (Mangana-Vougiouka, 2013)

## 2.9 El Muermo en el Ecuador

Como tal no existen trabajos que mencionen el muermo en nuestro país, no afirma si existe o se encuentra libre, sin embargo, fue por una situación similar que otro país sudamericano como Brasil pasó y actualmente se encuentra en un esfuerzo constante por erradicar la enfermedad.

## 2.10 Características microbiológicas de la *Burkholderia mallei*

Abarca lo que son bacilos gran negativos no formadores de esporas que varían su capacidad móvil dependiendo de la especie, habitan una amplia área dentro de la naturaleza entre el suelo, agua, tejidos vegetales y animales. (Espinosa, López, Carcaño, Serret, 2020)

Su capacidad de supervivencia es sobresaliente gracias a su característica de versatilidad nutricional y funcional, les permite ser biótropas (que dependen de otras células vivas para su desarrollo y cumplir su ciclo vital) o saprofitas (que pueden crecer y desarrollarse sobre tejido en descomposición); algunas especies recurren a relaciones simbiótico-mutualistas en su mayoría con plantas y otras una relación simbiótico-patogénica con plantas, animales o incluso el ser humano. (Espinosa, López, Carcaño, Serret, 2020)

## 2.11 Zoonosis

“*Zoon*” viene del griego que significa “animal”, comprende todo lo que son enfermedades infecciosas transmitibles de animal a hombre, los agentes involucrados son bacterias, hongos, virus, rickettsias y otros. (Dabanch, 2003)

Es bastante común la reincidencia de algunas enfermedades que están relacionadas con el cambio ecológico, climático, sociocultural y por la tenencia de mascotas, el contagio se da por contacto directo, ingestión, inhalación, intermediarios o mordeduras. (Dabanch, 2003)

Su distribución geográfica es tan amplia como sus más de 200 agentes etiológicos responsables de transmitir esta enfermedad, pero existen alternativas que podemos usar como bioseguridad, la convivencia con mascotas y otros animales de trabajo aporta una extensa gama de beneficios por lo que aislarnos no es una opción, las vacunas y métodos de prevención siempre pueden ser utilizados, pero no en todos los casos aplicados. (Dabanch, 2003)

## 2.12 Patogenia del Muermo

Inicia con la bacteria ingresando por vía oro-faríngea principalmente y excepcionalmente a través de lesiones cutáneas, colonizando y proliferando primero en los sitios de entrada en las mucosas del tracto digestivo (boca e intestino), en el tracto respiratorio (mucosa de la nariz, laringe, faringe y pulmones), excepcionalmente en la piel., luego evade el sistema inmunológico internándose al interior de las células (1. Destruir la célula en la fase aguda o 2. Encapsularse y entrar en una fase crónica) llega a diseminarse a través de la vía hemática y la vía linfática generando una septicemia o bacteriemia porque ha alcanzado algunos órganos y ganglios linfáticos. Si la bacteria decide Destruir la célula lo hace a través de la lisis celular principalmente en la mucosa respiratoria (Tejido alveolar) y piel. Se presentan los síntomas con la formación de

nódulos en las mucosas y ulceraciones en la piel, el daño en el tejido alveolar se intensifica generando una bronconeumonía, que conduce a la anoxia del animal, finalmente la muerte.

### 2.13 Sintomatología en el equino

Dependiendo de la localización del contacto primario las lesiones evolucionan de este punto al exterior conforme avanza la enfermedad; de forma nasal crecen nódulos y ulceraciones con un exudado espeso y amarillo que adquiere la forma de una estrella, puede avanzar hasta infectar los pulmones y formar nódulos en el tracto respiratorio inferior; otros síntomas más generalizados son la fiebre, disnea tos y pérdida de peso; los nódulos pueden extenderse a otros órganos como el hígado, bazo o riñones e incluso la piel.

Se lo puede resumir de dos formas la aguda: con fiebre alta, dolor, secreción nasal intensa, tos, y en algunas ocasiones aparición de úlceras en la piel y nariz, finalmente la muerte. Y la crónica que consta de 4 manifestaciones clínicas; pulmonar; rara vez, con tos, epistaxis, neumonía y respiración forzada; nasal; más común con lesiones nodulares que desencadena en úlceras desde los cornetes hacia los ollares de la nariz, estas lesiones pueden ser purulentas y sanguinolentas generando una mucosidad de color amarillento, esta descarga nasal en la mayoría de casos es unilateral. Cutánea con formación de nódulos en la piel que evolucionan a úlceras que secretan un exudado purulento de color miel. Y finalmente la de animales portadores asintomáticos.

### 2.14 El muermo en el Ser humano

Las epidemias de muermo en la especie humana ya han ocurrido gracias a la estrecha relación de supervivencia que las dos especies han tenido desde hace varios siglos, tal es el caso de una localizada en Ostiano (Italia), el origen fue una caballeriza que arrojaba animales contagiados, de 17 personas que frecuentaban la zona 11 enfermaron y murieron después de presentar cuadros clínicos similares y en concordancia con la sintomatología del muermo, hubo

más brotes después en Inglaterra que llevo a los científicos de la época a estudiar a los pacientes y asegurando que el muermo tiene una alta capacidad de contagio. (García y Moreno, 1988)

La forma más común de contagio es por contacto con équidos enfermos y pueden desencadenar de 4 formas diferentes: la septicémica con una muerte rápida de 7-10 días, pulmonar, aguda localizada (altamente mortífero) y crónica (que persisten por años). (Kouba, 2011)

En los últimos años se vio como una importante causa a la mortalidad del sudeste asiático y se reportaron más casos en Medio Oriente, África, Caribe y América. (Sakurada, 2017)

A excepción de unos pocos brotes importantes las personas contagiadas con esta enfermedad siempre son aquellas que se relacionan con animales con muermo, en su mayoría veterinarios. (Al-Ani, & Roberson, 2007) Hoy en día fue hace poco que el muermo se le califico como una enfermedad profesional relacionada a los médicos veterinarios.

#### 2.15 Sintomatología en el ser humano

Debido a que carece de signos patognomónicos puede ser confundida con otras enfermedades, nunca se ha de descartar un diagnóstico diferencial y prestar atención al patrón de los síntomas; neumonía (51%), infección al tracto urinario, piel, bacteriemia (55%), artritis séptica, osteomielitis, meningoencefalitis, mielitis, absceso cerebral, todo seguido de un shock séptico y una mortalidad del 50%. (Sakurada, 2017) otros síntomas que nos pueden ayudar a la detección es la secreción nasal crónica, agrandamiento de los ganglio linfáticos y submaxilares, presencia de pústulas o úlceras en las piernas y otras partes del cuerpo. (McGilvray, 1944).



## 2.16 Diagnóstico del muermo

Se puede llegar a un diagnóstico mediante el cultivo de *B. mallei* con muestras de tejido de animales sospechosos, pero también existen pruebas de hipersensibilidad retardada o métodos serológicos como el que yo voy a usar en el desarrollo de este trabajo, la técnica de ELISA ha demostrado ser precisa en la enfermedad del muermo de un 96% a un 98,7%. Existe otros test de fijación impuestos por la OIE de forma comercial, PCR de resultado inmediato, test de maleína como opción en zonas endémicas

Dentro del diagnóstico diferencial tenemos otras infecciones como las paperas, botriomicosis, linfangitis ulcerativa, pseudotuberculosis, viruela entre otros.

### 2.16.1 Diagnostico diferencial

Linfangitis, Melioidosis, Paperas, Tuberculosis, Influenza equina

### 2.16.2 Diagnóstico clínico

basado en la sintomatología, priorizar en el color de la mucosidad y lesiones ulcerosas

### 2.16.3 Diagnóstico definitivo

PCR: es una prueba de diagnóstico que permite detectar un fragmento del material genético de un patógeno. En la pandemia de coronavirus, como en tantas otras crisis de salud pública relacionadas con enfermedades infecciosas, se está utilizando para determinar si una persona está infectada o no con coronavirus. A esta herramienta se están sumando en los últimos días los test de diagnóstico rápido, más sencillos y rápidos.

Hemoaglutinación: es una técnica de diagnóstico clínico de laboratorio in vitro que emplea hematíes o eritrocitos (de origen humano o animal) como partículas marcadoras. Consiste, como en toda técnica de aglutinación indirecta, en provocar la aglutinación de partículas artificialmente

recubiertas con antígenos (proceso llamado "sensibilización") mediante la reacción de los anticuerpos presentes en la muestra de estudio (generalmente suero sanguíneo) con dichos antígenos frente a los que son específicos. Por lo tanto, se basa, como toda técnica inmunológica, en la demostración de la reacción antígeno-anticuerpo.

Fijación de complemento: es una prueba inmunológica que se puede usar para detectar la presencia de un anticuerpo específico o un antígeno específico en el suero de un paciente, en función de si se produce la fijación del complemento.

Cultivo bacteriano : es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como lo son bacterias en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. Un cultivo es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en medicina humana y veterinaria.

#### 2.16.4 Diagnostico post mortem

Necropsia: exploración quirúrgica al cadáver de un animal.

#### 2.17 Tratamiento

El tratamiento es aplicado de manera preventiva haciendo uso de algunos antibióticos con solo un permiso temporal en países donde la enfermedad es endémica, aun así, esto tiene alto riesgo ya que los animales tratados se vuelven portadores asintomáticos facilitando a la infección a humanos u otros animales susceptibles. No es una solución solida ya que a pesar de ser tratados la letalidad es de un 50% en pacientes que desarrollaron la forma septicémica, crónica y pulmonar.

Se recomienda un tratamiento intensivo inicial con CEFTAZIDIME 2g c/6 horas IV con un mínimo de 10 a 14 días, también se puede realizar tratamiento con MEROPENEM 1g c/8 hs IV o IMPANEM 1g c/6 hs i.v con o sin TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL 8/4e0 mg/kg c/12hs

VO. Esta última se puede complementar con el uso de DOXICICLINA 100mg c/12 hs VO. por un periodo de unos 3 meses. PIPERACINA, GENTAMICINA, CLARITROMICINA Y AZITROMICINA tienen actividad contra *B. mallei*. (Cajes Bidart, 2016).

## 2.18 Control

Como métodos de prevención existen programas de detección temprana, aplicación de cuarentenas, desinfección e higiene; lamentablemente no existe aún una vacuna y en países como Argentina al ser considerada una enfermedad exótica se recomienda la eliminación de animales reactivos por no haber un tratamiento permitido. (OIE, 2016). En países como Iraq están implementando un método de detección por hemaglutinación pasiva para detectar la *Burkholderia mallei* en animales infectados. (Al-Ani, Al-Rawashdeh, Ali, & Hassan, 1998). En cuanto al tratamiento el más seguro es el sacrificio de los animales infectados, gracias a este método la enfermedad ha sido erradicada en varios países como EEUU, Inglaterra y Australia. (Henning, 1956)

En Turquía la temporada turística trae caballos de todas partes, y en algunas islas del mar de Mármara el uso de vehículos está prohibido para proteger el ambiente por lo que los caballos es su único medio de transporte, aquí y en el resto de Europa Occidente tienen un control y detección exitoso de la enfermedad por sus programas de cuarentena, sacrificio y constante uso de la prueba de la maleína como test contra el muermo. (Arun, Neubauer, Gurel, Ayyildiz, Kuscu, Yesildere, Hermanns; 1999). Se considera que la enfermedad del muermo fue erradicada en Turquía desde el 2001. (Marenzoni, Cuteri, De Parri, Danzetta, Yilmaz, Yaramis y Costarelli, 2013)

## 2.19 ELISA

El examen de ELISA se trata de un ensayo tipo inmunológico que usa anticuerpos como señaladores específicos para confirmar o no la presencia del antígeno que se quiere encontrar. Dependiendo del tipo de examen que sea la prueba puede seguir varios caminos: retención de actividad inmunológica por enlace antígeno-anticuerpo; enzimas de reactividad para detección de sustratos específicos; prevalencia de actividad inmunológica durante el análisis o ausencia de las enzimas en el sustrato que se analiza. (Guzmán-Vázquez, 2004)

Durante el procedimiento es necesario el establecimiento del sustrato que se analiza en las placas con antígenos reactivantes específicos seguidos de un lavado de exceso adecuado finalmente la aplicación de un ácido sulfúrico para detener la actividad enzimática receptora, al final esto ocasionara un cambio de color. (Guzmán-Vázquez, 2004)

## 2.20 Tipos de ELISA

Tenemos dos tipos de pruebas de ELISA; tipo sándwich y competitivo; el primero tiene un mecanismo que ayuda a la identificación de la proteína de la muestra que se está analizando con ayuda de 2 anticuerpos fijados en la superficie de las placas; el segundo como su nombre lo dice se basa en una competencia entre el antígeno que se encuentre en la muestra a analizar y otro antígeno conocido en la placa frente al anticuerpo específico. El procedimiento se basa en la detección del complejo antígeno -anticuerpo mediante una reacción óptica. (Relat, 2010).

## 2.21 ELISA de Doble antígeno

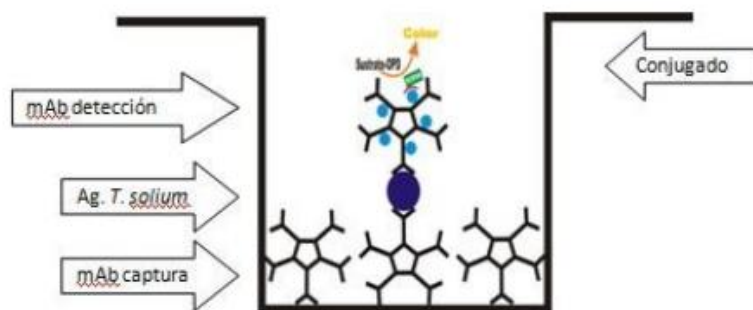
Dependiendo del caso los kits vienen equipados con placas preparadas con enlaces específicos para anticuerpos que de ser ocupados activaran las enzimas activantes y obtendremos una respuesta óptica, en el caso de los ELISA de doble antígeno el preparado de las placas se ve

más como un sándwich por tener 2 determinantes antigénicos que encierran el anticuerpo del sustrato analizado. (Guzmán, 2004)

Es la técnica más utilizada en cuanto a determinación de antígenos se trata, en el momento del enlace cambia la configuración de la enzima activante y tenemos una respuesta en el cambio de color del resultado. (Guzmán-Vázquez, 2004)

### Figura 1

#### *ELISA Sandwich*



Fuente (Salazar, Tascon, Palacio, Vélez, Ocampo, Ulloa, y Rodríguez, 2018)

#### 2.22 Resumen del estado del arte del estudio del problema

Según lo mencionado (Salazar, Tascon, Palacio, Vélez, Ocampo, Ulloa, y Rodríguez, 2018) el muermo es una enfermedad persistente que bajo las condiciones adecuadas puede prevalecer por varias décadas en una misma área, eso sumado al descuido de su presencia le ha dado un amplio campo para su distribución.

### 3 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Diseño

Este trabajo de investigación corresponde a un estudio epidemiológico de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal y causal, ya que en primera instancia se determinó la presencia de los anticuerpos para el agente etiológico y luego se calculó la prevalencia del mismo en la población de estudio.

#### 3.2 Materiales

##### 3.2.1 Físicos

Tabla 1 *Materiales de oficina*

Descripción	Unidad	Cantidad
Computadora	Unidad	1
Resma de papel bond (A4)	Unidad	1
Cuaderno de notas	Unidad	1
Marcador permanente	Unidad	2
Esferos	Unidad	3
Engrapadora	Unidad	1
Grapas	Caja	1
Carpeta	unidad	1

Tabla 2 *Materiales de campo*

Descripción	Unidad	Cantidad
Tubo tapa roja (10 c/c)	Caja de 100 unidades	2
Agujas Vacutainer	Caja de 100 unidades	2
18Gx1.5"	Funda	1
Puntas graduadas azules	Funda	1
Puntas desechables amarillas	Funda	1
X500	Funda	1
Tubo Eppendorf 1,5 ml	Caja	1
Guantes nitrilo	Unidad	1
Alcohol 1 L	Unidad	1
Algodón 500 gr	Unidad	1

## 3.2.2 Biológicos

Tabla 3 *Materiales biológicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
ID Screen ® Glanders	Caja	1
Double Antigen Multi-species		
Agua destilada 1 galón	Unidad	1

### 3.2.3 Diseño experimental

Los comportamientos de una población identificada fueron descritos en la presencia o ausencia de uniones de antígeno-anticuerpo con suero de equino en una prueba de doble antígeno de ELISA desde una variable cuantitativa.

### 3.3 Población y Muestra

La población de estudio estuvo conformada por equinos los cuales fueron tomados de una determinada zona donde se realizó la respectiva técnica de ELISA de doble antígeno.

La determinación de las muestras estuvo sujeta al cálculo del tamaño mínimo de muestras para poblaciones infinitas, teniendo en cuenta la prevalencia del 9% de anteriores investigaciones que se realizaron.

Fórmula utilizada:  $n = \frac{z^2 * p * q}{d^2}$

- $z$  = Nivel de confianza 95% = 1.96
- $p$  = Probabilidad de que ocurra el evento
- $q$  = 1- $p$ , probabilidad de que no ocurra el evento
- $d$  = Error estimado 5%

$$\text{➤ } n = \frac{(1.96)^2(0.9)(1-0.9)}{0.05^2} = 139$$

El número de muestras fue de 139 animales. Pero para la realización completa y utilización de todo el reactivo completo se tomó muestras de 184 equinos.

### 3.4 Estadística

Para el presente trabajo por sus características no se realizaron análisis estadísticos paramétricos y pruebas de significancia, sino más bien un análisis objetivo de tipo numérico y proporcional.



Para el cálculo de la prevalencia de *Burkholderia mallei*, se aplicó la siguiente fórmula:

$$PA = \frac{\text{TOTAL, DE MUESTRAS POSITIVAS A BRUCELOSIS MUERMO}}{\text{TOTAL, DE MUESTRAS}} * 100$$

### 3.5 Toma de muestras

Las muestras serológicas se obtuvieron de la arteria carótida en el cuello del animal, directamente a través de los tubos vacutainer, que fueron etiquetados y posteriormente almacenados en termos refrigerantes para su correcto transporte.

Se aplicó la bioseguridad necesaria para la toma de las muestras para una protección adecuada y correcta sujeción del animal en el procedimiento.

### 3.6 Prueba ELISA de doble antígeno.

#### 3.6.1 Preparación de la muestra

Para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre especímenes, es posible preparar una placa de 96 pocillos que contiene las muestras de prueba y de control, antes transferirlos a una microplaca ELISA utilizando una pipeta multicanal.

#### 3.6.2 Preparación de la solución de lavado

El concentrado de lavado fue manipulado en una habitación temperada y bien mezclada para asegurar su solubilización completa.

Entre los lavados se aseguró que los pocillos se encontraran totalmente vacíos ya que al no utilizar una máquina de lavado todo se desarrolló de forma manual.

### 3.6.3 Procedimiento para realizar la técnica de ELISA de doble antígeno

Se realizó de acuerdo al procedimiento que viene en los kits de la técnica de ELISA de doble antígeno.

Primer paso: Agregar

-25 ul del diluyente 3 a cada pocillo

-25 ul del control negativo a los pocillos A1 y B1

-25 ul del control positivo a los pocillos C1 y D1

-25 ul de cada una de las muestras para analizar en los pocillos restantes

Segundo paso: cubrir la placa e incubar 45 min +/- 5 minutos a 37°C (+- 2°C)

Tercer paso: Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 5 veces con al menos 300 ul de la solución de lavado. Evitar el desecado de los pocillos entre los lavados.

Cuarto paso: Preparar el conjugado 1X diluyendo el conjugado concentrado 10X al 1:10 con el diluyente 13.

Quinto paso: distribuir 100 ul del conjugado 1X a cada pocillo

Sexto paso: Cubrir la placa e incubar 30 min +/- 3 min a 21°C (+-5°C)

Séptimo paso: Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 5 veces con al menos 300 ul de la solución de lavado. Evitar el desecado de los pocillos entre los lavados.

Octavo paso: Distribuir 100 ul de la solución de revelación en cada pocillo

Noveno paso: Cubrir la placa e incubar 20 min +/- 2 min a 21°C (+- 5°C) en la oscuridad

Decimo paso: Distribuir 100 ul de la solución de parada a cada pocillo, en el mismo orden como en el paso No 8, para detener la reacción.

### 3.6.4 Validación y análisis de resultados

Una vez terminado el procedimiento descrito anteriormente la máquina de ELISA nos tiene que señalar un valor de densidad óptica (D.O) mayor a 0.350 con respecto al control positivo y mayor a 3 con respecto al control negativo.

La interpretación se expresa en porcentaje s/p, siendo así que mi D.O se divide para mi control positivo y se multiplica por 100.

$$S/P\% = (D.O \text{ muestra} / D.O \text{ control positivo}) * 100$$

En cuanto al porcentaje se establece que:

-menos del 70% es considerado negativo

-mayor o igual al 70% es considerado positivo

Tabla 4 *Estatus de pruebas de ELISA*

Resultado	Estatus
$S/P \% \leq 70\%$	Negativo
$S/P \% \geq 70\%$	Positivo

### 3.7 Operalización de variables

Tabla 5 *Variable dependiente*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Prevalencia anticuerpos equinos	de Suero sanguíneo en Anticuerpos.	Volumen de suero. Medición anticuerpos	Mililitros (ml) de Densidad óptica

Tabla 6 *Variable independiente: animales*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Equinos	Equinos -Hembra -Macho.	-Número hembras. -Número machos.	de -Numérico.

### 3.8 Consideraciones éticas

Todos los protocolos se siguieron al momento de manipular los animales, sin embargo, este procedimiento no puede garantizar evitar por completo el estrés del animal.

Como médicos veterinarios nuestro trabajo es el bienestar animal, nos encargamos de tratar y prevenir enfermedades o lesiones que podría afectar la calidad de vida del paciente y como rama de la medicina sabemos que nunca terminaremos de auto educarnos conforme la tecnología avanza y se descubren nuevos tratamientos y vacunas, por tanto un seguimiento a una enfermedad que tiene renombre histórico y de la que se sabe poco en nuestra región es un paso responsable por parte de nosotros a la comunidad de crianza de caballos

## 4 RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 7 Interpretación S/P% machos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,78	3,34	4,00	4,27	4,87	4,49	5,42	5,69	6,08	7,17	7,34	7,28
B	3,83	3,23	3,12	2,96	4,54	3,07	3,61	4,33	4,49	5,26	5,64	5,86
C	100,41	3,67	3,78	4,87	4,05	3,56	5,15	5,15	5,47	6,52	7,06	7,06
D	99,59	3,34	3,83	3,01	3,56	3,72	7,34	7,66	5,37	6,08	6,52	6,52
E	3,01	3,28	3,56	3,83	4,27	4,05	5,37	5,09	5,31	6,24	7,12	7,01
F	4,00	3,72	3,94	3,78	3,89	3,94	5,09	5,26	5,91	6,30	7,88	6,95
G	5,69	5,20	5,20	4,54	4,54	4,05	5,58	4,22	4,05	4,98	6,41	5,75
H	4,16	4,16	4,22	4,27	4,11	4,33	11,88	5,09	5,69	6,57	7,39	6,79

Tabla 8 Interpretación S/P% hembras

Interpretación s/p % hembras												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10,18	11,60	9,92	9,79	9,66	9,02	7,86	9,54	8,38	6,96	10,82	8,25
B	12,37	14,18	13,40	10,57	10,82	11,60	9,41	12,24	10,57	7,99	7,35	7,22
C	103,87	21,65	13,79	10,70	11,21	11,47	10,70	12,76	34,41	9,28	8,38	9,28
D	96,13	13,02	11,73	7,60	9,41	9,15	9,02	14,43	10,57	7,35	6,70	16,24
E	10,44	12,50	10,57	9,15	15,85	7,47	8,63	8,12	6,96	7,60	9,41	6,83
F	15,72	14,82	11,98	10,18	20,23	11,08	11,34	10,31	10,95	23,20	6,96	9,28
G	20,36	25,90	18,69	24,36	64,05	16,24	18,04	17,53	17,53	27,45	10,44	16,75
H	15,59	19,20	14,30	18,94	13,66	12,76	14,56	13,40	13,02	12,37	10,05	11,98

## 4.1 Discusión

En base a la investigación la prevalencia de *Burkholderia mallei* en la zona de Cuenca y sus alrededores es del 0%, a pesar de tener niveles altos en una de las muestras esto no significa

que sea positivo, se trata de un animal que pudo estar en contacto con un positivo y generó un desafío de campo que puede haber estimulado el sistema inmunológico.

Otros países donde se realizó un estudio para determinar la prevalencia del muermo son similares, Uruguay en 2016 declaró su país libre de muermo e impuso normas de bioseguridad con la frontera brasileña. (Cajes Bidart, 2016). Y otro realizado en Perú en 2020 reveló un 0% en notificaciones positivas. (Moscoso, M. 2020)

Otros casos sospechosos registrados como en Chile fueron producto de la falta de información respecto a la enfermedad, nuevamente se tuvo grandes sospechas al respecto sin embargo tras el análisis de muestras enviados a la OIE y la retroalimentación brindada por Argentina se llegó a la conclusión de que el país está libre de *Burkholderia mallei*. (Cajes Bidart, 2016).

La preocupación por la que este estudio se realizó fue por las notificaciones como enfermedad reemergente por el descubrimiento involuntario realizado en Brasil con 232 positivos en 14 estados en 2016. (Cajes Bidart, C. A;2016).

## 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

En la presente tesis se analizaron un total de 184 muestras de equinos, mediante la prueba de ELISA de doble antígeno, por lo cual puedo decir que tiene un resultado equivalente al 0%. Y concluyendo que los equinos están libres de *Burkholderia mallei* en el cantón Cuenca y sus alrededores.

De acuerdo a los antecedentes considero importante seguir investigando, brindando más información y de manera constante sobre esta enfermedad, ya sea considerada exótica debería estar entre la lista de posibilidades más altas, no por el riesgo de su distribución que de momento es baja sino por su alta capacidad de diseminación, de no llevar un control de bioseguridad adecuado un solo caso puede expandirse con facilidad por sus características infecto contagiosas, el clima de nuestro país ayuda a la prevalencia en el medio y al ser zoonótica ya involucramos también la salud humana, un problema a largo plazo difícil de controlar.

### 5.2 Recomendaciones

Se recomienda estar vigilantes ante esta enfermedad en nuestro país porque Brasil es el país con casos positivos corriendo un riesgo a los países vecinos y hacer un llamado para realizar estudios con análisis moleculares que aporten a la declaratoria de país libre de muermo. Dentro de nuestra profesión un animal que se comporta normal y tiene características que se vean comunes siempre es declarado como “aparentemente sano” hasta que un estudio confirme o demuestre lo contrario, estar al tanto de la salubridad animal es una responsabilidad no solo de veterinarios y autoridades sino de los dueños a cargo.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

Amasino, C. F., Cueto Rojo, M. M., & Carbone, J. C. (2010). Brucelosis equina: estudio serológico en una tropilla con casos de mal de cruz. *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)*, 5.

Andersen, E. W., Mackay, M. T., & Ryan, M. M. (2016). Neurologic Melioidosis: Case Report of a Rare Cause of Acute Flaccid Paralysis. *The Journal of Pediatrics*, 170, 319-321.

Al-Ani, F. K., & Roberson, J. (2007). Glanders in horses: A review of the literature. *Veterinarski Arhiv*, 77(3), 203.

Al-Ani, F. K., Al-Rawashdeh, O. F., Ali, A. H., & Hassan, F. K. (1998). Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Veterinarski Arhiv*, 68(5), 155-162.

Arun, S., Neubauer, H., Gürel, A., Ayyildiz, G., Kuscu, B., Yesildere, T., ... & Hermanns, W. (1999). Equine glanders in Turkey. *Veterinary Record*, 144(10), 255-258.

Barrandeguy, M. E., & Carossino, M. (2019). Enfermedades virales y bacterianas del equino. *Anales de la ANAV*, 70.

Berrios, P. (2005). Actualización sobre enfermedades virales de los equinos Overview about diseases produced by equine viruses. *Monografías Electrónicas de Patología Veterinaria*, 2 (1), 34-59.

Berrios, P. (1986). Influenza equina. Aislamiento del virus A/EQUI/2 (H3 N8). *Avances en Ciencias Veterinarias*, 1(1)



- Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., ... & Gouvras, G. (2004). *Guías BICHAT para el manejo clínico del muermo y de la melioidosis y del muermo y de la melioidosis relacionados con el bioterrorismo. Eurosurveillance*, 9(12), 35-36.
- Cajes Bidart, C. A. (2016). *Epidemiología, control y prevención del muermo equino*. (Tesis de grado). Universidad de la Republica, Montevideo - Uruguay.
- Castejón Montijano, F. (2018). Características fisiológicas del caballo atleta. Obtenido de: <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/17212>
- Dabanch, J. (2003). Zoonosis. *Revista chilena de infectología*, 20, 47-51.
- Espinosa-Victoria, D., López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., & Serret-López, M. (2020). El género *Burkholderia*: entre el mutualismo y la patogenicidad. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 337-359.
- Evans, M. E., Gregory, D. W., Schaffner, W., & McGee, Z. A. (1985). Talasemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine*, 64(4), 251-269.
- García, J. M. P., & Moreno, L. S. (1988) *Historiografía del Muermo como problema de salud pública*. *Medicina militar*. 609-616.
- Guzmán-Vázquez, E. (2004). V. Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(S3), 48-49.
- Hernando, F. J. P., & López, M. C. M. (2019). *Las ciencias veterinarias al servicio de la sociedad: Actas del XXV Congreso Nacional y XVI Congreso Iberoamericano de Historia de la Veterinaria: Toledo, 15, 16 y 17 de noviembre de 2019* (pp. 346-350). Colegio Oficial de Veterinarios de Toledo.
- Henning, M. W. (1956). *Animal Diseases in South Africa*, 3<sup>rd</sup> ed. Central News Agency Ltd. Kelvin.

Kouba, V. (2011). El muermo madura para ser erradicado en todo el mundo como la primera zoonosis en la historia. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(12), 1-11.

Mangana-Vougiouka, O., Boutsini, S., Ntousi, D., Patakakis, M., Orfanou, E., Zafiropoulou, K., ... & Nomikou, K. (2013). Epizootiological investigation of the most important infectious equine diseases in Greece. *Rev Sci Tech*, 32(3), 775-87.

Marenzoni, M. L., Cuteri, V., De Parri, F., Danzetta, M. L., Yilmaz, Z., Yaramis, C. P., ... & Costarelli, S. (2013). A pilot study on the epidemiological status of equine infectious anaemia, equine viral arteritis, glanders, and dourine in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 76-80.

McGilvray, C. D. (1944). The transmission of glanders from horse to man. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne de Sante'e Publique*, 35(7), 268-275.

Mollinedo Patzi, M. A., & Gonzáles Villalobos, C. (2014). Bacterias gram negativas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2609.

Monteverde, J. J. (1974). Anemia infecciosa equina. Obtenido de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/32813>

Moscoso, M. (2020). Enfermedades en equinos publicadas en los reportes epidemiológicos semanales del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú durante el periodo 2010–2018. *Salud tecnol vet*, 2, 58-65.

Pupo-Antúnez, M., Cabrera Rodriguez, V., Vázquez Mojena, Y., Drebot, M., Andonova, M., Dickinson Meneses, F., ... & Santos Montero, P. (2011). Estudio serológico en localidades cubanas con infecciones confirmadas al virus del Nilo Occidental. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(3), 227-230.

Relat, J. M. (2010). Introducción a la investigación básica. *Centro de investigación biométrica*, 33(3), 221-227.

Roca, B. (2007). Fiebre Q. *Anales de medicina interna*, 24(11), 558-560.

Salazar-Maya, S., Tascon-Terranova, V., Palacio-Holguín, S., Vélez-Quintero, D., Ocampo-Betancur, M., Ulloa-Zuluaga, E., ... & Rodríguez-Morales, A. J. (2018). Principales enfermedades infecciosas y zoonóticas en el *Equus caballus* y su estado actual en el trópico colombiano. *RevPanam Enf Inf*, 1(2), 98-101.

Sakurada, A. (2017). *Burkholderia pseudomallei*: desafíos para el laboratorio clínico. *Revista chilena de infectología*, 34(1), 89-90.

Scott, B., & Martín, M. (2016). Entendiendo los signos vitales de vida en caballos. *Texas A&M AGRILIFE EXTENSION*, Obtenido de: <https://texashelp.tamu.edu/wp-content/uploads/2016/02/understanding-vital-life-signs-in-horses-spanish.pdf>

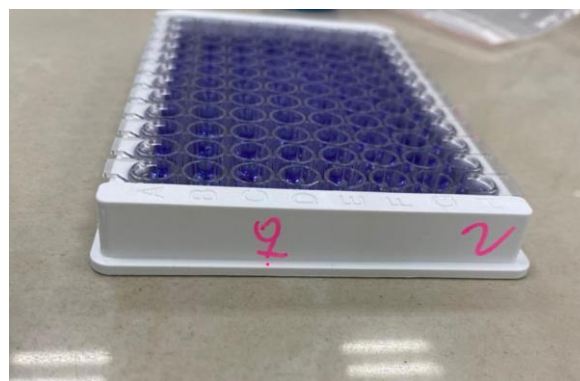
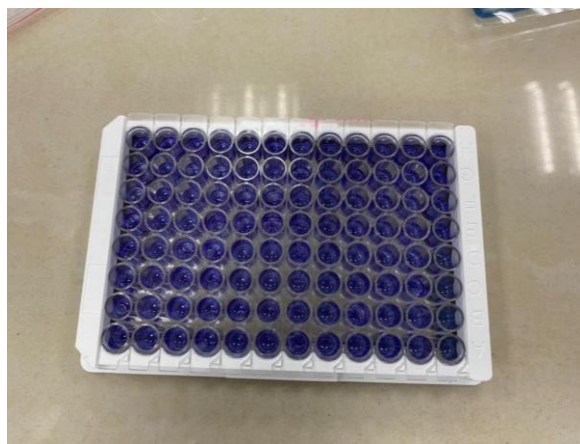
Sellon, D. C., & Long, M. T. (2013). *Equine infectious diseases E-book*. Elsevier Health Sciences.

Seró, M. C. M., Campos, J. A. I., & Vallés, M. Á. V. (2018). El muermo en la hipátrica griega: Los textos de Apsirto. In *Actas del XXIV Congreso nacional y XV Iberoamericano de historia de la veterinaria: Almería del 26 al 28 de octubre de 2018* (pp. 403-412). Colegio Oficial de Veterinarios de Almería.

Terrier, B., & Martínez, V. (2006). Salmonelosis. *EMC-Tratado de Medicina*, 10(4), 1-6.

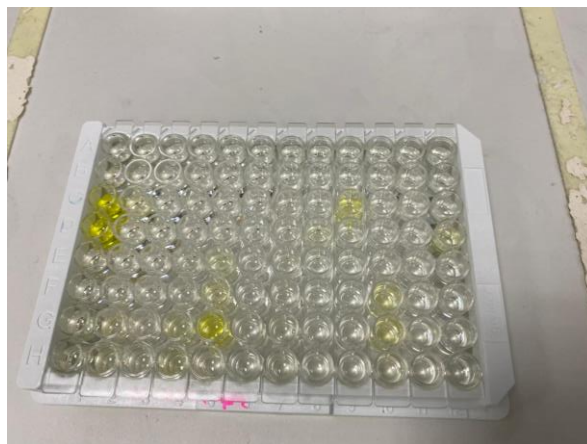
World Organization for Animal Health (OIE), 2016. Handbook for the management of high health, high performance horses, ed. OIE. 2016a, Paris-France

7 APENDICE/ANEXOS



Anexo 1

Anexo 2



Anexo 3

Anexo 4



Anexo 5

	1	2	3	4	5	6
A	0001 0.069	0009 0.061	0017 0.073	0025 0.078	0033 0.089	0041 0.082
B	0002 0.070	0010 0.059	0018 0.057	0026 0.054	0034 0.083	0042 0.056
C	0003 1.834	0011 0.067	0019 0.069	0027 0.089	0035 0.074	0043 0.065
D	0004 1.819	0012 0.061	0020 0.070	0028 0.055	0036 0.065	0044 0.068
E	0005 0.055	0013 0.060	0021 0.065	0029 0.070	0037 0.078	0045 0.074
F	0006 0.073	0014 0.068	0022 0.072	0030 0.069	0038 0.071	0046 0.072
G	0007 0.104	0015 0.095	0023 0.095	0031 0.083	0039 0.083	0047 0.074
H	0008 0.076	0016 0.076	0024 0.077	0032 0.078	0040 0.075	0048 0.079

7-12 >> Send Result Print Exit

Anexo 6

	7	8	9	10	11	12
A	0049 0.099	0057 0.104	0065 0.111	0073 0.131	0082 0.134	0089 0.133
B	0050 0.066	0058 0.079	0066 0.082	0074 0.096	0081 0.103	0090 0.107
C	0051 0.094	0059 0.094	0067 0.100	0075 0.119	0083 0.129	0091 0.129
D	0052 0.134	0060 0.140	0068 0.098	0076 0.111	0084 0.119	0092 0.119
E	0053 0.098	0061 0.093	0069 0.097	0077 0.114	0085 0.130	0093 0.128
F	0054 0.093	0062 0.096	0070 0.108	0078 0.115	0086 0.144	0094 0.127
G	0055 0.102	0063 0.077	0071 0.074	0079 0.091	0087 0.117	0095 0.105
H	0056 0.217	0064 0.093	0072 0.104	0080 0.120	0088 0.135	0096 0.124

1-f << Send Result Print Exit

Anexo 7

	1	2	3	4	5	6
A	0001 0.029	0009 0.090	0017 0.077	0025 0.076	0033 0.075	0041 0.070
B	0002 0.096	0010 0.110	0018 0.104	0026 0.082	0034 0.084	0042 0.090
C	0003 0.806	0011 0.168	0019 0.107	0027 0.083	0035 0.087	0043 0.089
D	0004 0.746	0012 0.101	0020 0.091	0028 0.059	0036 0.073	0044 0.071
E	0005 0.081	0013 0.097	0021 0.082	0029 0.071	0037 0.123	0045 0.058
F	0006 0.122	0014 0.115	0022 0.093	0030 0.079	0038 0.157	0046 0.086
G	0007 0.158	0015 0.201	0023 0.145	0031 0.186	0039 0.497	0047 0.126
H	0008 0.121	0016 0.149	0024 0.111	0032 0.147	0040 0.106	0048 0.099

7-12 >> Send Result Print Exit

Anexo 8

	7	8	9	10	11	12
A	0049 0.061	0057 0.074	0065 0.065	0073 0.054	0082 0.084	0089 0.064
B	0050 0.073	0058 0.095	0066 0.082	0074 0.062	0081 0.057	0090 0.056
C	0051 0.083	0059 0.099	0067 0.267	0075 0.072	0083 0.065	0091 0.072
D	0052 0.070	0060 0.112	0068 0.082	0076 0.057	0084 0.052	0092 0.126
E	0053 0.067	0061 0.063	0069 0.054	0077 0.059	0085 0.073	0093 0.053
F	0054 0.088	0062 0.080	0070 0.085	0078 0.180	0086 0.054	0094 0.072
G	0055 0.140	0063 0.136	0071 0.136	0079 0.213	0087 0.081	0095 0.130
H	0056 0.113	0064 0.104	0072 0.101	0080 0.096	0088 0.078	0096 0.093

1-f << Send Result Print Exit

Anexo 9

Anexo 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg 0,069	5 0,061	13 0,073	21 0,078	29 0,089	37 0,082	45 0,099	53 0,104	61 0,111	69 0,131	77 0,134	85 0,133
B	neg 0,070	6 0,059	14 0,057	22 0,054	30 0,083	38 0,056	46 0,066	54 0,079	62 0,082	70 0,096	78 0,103	86 0,107
C	pos 1,834	7 0,067	15 0,069	23 0,089	31 0,074	39 0,065	47 0,094	55 0,094	63 0,100	71 0,119	79 0,129	87 0,129
D	pos 1,819	8 0,061	16 0,070	24 0,055	32 0,065	40 0,068	48 0,134	56 0,140	64 0,098	72 0,111	80 0,119	88 0,119
E	1 0,055	9 0,060	17 0,065	25 0,070	33 0,078	41 0,074	49 0,098	57 0,093	65 0,097	73 0,114	81 0,130	89 0,128
F	2 0,073	10 0,068	18 0,072	26 0,069	34 0,071	42 0,072	50 0,093	58 0,096	66 0,108	74 0,115	82 0,144	90 0,127
G	3 0,104	11 0,095	19 0,095	27 0,083	35 0,083	43 0,074	51 0,102	59 0,077	67 0,074	75 0,091	83 0,117	91 0,105
H	4 0,076	12 0,076	20 0,077	28 0,078	36 0,075	44 0,079	52 0,217	60 0,093	68 0,104	76 0,120	84 0,135	92 0,124

## Anexo 11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg 0,079	h5 0,090	h13 0,077	h21 0,076	h29 0,075	h37 0,070	h45 0,061	h53 0,074	h61 0,065	h69 0,054	h77 0,084	h85 0,064
B	neg 0,096	h6 0,110	h14 0,104	h22 0,082	h30 0,084	h38 0,090	h46 0,073	h54 0,095	h62 0,082	h70 0,062	h78 0,057	h86 0,056
C	pos 0,806	h7 0,168	h15 0,107	h23 0,083	h31 0,087	h39 0,089	h47 0,083	h55 0,099	h63 0,267	h71 0,072	h79 0,065	h87 0,072
D	pos 0,746	h8 0,101	h16 0,091	h24 0,059	h32 0,073	h40 0,071	h48 0,070	h56 0,112	h64 0,082	h72 0,057	h80 0,052	h88 0,126
E	h1 0,081	h9 0,097	h17 0,082	h25 0,071	h33 0,123	h41 0,058	h49 0,067	h57 0,063	h65 0,054	h73 0,059	h81 0,073	h89 0,053
F	h2 0,122	h10 0,115	h18 0,093	h26 0,079	h34 0,157	h42 0,086	h50 0,088	h58 0,080	h66 0,085	h74 0,180	h82 0,054	h90 0,072
G	h3 0,158	h11 0,201	h19 0,145	h27 0,189	h35 0,497	h43 0,126	h51 0,140	h59 0,136	h67 0,136	h75 0,213	h83 0,081	h91 0,130
H	h4 0,121	h12 0,149	h20 0,111	h28 0,147	h36 0,106	h44 0,099	h52 0,113	h60 0,104	h68 0,101	h76 0,096	h84 0,078	h92 0,093