



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE
LEISHMANIA SPP. EN CANINOS EN REGIONES ENDÉMICAS DEL TOLIMA Y
HUILA

YENNY PAOLA PICÓN BONILLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE SALUD

MAESTRÍA: SALUD PÚBLICA

MANIZALES

2018

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE
LEISHMANIA SPP. EN CANINOS EN REGIONES ENDÉMICAS DEL TOLIMA Y
HUILA

YENNY PAOLA PICÓN BONILLA

Proyecto de grado para optar al título de Magíster en Salud Pública

Tutor

JORGE ANDRÉS CUELLAR GIL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE SALUD

MAESTRÍA: SALUD PÚBLICA

2018

RESUMEN

Introducción. La Leishmaniasis es una enfermedad zoonótica parasitaria de alto impacto en la salud pública a nivel mundial y uno de los reservorios más importantes es el perro; la enfermedad es endémica en Colombia y causa un número de muertes cada año. En los departamentos del Tolima y Huila,

Objetivo. Determinar mediante técnicas serológicas, histopatológicas y moleculares la presencia de infecciones con *Leishmania* spp. En caninos de los departamentos del Tolima y Huila.

Métodos. Se analizaron muestras sanguíneas de 155 caninos sospechosos de la enfermedad, con la prueba Kalazar detect, específica para *Leishmania*. Los animales seropositivos fueron sacrificados por disposición de la Secretaria de Salud correspondiente y 9 de ellos, donados por sus propietarios, fueron llevados a necropsia, los órganos con lesiones presuntivas de la enfermedad se procesaron mediante la técnica histopatológica hematoxilina – eosina. Para la confirmación de la presencia de protozoarios del género *Leishmania* spp. en los órganos afectados, se amplificó un fragmento de 314 pb del gen conservado ITS a través PCR convencional.

Resultados. De los 155 animales muestreados, 19 fueron seropositivos, para una prevalencia del 12,3% de Leishmaniasis canina en los departamentos de Tolima y Huila; adicionalmente, se encontró asociación entre las variables eco epidemiológicas con un nivel de significancia ($p < 0,05$) mediante la prueba *Ji cuadrado* debido a la presencia de plagas, número de animales por vivienda, viajes, sexo del animal. Al análisis histopatológico se evidenciaron amastigotes en los tejidos afectados posterior a la revisión serológica y clínica. Se logró la detección molecular a partir de 3 muestras de riñón, bazo, linfo nodo y piel por PCR.

Conclusiones: se observa la presencia de *Leishmania* spp. En caninos de zonas endémicas de la enfermedad, lo cual constituye un riesgo para la salud pública humana.

Palabras clave. Epidemiología, leishmaniasis, caninos, prevalencia, serología, histopatología, PCR.

ABSTRACT

Introduction. Leishmaniasis is a zoonotic parasitic disease with high impact on public health worldwide and one of the most important reservoirs is the dog; the disease is endemic in Colombia and causes a number of deaths each year. In the departments of Tolima and Huila.

Objective: Determine, through serological, histopathological and molecular techniques, the presence of infections with *Leishmania* spp. in canine of the department of Tolima and Huila.

Methods Blood samples from 155 canines suspected of the disease were analyzed with the Kalazar detect test, specific for Leishmania. The seropositive animals were sacrificed by order of the corresponding Ministry of Health and 9 of them, donated by their owners, were taken to necropsy, the organs with presumptive lesions of the disease were processed by histopathological hematoxylin - eosin technique. For the confirmation of the presence of protozoa of the genus *Leishmania* spp. In the affected organs, a fragment of 314 bp of the conserved ITS gene was amplified through conventional PCR.

Results: Of the 155 animals sampled, 19 were seropositive, for a prevalence of 12.3% of canine Leishmaniasis in the departments of Tolima and Huila; additionally, an association between the eco epidemiological variables with a level of significance ($p < 0,05$) was found by means of the Chi square test due to the presence of pests, number of animals per dwelling, trips, sex of the animal. Histopathological analysis revealed amastigotes in the affected tissues after serological and clinical review. Molecular detection was achieved from 3 samples of kidney, spleen, lymph node and skin by PCR.

Conclusions: the presence of *Leishmania* spp. in canines from endemic areas of the disease, which constitutes a risk to human public health.

Keywords. Epidemiology, leishmaniasis, canines, prevalence, serology, histopathology, PCR.

CONTENIDO

1	PRESENTACIÓN	8
2	ANTECEDENTES	9
3	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
4	JUSTIFICACIÓN	13
5	OBJETIVOS	16
6	METODOLOGÍA	17
6.1	Enfoque y tipo de estudio	17
6.2	Población y muestra.	18
6.3	Hipótesis	18
7	RESULTADOS	25
8	CONCLUSIONES	44
9	REFERENCIAS	46
10	ANEXOS	55
10.1	Anexo 1. Encuesta eco-epidemiológica	55
10.2	Anexo 2. Consentimiento informado	57
10.3	Anexo 3. Base de datos encuesta eco epidemiológica	59
10.4	Anexo 4. Extracción del DNA a partir de muestras embebidas en parafina	79
10.5	Anexo 5. Calculo Kappa	81
10.6	Anexo 6 Comunicados de aceptación seminario nacional e internacional.	82

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Variables de estudio: definición operativa de las variables, naturaleza, nivel de medición y nivel operativo.	18
Tabla 2. Características de las viviendas y de los caninos, encuesta eco-epidemiológica, Huila-Tolima, 2016-2017	25
Tabla 3. Características de la vivienda y de los caninos reactivos por serología a leishmaniasis.....	26
Tabla 4. Resultados de hemograma de caninos reactivos para leishmaniasis en tratamiento clínico	28
Tabla 5. Análisis de Ji cuadrado y <i>OR</i> de variables eco epidemiológicas. <i>SPSS Static 2.0.</i>	36

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Hallazgos histopatológicos en piel y linfonodos, Caso	29
Figura 2. Hallazgos histopatológicos en piel y linfonodos, Caso 4.....	30
Figura 3. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 5.....	30
Figura 4. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 6.....	31
Figura 5. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 7.....	31
Figura 6. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 8.....	31
Figura 7. Hallazgos histopatológicos en riñón, Caso.....	32
Figura 8. Hallazgos histopatológicos en riñón, Caso 10.....	32
Figura 9. Hallazgos histopatológicos en pulmón, Caso 11.....	33
Figura 10. Detección molecular de Leishmaniasis spp.....	34
Figura 11. Detección molecular - PCR en tiempo real, Caso 3.....	35

1 PRESENTACIÓN

Este documento contiene un estudio de diagnóstico epidemiológico en zonas endémica de *Leishmania* spp, causante de la leishmaniasis cutánea, muco cutánea y/o visceral, la cual es endémica en Colombia y en 97 países a nivel mundial. Esta enfermedad transmitida por vectores del genero de *Lutzomyia* spp. o palomilla blanca que afecta a la población y genera un importante número de muertes por año.

La unidad muestral de esta investigación fueron los caninos de zona focal y peri focal con presentación de leishmaniasis en humanos en las regiones de Huila y Tolima. El objetivo fue determinar la presencia de infecciones con *Leishmania* spp. y para lo cual se utilizaron técnicas de diagnóstico de tipo serológico, histopatológico, molecular y eco epidemiológico y sus respectivos resultados enmarcados en un estudio de tipo transversal con su correspondiente análisis estadístico y las condiciones éticas necesarias y de bienestar animal para su realización.

Este proyecto en su versión preliminar fue presentado en el encuentro nacional de investigaciones pecuarias ENICIP organizado por la Universidad de Antioquia en la modalidad de poster en Octubre de 2017 y aceptado por XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Española de Epidemiología (SEE) y del XIII Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia (APEla para septiembre de 2018 (Anexo 6)

2 ANTECEDENTES

La leishmaniasis es una enfermedad de distribución mundial y un problema de salud pública y veterinaria en el sur de Europa, Oriente Medio, África y América del Sur, con gran impacto en regiones tropicales y subtropicales principalmente en Brasil donde se presenta el 96,6% de los casos de América Latina. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 0,6 millones y 1 millón de casos nuevos (3). A nivel nacional en el departamento de Huila y Tolima desde el año 2002 y 2004 se han presentado casos de importancia epidemiológica. En los últimos 6 años han sido notificados brotes de leishmaniasis registrados en la región sur del departamento del Tolima y en el municipio de Neiva, capital del departamento de Huila (7), Para el 2017 fueron notificados 325 casos en humanos el Tolima y 4 para el municipio de Neiva con la mortalidad de 1 niño.

Teniendo en cuenta que la leishmaniasis afecta a los animales y al hombre se genera cuestionamientos acerca del papel que pueden jugar los caninos con respecto a la positividad o reactividad a la enfermedad evidenciada en humanos. El estrecho contacto del perro como animal doméstico aunado a su papel como hospedero del parásito tanto en forma clínica como subclínica merece atención particular y la necesidad de abordar la problemática eco epidemiológica de la leishmaniasis en las regiones de estudio mediante análisis serológicos, histopatológicos y su confirmación mediante técnicas específicas de biología molecular como el PCR.

3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania*, transmitida por insectos dípteros del género *Lutzomyia*, afecta a animales domésticos, silvestres y al hombre, en quien puede producir lesiones cutáneas, mucosas o viscerales (1), e induce cuadros clínicos de forma cutánea, mucosa o visceral y subclínicos de difícil tratamiento (2). La enfermedad, afecta a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos; así mismo, está vinculada a los cambios ambientales, como la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización. Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 20 millones de personas están infectadas con algún tipo de leishmaniasis, cada año se producen entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 defunciones (3). *Leishmania* spp. es responsable de cerca de 2 millones de casos de leishmaniasis anuales en todo el mundo, de los cuales 1,5 millones son de tipo cutánea y 500.000 casos de tipo visceral, la cual es generalmente fatal si no se trata a tiempo (4).

Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Más de dos terceras partes de los casos nuevos aparecen en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe Siria. En España se reporta una tasa media anual de hospitalización de 2,8/100.000 habitantes, donde 2.273 (83,6%) son afectados por la leishmaniasis visceral, 98 (3,6%) por la forma cutánea y en 368 (13,4%) no se logró especificar el tipo de leishmaniasis (5).

En las Américas se observa una amplia gama de manifestaciones clínicas causadas por múltiples especies de *Leishmania* filogenéticamente distintas. Aunque algunas de esas manifestaciones se asocian con más frecuencia a alguna especie o subgénero en particular, ninguna es exclusiva de una especie. Además hay una proporción considerable, pero variable, de infecciones asintomáticas (6). Más del 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea se producen en el Brasil, el Estado Plurinacional de Bolivia, Etiopía y el Perú

(3). La leishmaniasis visceral, conocida como kala azar, afecta principalmente poblaciones con limitados recursos económicos y países en desarrollo, en más del 95% de los casos es mortal si no se trata; en el mundo, cada año se producen entre 50.000 y 90.000 casos nuevos de leishmaniasis visceral, de los cuales, más del 90% ocurren en Brasil, Etiopía, India, Kenya, Somalia y Sudán del Sur (7).

En Colombia, así como en otros países tropicales, la leishmaniasis es una enfermedad endémica (8), la forma visceral de la leishmaniasis es la segunda presentación clínica con mayor prevalencia, después de la forma cutánea (9); se presenta en zonas rurales y ha sido reportada en todo el territorio colombiano, desde la Costa Pacífica, la Costa Caribe, incluida la Guajira, a la región Andina e inter-Andina, el Oriente del país y el Amazonas, a excepción de San Andrés Islas y Bogotá (10).

Durante la década de los 90, en el país, se notificaban en promedio 6.500 casos nuevos de leishmaniasis por año, cifra que aumentó progresivamente al punto de pasar en los años 2005 y 2006 a cerca de 20.000 casos cada año notificados al sistema, luego, se evidenció un descenso, de tal forma, que para el 2008 se notificaron 8.239 casos, volviendo a presentar picos súbitos en los años 2009 (15.445 casos), 2010 (14.837 casos), 2014 (11.657 casos) y 2016 (11.850 casos). Se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente y la de mayor distribución geográfica, la leishmaniasis cutánea (entre 95% y 98% de los casos); la leishmaniasis mucosa, que es el resultado de la diseminación del parásito, y que se puede presentar de semanas a años después de la lesión cutánea (1% a 4%) y leishmaniasis visceral (entre el 0,1 y 1,5%) (11, 12); y una notificación anual estimada de 8.500 casos entre leishmaniasis cutánea y visceral (10), con alrededor de 11 millones de personas en riesgo, cuya transmisión se da principalmente en el área rural. (11, 12).

Para el trienio 2008-2010, la incidencia de Leishmaniasis cutánea y mucosa se incrementó en 46,2 y 0,7 por cada 10.000 habitantes respectivamente(10).La leishmaniasis visceral es endémica principalmente en el Valle del Río Magdalena y sus afluentes y la existencia de focos en Tolima, Huila, Cundinamarca, Bolívar, Córdoba, Sucre, Santander y Norte de Santander que corresponden con la distribución de *Lutzomyia longipalpis* (13). Es

así como, entre 2008 a 2016 se notificaron 211 casos confirmados de leishmaniasis visceral; el 97,2% procedentes de los departamentos de Bolívar, Sucre, Córdoba, Huila, Tolima y Cundinamarca, con distribución en 33 municipios del territorio nacional. El 68,7% de estos casos se concentraron en los municipios de El Carmen de Bolívar, Ovejas, San Andrés de Sotavento, Tuchín, Neiva y Sincelejo (11, 14). En el departamento de Huila, entre 2009 y 2017 fueron notificados 24 casos, 4 (16,7%) en 2009, 7 (29,2%) en 2012, 1 (4,2%) en 2014 y 2015, 4 (16,7%) en 2016 y 7 (16,7%) en 2017 (15).

Dependiendo de la fuente de la infección humana la leishmaniasis puede agruparse en dos grandes categorías: zoonóticas, cuyos huéspedes reservorios son animales salvajes, comensales o animales domésticos, y antroponóticas, cuyo huésped reservorio es el ser humano. Los animales domésticos y selváticos infectados por *Leishmania* pueden presentar signos evidentes de infección o no presentarlos. No obstante, algunos mamíferos, como el perro, que es huésped reservorio de la leishmaniasis visceral por *L. infantum*, pueden morir de la infección. En el perro, los parásitos son abundantes en las vísceras y la dermis, desde donde son captados fácilmente por los vectores (6).

Los caninos infectados por *Leishmania* spp., representan un riesgo potencial de contagio para los humanos (16), estos animales pueden desarrollar la enfermedad clínica pero también pueden estar infectados y no desarrollar síntomas (forma asintomática), constituyéndose como una potencial fuente de infección para insectos flebótomos y su transmisión al humano (1, 17). La detección de animales positivos constituye un paso inicial para establecer medidas de control apropiadas. Para ello, se puede aproximar al diagnóstico desde el punto de vista clínico, a partir de animales con signos compatibles y observación histológicas de las lesiones (más aun en zonas endémicas o de reportes de brotes). No obstante, en las formas subclínicas se deben explorar otras estrategias de diagnóstico que incluyen técnicas serológicas y de PCR (18-20).

Por tanto, se plantea la pregunta de investigación: ¿Cuál es la prevalencia de *Leishmania* spp. mediante técnicas serológicas, histopatológicas y moleculares en reservorios caninos de regiones con presentación de casos en el departamento del Tolima y Huila?

4 JUSTIFICACIÓN

Un factor de alto de riesgo de transmisión de la leishmaniasis a poblaciones humanas es el alto número de canidos callejeros en las regiones endémicas y vulnerables, donde las condiciones sanitarias, disposición y manipulación de residuos (líquidos y sólidos), la cercanía a zonas boscosas y cultivos, entre otros, son adicionalmente, condiciones apropiadas para la permanencia del agente infeccioso (21).

El estudio de brotes notificados y documentados de leishmaniasis registrados en la región sur del departamento del Tolima y en el municipio de Neiva, capital del departamento de Huila, generan cuestionamientos acerca del papel que pueden jugar los caninos con respecto a la positividad o reactividad a la enfermedad evidenciada en humanos. El estrecho contacto del perro como animal doméstico aunado a su papel como hospedero del parásito tanto en forma clínica como subclínica merece atención particular y la necesidad de abordar la problemática eco epidemiológica de la leishmaniasis en las regiones de estudio (22, 23).

En Colombia y en particular en las regiones del sur del departamento de Tolima y otras regiones aledañas del departamento del Huila, incluido el municipio de Neiva, se carece estudios de diagnóstico e identificación molecular de las especies de *Leishmania* spp. circulantes que permita obtener información precisa del ciclo epidemiológico del parásito, comportamiento y distribución de la enfermedad, así como de las lesiones histopatológicas. Esta información constituye una herramienta valiosa para el diseño, producción y evaluación de nuevas estrategias de prevención, vigilancia y/o control y posible tratamiento a posteriori de la enfermedad.

REFERENTE TEÓRICO

La enfermedad se presenta en diversas formas que incluyen la subclínica (inaparente), localizada (lesiones de piel), e infecciones diseminadas que comprenden una forma cutánea, una mucosa y otra visceral altamente mutilante (24). Las características clínicas de la leishmaniasis cutánea tienden a presentar variaciones entre las regiones y dentro de una misma región, dependiendo de las especies del parásito o del tipo de ciclo zoonótico en cuestión, del estado inmunitario del paciente y, quizás también, de un condicionamiento genético de la respuesta del paciente. La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de leishmaniasis, y produce en las zonas expuestas del cuerpo lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida y son causa de discapacidad grave. La leishmaniasis muco cutánea, conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (3).

La leishmaniasis visceral es causada por parásitos del complejo *L. donovani*, *L. infantum*, y se han descrito algunos casos por *L. tropica*; en las Américas, *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) es su principal agente etiológico. La mayoría de las infecciones son asintomáticas, algunas víctimas acaban padeciendo leishmaniasis visceral clínica; su periodo de incubación oscila entre 10 días y más de un año, y el inicio de la enfermedad suele ser gradual. Los síntomas frecuentes son fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia y molestias en el hipocondrio izquierdo; y, los signos clínicos frecuentes son esplenomegalia no dolorosa a la palpación, con o sin hepatomegalia, consunción y palidez de las membranas mucosas (6).

Los perros son considerados el reservorio más importante de *L. infantum* y manifiestan un parasitismo intenso en el bazo y la médula ósea en el curso y progreso de la enfermedad subclínica a la forma clínica. La multiplicación de dichos parásitos en el canido permite que este animal sirva de origen frecuente de infección por vectores *Lutzomyia* spp, encargados de transmitir el parásito al humano. El protozoario coloniza los órganos internos a partir de lesiones cutáneas, donde infecta macrófagos en la médula ósea, nódulos linfoides, bazo e hígado, así como los riñones, el tracto gastrointestinal y ocasionalmente

signos nerviosos (25). Las lesiones macroscópicas incluyen hipertrofia de los nódulos linfoides, dermatitis peri orbital, nasal o diseminada, onicogripos, pelo corto y edema en las extremidades (26).

A nivel clínico diagnóstico en los caninos como en los humanos pueden presentar signos clínicos compatibles y concomitantes con diferentes enfermedades de tipo parasitaria y bacteriano en los perros como *Ehrlichia*, *Babesia*, *Neospora* y *Anaplasma* las cuales pueden presentar reactividad simultánea mediante pruebas de ELISA e IFI, y diagnosticarse por PCR respectivamente, mostrando, adicionalmente, sintomatología similar en estadios agudos y crónicos (27).

Se ha encontrado asociación significativa entre la leishmaniasis visceral, caninos de localización peri doméstica y la presencia de áreas verdes cerca de la vivienda. La triada epidemiológica de leishmaniasis visceral tiene lugar en áreas susceptibles donde exista condiciones para su transmisión entre el perro, flebótomo y el hombre. Esta enfermedad se desarrolla con mayor frecuencia en áreas forestales y de cultivo informales (ej. plátano) sumado a una disposición inadecuada de basuras (28).

Los perros de las áreas foco identificadas con leishmaniasis visceral son diagnosticados mediante técnicas rápidas como la Kalazar detect (InBios, Seattle, WA). La confirmación del diagnóstico se realiza mediante IFI y el uso de anticuerpos anti IgG conjugados con isotiocianato de fluoresceína. Los animales positivos a leishmaniasis visceral generalmente se les realiza la eutanasia (29) necropsia para recolectar muestras de los órganos blancos (bazo, médula ósea, corazón) y nódulos linfáticos previa autorización de sus propietarios (30).

En caballos, perros y liebres con leishmaniasis se han encontrado numerosas formas de *Leishmania* spp. al interior de los macrófagos, con infiltrado linfocitario y la formación de pio granulomas (31). Los tejidos son coloreados con tinción de Giemsa y observados bajo un microscopio óptico. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR es sensible a la detección de ADN del parásito en muestras de tejidos animales y permite hacer una aproximación en la identificación molecular de *Leishmania* spp. (32).

5 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar mediante técnicas serológicas, histopatológicas y moleculares la presencia de infecciones con *Leishmania* spp. en caninos de los departamentos del Tolima y Huila.

Objetivos específicos

Realizar un diagnóstico serológico de *Leishmania* spp. en caninos de una región endémica del sur de los departamentos de Tolima y Huila.

Caracterizar las lesiones histopatológicas en tejidos blancos de caninos seropositivos a leishmaniasis.

Detectar *Leishmania* spp. mediante técnicas de PCR de muestras de tejido caninos.

Establecer posibles asociaciones entre el diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de leishmaniasis.

Identificar potenciales factores de riesgo eco epidemiológicos de leishmaniasis en caninos del Tolima y Huila.

6 METODOLOGÍA

6.1 Enfoque y tipo de estudio

Enfoque de investigación cuantitativo, con un diseño de estudio descriptivo de corte transversal definido como el diseño de una investigación observacional individual, que mide una o más características o enfermedades, en un momento dado, en relación con la presencia o ausencia de una exposición, ocurridos en un tiempo determinado y en una población específica, cuya unidad de análisis es el canino que compone la población a estudio, en quien se mide la exposición y se registra la ocurrencia del evento de interés,(33, 34); determinado así la seroprevalencia, las lesiones histopatológicas, la detección de la *Leishmania* spp. mediante técnicas de PCR, el establecimiento de las posibles asociaciones entre el diagnóstico serológico, histopatológico y molecular, e identificación de los potenciales factores de riesgo eco epidemiológicos y su posible asociación con la enfermedad.

Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en los departamentos de reciente notificación de casos de leishmaniasis en humanos: el Huila, con el municipio de Neiva, localizado en las coordenadas 2°59'55" latitud norte y 75°18'16" longitud 41.825 et. y su extensión territorial es de 1.533 km², con una altura de 442 metros sobre el nivel del mar (msnm) y una temperatura promedio de 27,7 C; comunas 8, 9 y 10, determinadas como área peri focal, ubicadas entre la cordillera central y oriental, en una planicie sobre la margen oriental del río Magdalena, en el valle del mismo nombre, cruzada por el río las Ceibas y el río del Oro; y, en Tolima, con los municipios de Guamo, Ortega, Flandes, Coyaima y Melgar, ubicados al suroccidente del departamento a 4°55' latitud norte y 75°07' de longitud Oeste, sobre la cordillera central del Macizo Colombiano con una temperatura promedio de 24°C y una altitud entre 323 y 1.445 msnm.

6.2 Población y muestra.

La población estuvo constituida por todos los caninos de las zonas del Huila y Tolima donde se notificaron casos de leishmaniasis en humanos y donde se realizó el diagnóstico serológico de la zona focal y peri focal, para un total de 155 perros.

Criterios de inclusión. Todos los perros con reactividad serológica a leishmaniasis.

Criterios de exclusión. Fueron excluidos aquellos caninos reactivos que en el momento de su búsqueda no fueron localizados por muerte o pérdida del lugar vivienda.

6.3 Hipótesis

H0: las variables eco epidemiológicas no influyen sobre la presentación casos positivos

H1: las variables eco epidemiológicas si influyen sobre la presentación casos positivos

Variables de estudio. Las variables de estudio se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Variables de estudio: definición operativa de las variables, naturaleza, nivel de medición y nivel operativo.

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
Características de la vivienda			
Procedencia	Departamento de procedencia	Cualitativa	Tolima
Lugar	Ubicación de la vivienda en la comuna o municipio	Cualitativa	Huila: Fortalecillas, Palermo, Neiva: Comuna 4, 5, 6, 7, 8, 9
Enfermos	Personas enfermas	Cualitativa	Si
Material	Material de construcción de la vivienda	Cualitativa	Bareque
		Nominal	Concreto
Focos de insalubridad	Disposición de excretas y basuras	Cualitativa	Recolección programadas relleno municipal
		Nominal	Acopio improvisado Entierro.

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
Etnobotánica	Presencia de plantas intra domiciliarias	Cualitativa Nominal	Si No
Quebradas	Cercanía de quebradas o caños	Cualitativa Nominal	Si No
Reservorios	Presencia de animales domésticos que pueden ser reservorios	Cualitativa Nominal	Si No
Plagas	Presencia de plagas en el extra y peri domicilio (insectos y roedores, ratas)	Cualitativa Nominal	Si No
Características de los caninos			
Sexo	Condición biológica	Cualitativa Nominal	Macho Hembra
Cronometría dental	Edad en años cumplidos	Cuantitativa Rango	0-10 años
Permanencia	Tiempo de permanencia en la vivienda	Cualitativa Nominal	
Semiología	Presencia de signos y síntomas	Cualitativa Nominal	Presencia Ausencia
Anamnesis	Enfermedades anteriores	Cualitativa Nominal	Si No
Viajes	Desplazamientos del animal en los últimos 6 meses o año	Cualitativa Nominal	Si No
Sanidad	Condición de estado físico	Cualitativa Nominal	Si No

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
Técnicas de diagnóstico			
Reactividad	Serología positiva a la prueba Test Kalazar detect en suero	Cualitativa Nominal	Reactivo Negativo
Confirmación	Lesiones en tejidos blancos por histopatología	Cualitativa Nominal	Si No
Identificación molecular PCR	Identificación de Leishmania a nivel molecular	Cualitativa Nominal	Presencia de banas Ausencia de bandas

Técnicas e instrumentos de recolección de información

Encuesta eco-epidemiológica. Se aplicó una encuesta eco epidemiológica por parte del investigador a cargo mediante inspección del domicilio del animal positivo a la *Leishmania* spp, su eco epidemiología, los antecedentes y signos clínicos del animal, y las personas con las que comparte el hábitat (anexo 1) previa firma del consentimiento informado (anexo 2). Los datos recolectados fueron sistematizados en la hoja de cálculo de Excel de Microsoft Office® para su posterior depuración, la base de datos obtenida se presenta en el anexo 3.

Examen clínico de los caninos. Mediante examen clínico realizado por médicos veterinarios de las respectivas Secretarías de Salud Municipal y el investigador encargado se establecieron los signos compatibles con la enfermedad, incluyendo lesiones dermatológicas, cambios oculares, pérdida de peso, apatía, signos nerviosos y tamaños aumentados de nódulos linfáticos y bazo a la palpación. A los casos confirmados por PCR, se le realizaron hemogramas para evaluar los signos clínicos típicos y atípicos presentados por los animales portadores (35) y su asociación con las otras técnicas de diagnóstico. Los datos fueron registrados y archivados con la orden consentimiento informado de los propietarios del animal y la respectiva encuesta epidemiológica.

Estudio serológico. Se tomaron muestras de sangre de 5 mL mediante punción de la vena cefálica de cada paciente compatible con la enfermedad, depositada en tubos de ensayo estériles y equipo BD Vacutainer® con tubo tapa roja de los cuales se obtuvo de suero sanguíneo después de centrifugación a 3.000rpm/x10 min. El suero sanguíneo fue usado para la detección de anticuerpos específicos contra *Leishmania* de perros sintomáticos y asintomáticos, mediante el uso del kit Kalazar detect (InBios, Seattle, WA). Adicionalmente se realiza hemogramas con los cuales se mide el nivel de proteínas presentes en la sangre.

Prueba con tira reactiva. Esta técnica se realizó en el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud de Huila y la Secretaría de Salud de Tolima, mediante la tira reactiva K39 la cual usa un antígeno recombinante purificado por inmuno cromatografía para detectar anticuerpos IgG anti-*Leishmania* (Kalazar Detect, lote JL1019; INBIOS, Seattle, WA), posterior a 5 minutos de exposición al suero, la tira reactiva evidenciaba 2 bandas en caso positivo y una banda para los casos negativos.

Estudio histopatológico. Con base en el referente epidemiológico y alto índice de riesgo de *Leishmania* spp y de transmisión, se realizó la eutanasia de los caninos diagnosticados como positivos y subsecuentemente la necropsia del animal y la obtención de placas histológicas de los órganos afectados en las instalaciones de histopatología de la Universidad del Tolima y Universidad CorHuila. Posteriormente de los órganos muestreados se tomaron aproximadamente 1 cm³ y los tejidos obtenidos se fijaron en formalina bufferada al 10%, posteriormente coloreados con la técnica Hematoxilina-eosina (HE) para facilitar la visualización de las formas parasitarias de *Leishmania* spp., dichos tejidos fueron embebidos en parafina hasta la realización de los procedimientos y técnicas de extracción molecular.

Se observaron 100 campos por placa y se realizó la descripción y comparación con lo reportado por la literatura para la descripción de los hallazgos por caso. Finalmente, la observación de las formas amastigotes de los parásitos y las lesiones generadas en los tejidos, fue realizada empleando el objetivo 100X en aceite de inmersión utilizando un

microscopio de luz marca Olympus en el laboratorio de inmunología y biología molecular de la Universidad del Tolima mediante el apoyo de personal experto.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Teniendo en cuenta que la técnica de PCR convencional es sensible a la detección de ADN del parásito en muestras de tejidos animales, se realizó una aproximación en la identificación del parásito en reservorios caninos a *Leishmania* spp. El ADN obtenido de los caninos muestreados y diagnosticados previamente como positivos se extrajo usando el kit QIAMP DNA FFPE para la extracción de ácidos nucleicos a partir de los tejidos parafinados y posteriormente el kit Easy-DNATM (Invitrogen).

La región a amplificar fue un fragmento de 314bp del gen 18SrRNA de *Leishmania* spp. mediante el uso de los primers forward PG1, 5' -CTGGATCATTTTCCGATG -3' y reverse PG2 5' -TGATACCACTTATCGCACTT -3' Los productos de amplificación se separaron en electroforesis de agarosa al 1,5% a 100 voltios durante 30 minutos y coloreados con bromuro de etidio (36). Se empleó un control negativo técnico y controles positivos de ADN de cultivos de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum* los cuales fueron cedidos por el Instituto Nacional de Salud y primer utilizados previamente por otros autores para amplificación de *Leishmania* spp. (37). Encontrando para este estudio la amplificación por *L. amazonensis* y descartando los controles positivos restantes previa no amplificación (77).

Posteriormente, se realizó la elución del ADN en 60µL de respectivo Buffer. Al finalizar el proceso de extracción, se hizo la cuantificación del ADN por el método de absorción de luz 260 nm (Nanodrop), observándose en la relación A260/280, algunos rastros de contaminación de proteínas durante los análisis moleculares realizados por la Universidad de Antioquia (anexo 4) evidenciando la dificultad para la detección del parásito por técnicas del PCR a partir de los tejidos parafinados previamente, diagnosticados como positivos por histopatología y. Por lo tanto, se opta por hacer la preservación de los tejidos en alcohol absoluto; adicionalmente, se hace otro muestreo por aspiración de nódulo linfoide poplíteo, en un laboratorio comercial, con la técnica de PCR

tiempo real. De esta manera, se logró la detección de *Leishmania* spp. para los órganos bazo, nódulo linfático y pancreático, corazón y piel.

PCR tiempo real. La técnica de PCR tiempo real, tiene como principio las longitudes de onda acorde a un alineamiento múltiple de un antígeno del parásito predeterminado en un termociclador, el cual en caso de encontrarse un positivo debe emitir una fluorescencia según la proporción de ADN formado por ciclos de la muestra que sobrepasa el umbral establecido (38). Se utilizó una muestra nódulo linfático suspendida en 1mL de solución salina mediante el software Rotor-Gene Q 2.3.149 durante 70 min, con umbral de 0,049, umbral de la muestra de 30% y umbral negativo de 1.000 con normalización dinámica y utilización de 3,67 “Gain Green” y 6,67 “Gain Yellow”. Estas pruebas se realizaron en un laboratorio comercial.

Plan de análisis. El análisis de las variables a estudio se hizo mediante el uso de estadística descriptiva, medidas de frecuencia, expresadas en porcentaje, medidas de tendencia central y dispersión. Para establecer asociaciones entre los factores descritos en la encuesta eco-epidemiológica y la positividad a *Leishmaniasis* spp. Se utilizó la prueba no paramétrica de Ji cuadrado (χ^2) con un nivel de significancia de ($p < 0,05$), para establecer posibles asociaciones entre las variables eco epidemiológicas. Además, se hizo el cálculo de la Razón de momios (OR) con un valor de ($p < 0,05$). Teniendo en cuenta los casos positivos por PCR y por histopatología se realizó el cálculo de sensibilidad, especificidad y nivel de asociación entre las técnicas utilizadas con el índice Kappa. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statics 2.0® y Epi info™.

Consideraciones éticas

El uso de los animales para el desarrollo de los proyectos de investigación posee un marco mundial dado por la UNESCO, la OMS y la ONU en diferentes países como Estado Unidos, Suiza, México, Inglaterra, Canadá, España y la Comunidad de Cataluña (39, 40), entre otros. En Colombia, la ley 84 de 1989 que adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, en el literal f del artículo 17 establece entre otros, el sacrificio de animales por constituir una amenaza cierta o inminente para la salud pública o de otros animales y en el artículo 26, que para todo experimento con animales vivos deberá conformarse un comité

de ética (41); y, la Resolución 8430 de 1999, en su título V de la investigación biomédica con animales, artículo 87, establece las disposiciones que en toda investigación en la que los animales sean sujeto de estudio, además de las disposiciones determinadas en la Ley 84 de 1989, entre ellas, en su literal g, que la eutanasia de los animales se efectuará con anestésicos apropiados, aprobados por la asociación veterinaria (42).

Para el sacrificio de los caninos que fueron reactivos para leishmaniasis mediante técnicas serológicas, en el momento de aplicación de la encuesta eco-epidemiológica se leyó y solicitó la firma del consentimiento informado (anexo 2), por parte del propietario. Se brindó el mínimo dolor y las mayores condiciones de bienestar animal, analgesia y respeto.

El estudio contó con la aprobación del Comité de Currículo de la Maestría en Salud Pública y el comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Manizales mediante Acta de enero de 2016.

7 RESULTADOS

El total de caninos muestreados fue de 155 animales, el 95,5% (n=148) procedentes de Huila y 4,5% (n=7) de Tolima, las características de la vivienda y de los caninos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las viviendas y de los caninos, encuesta eco-epidemiológica, Huila-Tolima, 2016-2017

Vivienda	Frecuencia
Características de la vivienda	
Material	
Bareque	5
Concreto	44
Guadua	20
Tabla	86
Personas enfermas	12
Basuras	43
Sanidad	75
Reservorios	103
Etnobotánica	119
Quebradas	107
Plagas	82
Características de los caninos	
Sexo	
Hembra	69
Macho	66
Edad en años	2,8 ($\pm 1,7$)
Estado corporal	
Emaciación	18
Normal	135
Obeso	2
Viajes	20

Diagnostico serológico

El 12% (19/155) fueron reactivos a leishmaniasis, según el departamento de procedencia, 14 (74%) de Huila, todos del municipio de Neiva y 5 (26%) de Tolima, 40% (2/5) de Guamo y 20% (1/5) de Coyaima, Ortega, Melgar y Flandes respectivamente; según la anamnesis: 7 (37%) glomérulo nefritis, 5 (26%) dermatitis, 2 (11%) pérdida de peso, 1 (5%) signos nerviosos y onicogriphosis respectivamente y 3 (16%) asintomáticos.

De los 19 caninos reactivos a leishmaniasis, hubo una pérdida de 8 (42%) para un total de 11 (58%) casos a estudio, 8 (72,7) de Huila y 3 (27,3%) de Tolima (tabla 3).

Tabla 3. Características de la vivienda y de los caninos reactivos por serología a leishmaniasis

Variables	Tolima	%	Huila	%	Total	%
Características de la vivienda						
Material						
Bareque	1	3,3	0	0,0	1	9,1
Concreto	1	3,3	4	50,0	5	45,5
Tabla	0	,0	3	37,5	3	27,3
Guadua	1	3,3	1	12,5	2	18,2
Personas enfermas						
Basuras	0	0,0	2	25,0	2	18,2
Sanidad	1	3,3	4	50,0	5	45,5
Reservorios	2	66,7	5	62,5	7	63,6
	3	100,0	8	100,0	1	100,0

Etnobotánica	3	100,0	7	87,5	0	90,9
Quebradas	2	6,7	7	87,5	9	81,8
Plagas	2	6,7	7	87,5	9	81,8
Características de los caninos						
Sexo						
Macho	3	100,0	7	87,5	10	90,9
Hembra	0	0,0	1	12,5	1	9,1
Edad	6,3(±4,2), r=3-11		3,6(±1,3), r=2-5		4,4(±2,5) r=2-11	
Estado corporal						
Emaciación	1	33,3	0	0,0	1	9,1
Normal	2	6,7	8	100,0	10	90,9
Viajes	1	3,3	4	50,0	5	45,5
Presencia de signos y síntomas	3	100	7	87,5	10	90,9
Diagnóstico						
Histología	1	3,3	2	25,0	3	27,3
Identificación molecular	2	6,7	1	12,5	3	27,3

El 27,3% (3/11) de los casos reactivos se encontraban en tratamiento y les habían hecho el hemograma (tabla 4). El caso 1: canino macho de 11 años con signos clínicos de emaciación, sin pérdida del apetito, dermatitis, claudicación en el miembro posterior derecho. El hemograma reflejó una hemoglobina normal con valores mínimos; sin

embargo, se observó un valor aumentado de eosinófilos, leucocitos propios de cuadros parasitarios con bajo recuentos de monocitos (precursores de macrófagos) lo que demostró un estado de inmunosupresión en el animal pese a los valores de referencia T; el caso 2: canino macho de 5 años de edad, estado corporal normal, presencia de lesiones en piel. El hemograma evidencia niveles de hemoglobina por debajo de los rangos permisibles, un aumento en los linfocitos y cayados o bandas que reflejan un cuadro infeccioso generador de estrés en el animal, con un valor de plaquetas por encima de lo permisible evidenciando un estado agudo de la enfermedad y una disminución de la línea roja celular y el caso 3: canino macho de 2 años de edad, estado corporal normal, con presencia de signos nerviosos. El hemograma reflejó una disminución en las plaquetas del animal debido al deterioro del bazo, órgano blanco de *Leishmania* spp., al igual que el aumento en los leucocitos, linfocitos y neutrófilos propios de cuadro infecciosos, sumada al aumento de eosinófilos característicos de las afecciones parasitarias, en las cuales se encontraron cuerpos de inclusión citoplasmáticas inicialmente compatible con *Ehrlichia platys* y que posteriormente sería descartados bajo el diagnóstico de leishmaniasis

Tabla 4. Resultados de hemograma de caninos reactivos para leishmaniasis en tratamiento clínico

Elementos sanguíneos	Casos			
	Valores referencia	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Hemoglobina	13-19	13	10.9	13
Hematocrito	37-55	42	40	42
Leucocitos	6-13	13	11.	15.8
Hematíes	5,4-7,8	5,7	5.4	5.7
Neutrófilos	56-78	71	58	68
Linfocitos	10-30	260	38	20
Eosinófilos	0-6	6	0	7
Monocitos	0-5	1	0	0

Basófilos	0-1	0	0	0
Cayados	0-3	2	4	5
Plaquetas	200-400	400	440	38

Caracterización histopatológica de casos reactivos

Durante la realización de las necropsias de los caninos a nivel macroscópico se evidenciaron focos necróticos en piel y linfonodos. Los principales hallazgos microscópicos de cada uno de los once casos, se describen en las figuras 1 a 8. Los casos 2 y 3 no presentaron hallazgos debido a la negativa de sus propietarios a realizar la toma de muestras posterior a la eutanasia del animal.

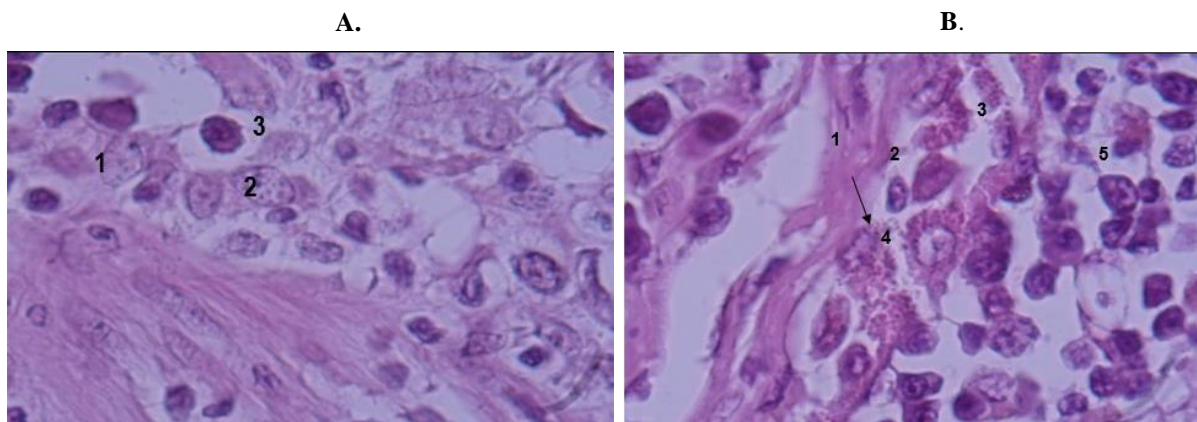
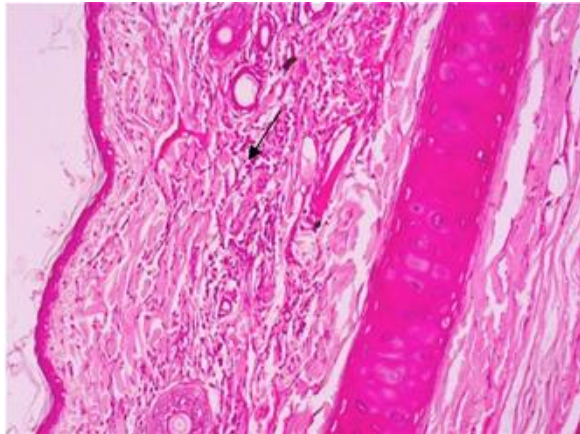


Figura 1. Hallazgos histopatológicos en piel y linfonodos, Caso 1. **A.** 1. Piel Infiltración severa linfoplasmocitaria moderada generalizada en la dermis. 2. Múltiples amastigotes en las células plasmáticas. 3. Infiltración de neutrófilos. **B.** Linfonodos: Capsula y senos subcapsulares. 2. Infiltración moderada de células plasmáticas. 3. Corteza, depresión severa generalizada, ausencia moderada de nódulo linfoides. 4. Medula: infiltración de células plasmáticas con abundante cantidad de amastigotes en el citoplasma (flecha). 5. Escasa infiltración de polimorfonucleados.



t

Figura 2. Hallazgos histopatológicos en piel Caso 4. Oreja. Dermatitis mixta de predominio mononuclear moderada generalizada crónica. Hematoxilina y eosina (H&E), 10X.

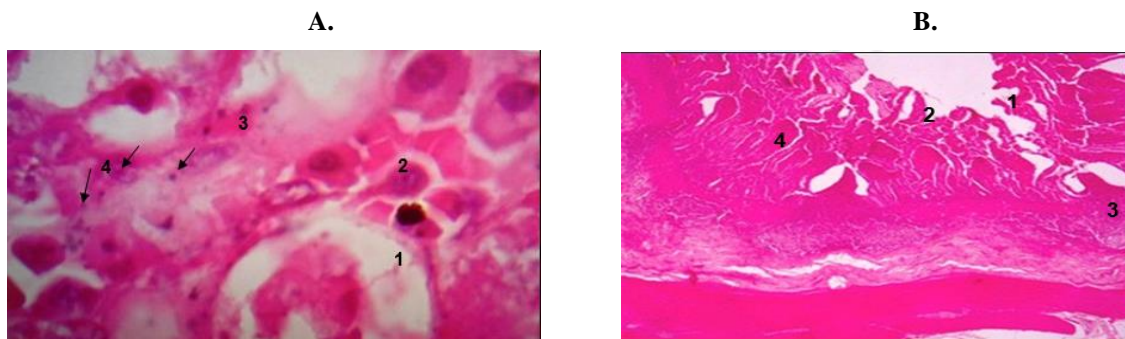


Figura 3. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 5. **A.** Riñón: 1. Necrosis de coagulación generalizada, moderada 2. Infiltración de células linfoplasmocitaria y macrófagos generalizada a moderada en los glomérulos y el intersticio. 3. Congestión leve multifocal. 4. Presencia de múltiples amastigotes de *Leishmania* spp. (Flechas) núcleo basófilo redondeado dentro de macrófagos. Hematoxilina y eosina (H&E), 10X **B.** Intestino: 1. Lumen: material eosinofílico amorfo con células descamadas y detritos celulares. 2. Mucosa: Atrofia y fusión severa de vellosidades. 3. infiltración severa generalizada de la lamina propia. 4. hiperplasia de las criptas liberkum.

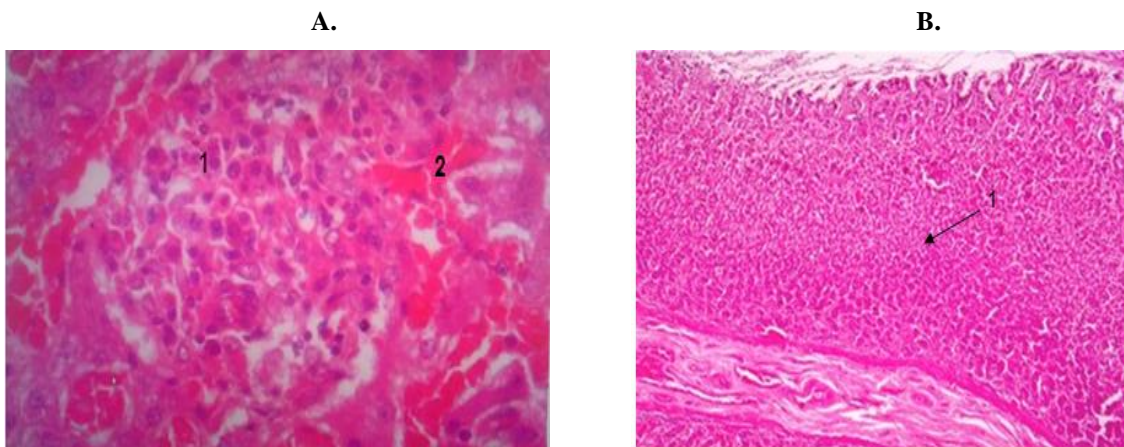


Figura 4. Hallazgos histopatológicos en riñón e intestino, Caso 6. **A.** Riñón: 1. Infiltración de células plasmáticas y congestión moderada 2. Congestion. H&E, 20X. **B.** Intestino: 1. Colitis mono nuclear moderada generalizada crónica (flecha) difusa leve con congestión. H&E, 10X.

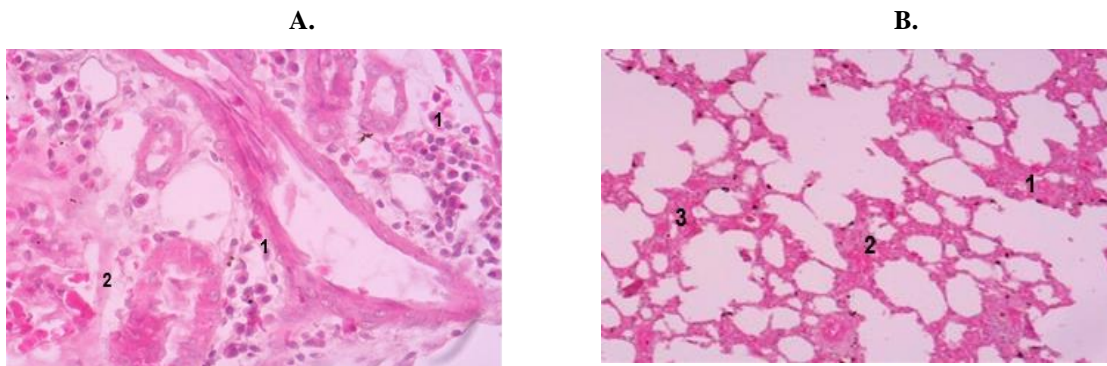


Figura 5. Hallazgos histopatológicos en riñón y pulmón, Caso 7. **A.** Riñón. 1. Infiltración, de células linfoplasmocitaria en intersticio 2. Congestión leve generalizada multifocal. **B.** Pulmón: Septos alveolares: 1. Engrosamiento moderado generalizada. 2. Congestión moderada. 3. Infiltración de células linfoplasmocitaria.

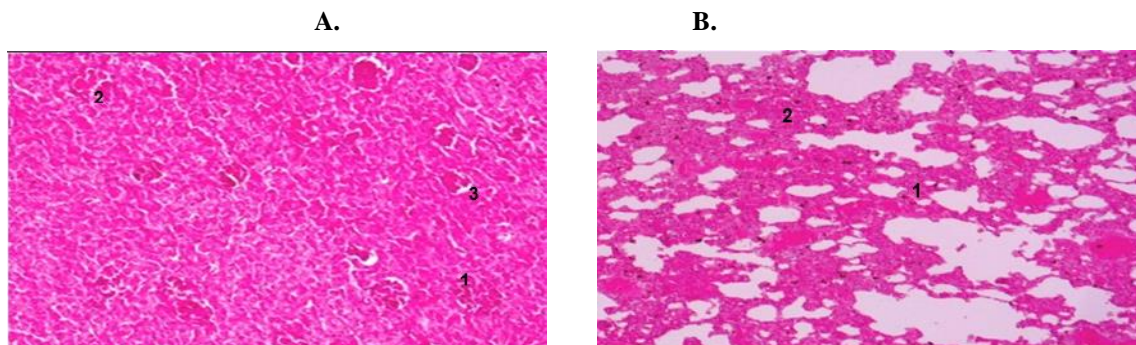


Figura 6. Hallazgos histopatológicos en riñón y pulmón, Caso 8. **A.** Riñón. 1 Infiltración multifocal leve de células linfo plasmocitarias. 2. Congestión leve multifocal. 3. Necrosis leve multifocal **B.** Pulmón: Neumonía intersticial severa generalizada crónica. 1 Infiltrado mononuclear. 2. Engrosamiento de septos alveolares moderado generalizado. H&E, 4X.

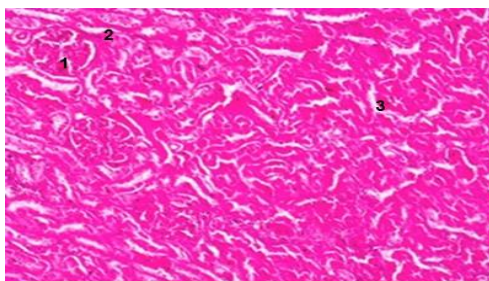


Figura 7. Caso 9. Riñón. 1. Corteza con presencia de edema leve generalizado. 2. Infiltración generalizada de células linfoplasmocitarias. 3. Necrosis de coagulación leve multifocal.

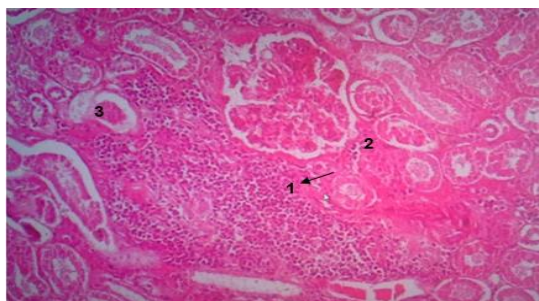


Figura 8 Caso 10. Riñón: 1. Nefritis intersticial linfohistiocitaria severa multifocal crónica (flecha). 2. Corteza: infiltración de células linfoplasmocitarias moderada en

intersticio y glomérulos. 3. Necrosis leve multifocal. Congestión moderada generalizada y necrosis leve. (H&E), 10X.

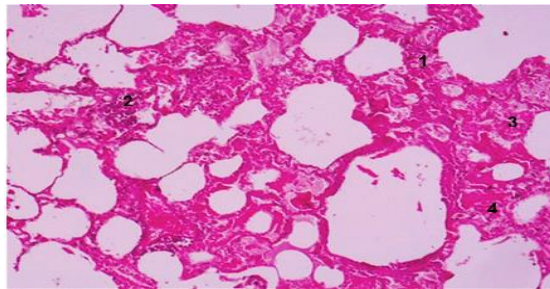


Figura 9. Hallazgos histopatológicos en pulmón, Caso 11. 1. Infiltración linfoplasmocitaria moderada multifocal 2. Septos alveolares: infiltración severa generalizada de células linfo plasmocitarias e histiocitos. 3. Engrosamiento de los septos alveolares y colapso del saco alveolar multifocal. 4. Congestión y edema generalizado moderado crónico. Neumonía intersticial moderada multifocal crónica. H&E, 10X.

Detección de *Leishmania* spp. mediante técnicas moleculares (PCR)

Posterior a la histopatología, se procedió a realizar las pruebas de PCR para su confirmación a partir de los tejidos conservados en alcohol absoluto (figuras 9). En la primera muestra del caso confirmado por PCR, se tomaron muestras del caso 1, (bazo, Nódulo linfático, Nódulo pancreático, piel, sangre y corazón) las cuales no amplificaron frente al control negativo y amplificaron a 314 pb (flecha) mostrado por el control positivo de *L. amazonensis*, confirmando la presencia de leishmaniasis en el animal. Para el caso 2, teniendo en cuenta que la lesión más representativa en este animal se encontraba en la piel, se efectuaron diferentes diluciones de la muestra de piel y de igual forma, se utilizó un control positivo *L. amazonensis* de 314pb (flecha) y un control negativo técnico, confirmando la presencia de leishmaniasis en el animal

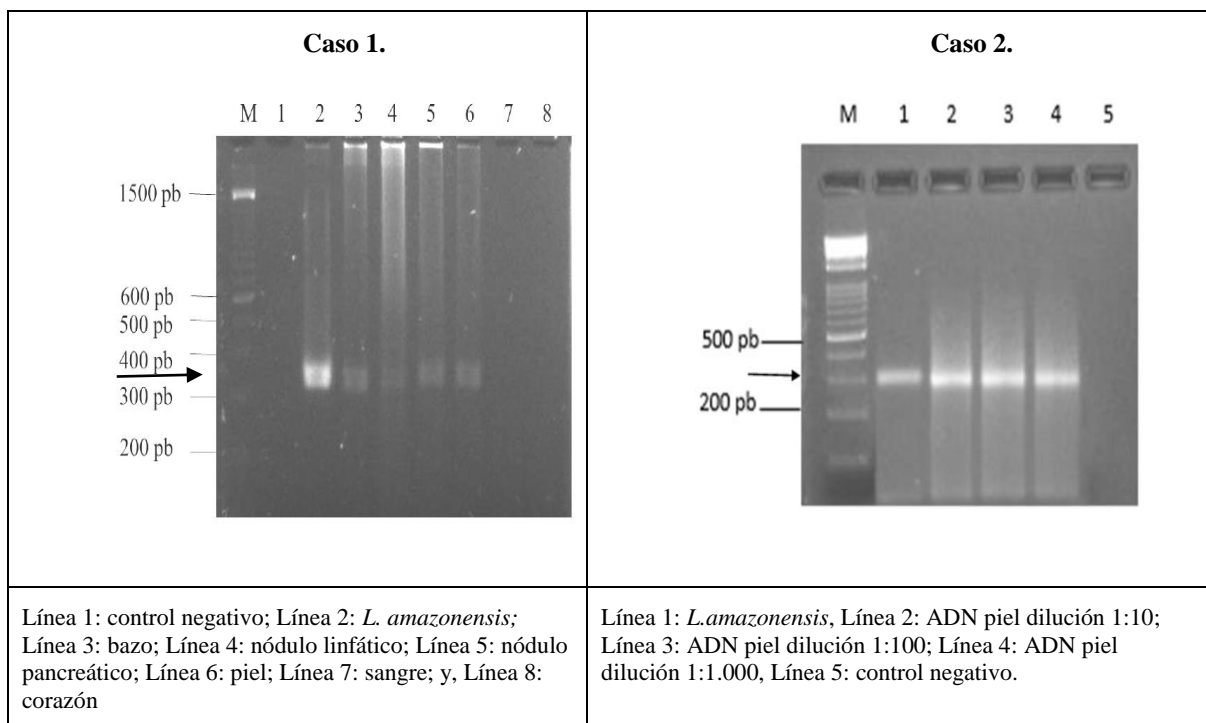


Figura 10. Detección molecular de *Leishmania* spp. Caso 1 y 2 por PCR convencional. Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima.

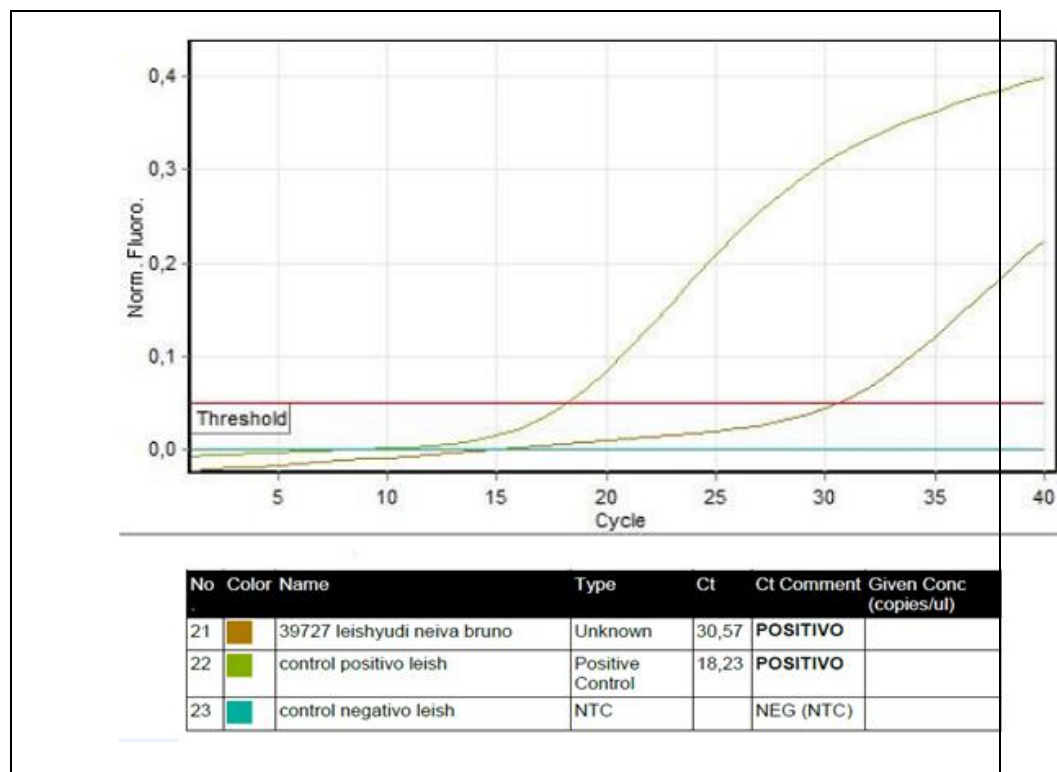


Figura 11. Detección molecular, PCR en tiempo real, Caso 3. Laboratorio comercial Mascolab. La muestra del canino identificado como Caso 3, mostró un umbral de 30,57 (línea marrón); sobrepasa el área bajo la curva del control negativo (línea azul) al igual que el umbral positivo 18,23 (línea verde) mostrando un cuadro positivo, confirmando la presencia de *Leishmania* spp. (Figura 10)

Posibles asociaciones entre el diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de leishmaniasis.

En términos de sensibilidad y especificidad, el 33% de los caninos positivos con leishmaniasis, fueron identificados por técnicas de PCR (sensibilidad del 33%) y el 66% fueron identificados con pruebas serológicas e histopatológicas (falsos negativos). La técnica de PCR identificó el 88% de los caninos positivos verdaderos con leishmaniasis (especificidad del 88%) y no identificó el 12% de los animales falsos positivos con un valor

predictivo positivo del 50%. Adicionalmente se demostró una asociación entre técnicas diagnósticas del 0,23 mediante la prueba estadística Kappa.

Identificación de factores eco epidemiológicos

Se realizó una encuesta epidemiológica a los 155 animales muestreados para identificar posibles factores de riesgos en la presentación del vector y la transmisión de la enfermedad, las características encontradas fueron:

La mayoría de los animales muestreados eran procedentes de Neiva (95%), mayormente machos (54%), sintomáticos (52.9%) y estado corporal normal (87.1%). El material de la vivienda mayormente encontrado fue madera o tabla, seguido de concreto y guadua. La variable etnobotánica (plantas) presentó el mayor porcentaje (76.8%), seguido de quebradas (69%), reservorios (66,5%) y la presencia de plagas (52,9%).

En la tabla 5. Se presenta el análisis de las variables eco epidemiológicas y su influencia en la presentación de casos reactivos por serología de leishmaniasis en caninos.

Tabla 5. Análisis de Ji cuadrado y OR de variables eco epidemiológicas. SPSS Static 2.0.

Variable	χ^2	p<0,05	OR	IC
Sexo	7.385	0,007	6	1,3-27,7
Plagas	8.25	0,004	6,5	1,4 30,3
Animales	8,93	0,003	-1	2,5-1
Viajes	5,123	0,024	4.03	1,2-13,3

Las variables analizadas con un nivel de significancia ($p<0,05$) mediante la prueba *Ji cuadrado*, fueron sexo, presencia de plagas, animales por vivienda, y viajes. Es decir los caninos machos tienen 6 veces más la probabilidad de contraer la enfermedad que las hembras (OR=6) y los que tengan en su entorno plagas tienen (OR=6.5) veces más riesgo

de contraer la enfermedad. Siendo (OR=4.03) veces más susceptibles aquellos que hayan tenido viajes recientes. Por su parte, la presencia de otros animales es un factor protector no significativo (OR=1). Por tanto existe evidencia estadística para no aceptar la hipótesis nula, lo que demuestra que a la luz de los datos de esta investigación las variables, sexo, plagas, animales y viajes favorecen la presentación de leishmaniasis.

DISCUSIÓN

La prevalencia de los caninos positivos diagnosticados para *Leishmania* spp. por pruebas serológicas tipo K39 *Kalazar detect* para este estudio fue del 12%, superior al 5% de la prevalencia esperada para la enfermedad (43) y a la reportada por Secretaría de Salud del Huila para los años 2008 a 2014 y concordante con el rebrote presentado en el 2017 del 22% de total de caninos muestreados, lo cual, la población infantil fue afectada con un riesgo de transmisión de la enfermedad.

Los anteriores hallazgos son equiparables al brote reportado en el año 2002. Por lo tanto, se obtuvo una prevalencia confirmada del 17,2% para Neiva, Algeciras y Tello (22), al igual que para Flandes y el municipio de Chaparral en el 2004 con 8.444 casos por 100.000 habitante (44); haciendo evidente la migración de los vectores de *Leishmania* spp., sus reservorios y población afectada de zonas selváticas como Amazonas y Orinoquía o endémicas a no endémicas hacia la regiones andinas incrementando la presencia peri urbana de la enfermedad como lo reportado en 2012 para Neiva. Exceptuando regiones geográficas nacionales como San Andrés, Atlántico y Bogotá que por sus condiciones físico demográficas no han facilitado el nicho del vector y presentación de la enfermedad (45).

Epidemiológicamente la presencia de leishmaniasis en las regiones de estudio, resulta acorde para países como Colombia que presenta un número de casos muy similar a Brasil que a su vez presenta una mayor tasa de incidencia de la enfermedad frente a otros países de América Latina como Chile y Argentina (46).

Valoración clínica, serológica y detección histopatológica

Al examen clínico realizado a los animales muestreados durante el presente estudio se evidenciaron algunos signos clínicos compatibles a la enfermedad y otros como glomérulo nefritis, emaciación, dermatitis y neumonía, Por tal motivo, podrían ser considerados como diagnóstico diferencial y/o coinfección con otros patógenos como *Erlichia* spp, *Anaplasma*, *Babesia*, *Neospora*, *Leptospira* y *Tripanosoma* sp en caninos y humanos (27) como lo evidencian los hemogramas de los casos obtenidos. Un signo no

comúnmente observado en los casos de estudio fue los repentinos ataques de epilepsia para uno de los pacientes confirmado por PCR en tiempo real, el cual pudo estar asociado al daño Espleno y factores pro inflamatorios generadas de estos órganos y absorbido por el SNC y periférico del animal (47).

La mayoría de los pacientes caninos positivos muestreados fueron sintomáticos (148/155). Por lo tanto, concuerda con lo reportado en la literatura. La variable sexo del animal y características asociadas al canino, como la edad tuvo una baja significancia estadística ($p < 0,05$), lo cual no concuerda con otros estudios en los que no se ha encontrado predisposición racial, sexual ni en humanos ni en animales (48).

Las muestras de sangre de los casos obtenidos para la aplicación de pruebas moleculares, como lo reportado por otros autores, no resultan útiles debido a la dificultad de encontrar el parásito en la sangre en el momento de la toma de la muestra (49); sin embargo, este tipo de muestra puede ser una opción útil para el diagnóstico clínico de la enfermedad y efectuar el aislamiento de *Leishmania* spp., a partir de medios de cultivos de parásitos como el NNN (Medio de Novy, MacNeal y Nicolle), obtenidos de pacientes con leishmaniasis que requieren mayor tiempo en la obtención de resultados; adicional a que son menos selectivos, poseen alto riesgo de contaminación por bacterias y son sensibles frente a otros tipo de parásitos (50).

De otro lado, los aspirados y biopsias de nódulo poplíteo y las lesiones propia de *Leishmania* spp., en tejidos blancos como piel, médula y bazo son útiles para la observación directa por la técnica de Montenegro y posterior cultivo para el crecimiento de los promastigotes, y tinción de Giemsa para análisis histopatológico para realizar la búsqueda del promastigote y evidenciar las posible lesiones generadas en el tejido los cuales pueden estar ligados a la presentación clínica de la enfermedad y a la experticia del personal encargado de visualizar la lámina (51). En este estudio la técnica de cultivo fue limitada por el crecimiento bacteriano presentado; sin embargo, los promastigotes fueron evidenciados mediante placas histopatológicas anteriormente descritas y obtenidas de los tejidos posterior a la necropsia de los casos positivos y observado por personal entrenado.

Los caninos positivos a *Leishmania* spp., debido al riesgo de salud pública de la enfermedad se les realizó la eutanasia. Durante la necropsia se observaron diferentes órganos como corazón, pulmones e intestino, en los cuales se encontraron en congestión, hipertrofia de nódulos linfoides, inflamación acorde a la fisiopatología de los órganos blancos de la enfermedad, reportada para casos clínicos humanos y caninos en el campo médico veterinario (52).

A nivel histopatológico, se observaron múltiples lesiones asociadas a la enfermedad como un número importante de amastigotes compatibles con *Leishmania* spp. Algunos autores describen la presencia de un amastigote como patognomónico de la enfermedad (53) y mediante confirmación específica de técnicas de Inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica se descarta una posible reacción cruzada con otros parásitos, partiendo de un sustrato antigénico y anticuerpo respectivamente, incluso ante la presencia de un escaso número de parásitos (51, 54, 55), como sucedió para el caso 1 de este estudio. Adicionalmente, la hipertrofia de los linfonodos, células mononucleares con proliferación de macrófagos, linfocitos, congestión, hemosiderosis, cordones medulares y células plasmáticas, apoptosis y posteriormente necrosis debido a la activación policlonal e inducción de los linfocitos B e inhibición parasitaria de las células T, como en los casos de estudio (56) han sido reportados en casos positivos de caninos, liebre y caballos en casos de leishmaniasis cutánea en la cual la piel es el primer y principal reservorio de la infección (57). También, la presencia de amastigotes en los macrófagos generalmente sugiere la existencia de neoplasias concomitante en los pacientes afectados y como fibrosarcoma, linfoma presentes en pacientes humanos con cáncer y VIH positivo (58).

Detección de *Leishmania* spp. por PCR y asociación de técnicas de diagnóstico

Para la preservación de los tejidos obtenidos de caninos positivos de *Leishmania* spp. y el posterior análisis histopatológico y molecular por PCR, se siguió el protocolo de parafinación (59) en 8 de los 11 casos expuestos. Posteriormente, se llevó a cabo la desparafinación empleando Xylol, con lo cual se obtuvo solamente 1% del ADN extraído, lo que disminuyó la probabilidad de una buena amplificación (60) debido a la inhibición por enzimas en la técnica PCR presentes aún en la muestra y la degradación del material

genético extraído, sumado también a la baja calidad de la parafina empleada (61) que conllevaron a la degradación del material genético extraído de los 8 casos inicialmente obtenidos. No obstante, se ha logrado obtener exitosamente material genético en cantidad y calidad, que ha permitido la amplificación por PCR de muestras de tejido embebidos en parafinas, alcohol absoluto y la confirmación de patologías y agentes infecciosos tipo bacterias o virus (62, 63) con kit como el *QIAamp* DNA FFPP (64) cuyo ADN extraído no se encuentre degradado por Xylol (62).

Durante el análisis estadístico de la información y medición de la asociación de las diferentes técnicas de diagnóstico, se encontró una mayor especificidad en el diagnóstico de leishmaniasis a las técnicas moleculares frente a las serológicas e histopatológicas (50), las cuales son más sensibles en la captación de posibles casos positivos que por PCR convencional o tiempo real (38). Permitiendo identificar presuntamente el protozooario en caninos con *Leishmania* spp., permitiendo conjuntamente confirmar más casos verdaderos positivos y descartando falsos positivos (65), siendo esto reafirmado por la concordancia obtenida de la prueba estadística clínica Kappa (78). Se demostró una asociación entre técnicas de diagnóstico y la superioridad de pruebas tipo PCR, mediante parámetros como la sensibilidad y especificidad para la determinación de casos realmente positivos en pro de la salud pública y animal.

El diagnóstico de leishmaniasis mediante técnicas moleculares, permite avanzar en nuevas estrategias terapéuticas, pese a lo no existencia actual de tratamientos avalados para caninos y su uso exclusivo en humanos con glucantime, pentosán y alopurinol, fármacos que pueden generar complicaciones cardiovasculares y renales por su uso prolongado. Algunos países han desarrollado vacunas para leishmaniasis (66). Sin embargo, para Colombia estas no han sido avaladas. Hallazgos de expresión genética frente la proteína HSP70 en *Leishmania* spp. (67) y secuencias de proteínas *DPP3* (LbDPP3) (68) y su posible inhibición y regulación enzimática son prometedoras frente a un tratamiento más selectivo, menos agresivo y de menor resistencia (69) frente a diferentes patologías ocasionadas por *Leishmania* spp.

Estudio eco epidemiológico y determinación de factores de riesgo

Diversos factores de riesgo para la presentación de leishmaniasis, han sido reportados a nivel socioeconómicos y su incidencia sobre la calidad de vida de las personas que se encuentran en zonas endémicas de la enfermedad tales como: actividad económica, tipo de vivienda, barrios, condiciones sanitarias y presencia de animales callejeros como el perro, que se convierten en reservorios como ha sido documentado en otros países como Argentina y Brasil (70).

La presencia de vectores hematófagos, animales reservorios, la devastación y destrucción de hábitat propician el desplazamientos de las personas y sus mascotas fomentando crecimiento de asentamientos sub urbanos, convirtiendo los animales en blanco de enfermedades emergentes y reemergente debido al carácter antropozoonótico de la leishmaniasis Por tal motivo, este estudio presentó una asociación significativa para la presentación de casos con un valor de 0,024 ($p < 0,05$) para la variable viajes.

La realización de la encuesta epidemiológica, durante el diagnostico de los animales muestreados indagó sobre la presencia de otros animales. Por lo tanto, el análisis estadístico mostró una significancia del 0,003 ($p < 0,05$), debido a que también otros organismos pueden ser hospederos ocasionales como lo reportado para animales domésticos y silvestres como el gato, caballos, zarigüeyas y conejos, donde el promatigote a través de su flagelo migra desde los diferentes órganos destruyendo todo tipo de tejidos del hospedero, al igual que en los reservorios accidentales y/o definitivos (72).

Los animales positivos encontrados poseían la eco epidemiología concurrente para la presentación de la enfermedad, tales como: estar en regiones de bosque seco tropical similares a otras presentadas en el ámbito nacional, donde se han presentado brotes de importancia en salud pública (73) un tipo de plaga y vector más frecuente de la leishmaniasis es *Lutzomia longigalpis*, que ha sido asociado como principal transmisor. *L. infantum* (74). En este estudio los valores de Ji cuadrado obtenidos para la variable plagas, evidenció una significancia estadística del 0,004 ($p < 0,05$) con la presentación de casos de *Leishmania* spp., por lo que pueden existir otros vectores para la transmisión de leishmaniasis, ya que existen 93 vectores confirmados del parásito en diferentes países,

siendo el transmisor de la enfermedad casi siempre las hembras hematófagas que inoculan el parásito al reservorio y salen en épocas de baja pluviosidad (75).

Basado en la prevalencia encontrada, los hallazgos clínicos, histopatológicos de los casos positivos a *Leishmania* spp. y pruebas de diagnóstico molecular realizadas en este estudio, se puede determinar que la leishmaniasis es una enfermedad prevalente, en la que los órganos mayormente afectados son la piel, riñón y pulmón que denota la presentación de la Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral en la población canina (76).

Eco epidemiológicamente los factores de riesgo, más predisponentes que caracterizan la presentación de la enfermedad son la presencia de plagas y otros animales, que requieren atención por parte de los entes territoriales de salud para el mejoramiento de las condiciones sanitarias de la población y poder disminuir la presentación de casos en las regiones donde esta enfermedad es reemergente.

8 CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *Leishmania* spp, en los caninos muestreados fue del 12% (19/155) sobre la prevalencia antes reportada para la enfermedad.
2. De los 155 caninos muestreados por serología 19 resultaron positivos mediante la técnica Kalazar detect, 2 positivos por histopatología y 3 confirmados por técnicas de PCR.
3. En los tejidos analizados, dermis, hígado, corazón, pulmón, riñón e intestino, los hallazgos histopatológicos más característicos de los tejidos afectados es la presencia de células plasmáticas, necrosis del tejido y formación de granulomas que revela la acción del parásito sobre el tejido y la respuesta inflamatoria e infecciosa a la *Leishmania* spp.
4. Se confirmaron 3 casos positivos a *Leishmania* spp. mediante técnicas de PCR en muestras de tejidos caninos.
5. Para medir el nivel de asociación de las diferentes técnicas diagnóstico de leishmaniasis se indagó por la sensibilidad y especificidad de las tres pruebas demostrando una alta especificidad a las técnicas moleculares frente a la técnica histopatológica y serológicas para la detección de casos de *Leishmania* spp. Encontrando una concordancia o asociación entre las diferentes técnicas.
6. Los factores de riesgos eco epidemiológico para la presentación de casos de leishmaniasis en este estudio según la prueba de Ji cuadrado y determinación de *OR* para las variables fue la presencia de otros animales y plagas.

RECOMENDACIONES

Establecer periodos fijos en los planes de salud, que permitan monitorear permanentemente el flujo de *Leishmania* spp. En la población humana y canina de procedencia callejera para prevenir la inminente leishmaniasis (enfermedad reemergente) peri domiciliaria.

Revisar planes sanitarios y proporcionar mayor cobertura por parte de las entidades prestadoras de salud frente a la presencia de plagas, manejo de animales callejeros, manejo de aguas residuales en poblaciones en condiciones suburbanas con factores de riesgos atenuantes de la presentación de casos positivos en humanos y caninos.

9 REFERENCIAS

1. Zoghalmi Z, Chouihi E, Barhoumi W, Dachraoui K, Massoudi N, Helel KB, et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta tropica*. 2014;139:32-8.
2. Mejía Z, Ceferino S. Situación de la leishmaniasis en pacientes atendidos en el Centro de Salud de Trojes, municipio de Trojes, El Paraíso, Honduras 2008: CIES UNAN-Managua; 2009.
3. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis 2017 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>].
4. Lukeš J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(22):9375-80.
5. Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Moros S, José M, Molina Moreno R, et al. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española de Salud Pública*. 2012;86:555-64.
6. Organización Mundial de la Salud. Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Ginebra: OMS; 2012. 200 p.
7. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis en las Américas para los trabajadores de salud: Datos y Cifras; 2018 [Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>].
8. Gómez Romero SE, Zambrano P. Informe de evento: Leishmaniasis hasta XIII período epidemiológico del año 2012. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2012. 27 p.

9. Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉM, Ker HG, de Brito RCF, et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary parasitology*. 2013;197(3-4):498-503.
10. Ministerio de la Protección Social., Instituto Nacional de Salud., Organización Panamericana de la Salud. Guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis. Bogotá: OPS/OMS Convenio de Cooperación Técnica con el Ministerio de la Protección Social Nro. 256 de 2009 y Nro. 237; 2010.
11. Torres GE. Informe de evento: Leishmaniasis hasta el período epidemiológico XIII, Colombia, 2017. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2018. 27 p.
12. Colombia., Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021: La salud en Colombia la construyes tú. Bogotá.D.C.: MinSalud; 2013. 452 p.
13. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo SdP. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saúde Pública*. 2001;17:171-80.
14. Torres GE. Informe del evento leishmaniasis hasta el período epidemiológico XIII, Colombia, 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2017. 29 p.
15. Gobernación del Huila., Secretaría de Salud Departamental. Comportamiento otras enfermedades vectoriales y zoonosis, Huila, 2017. *Boletín epidemiológico Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis*. 2017(Semana 21):1-2.
16. Elías C, Vanessa M. Estudio serológico y molecular de *Leishmania* spp. en canidos domésticos de dos cantones del municipio de San Ildefonso, Departamento de San Vicente, El Salvador: Universidad de El Salvador; 2010.
17. Flórez M, Martínez JP, Gutiérrez R, Luna KP, Serrano VH, Ferro C, et al. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander, Colombia. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2006;26(Supl 1):109-20.

18. Quaresma PF, Murta SMF, de Castro Ferreira E, da Rocha ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*. 2009;111(3):289-94.
19. de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini ÂC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary parasitology*. 2006;140(3-4):231-8.
20. Qubain HI, Saliba EK, Oskam L. Visceral leishmaniasis from Bal'a, Palestine, caused by *Leishmania donovani* sl identified through polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Acta tropica*. 1997;68(1):121-8.
21. Membrive NA, Rodrigues G, Gualda KP, Bernal MVZ, Oliveira DM, Lonardoni MVC, et al. Environmental and animal characteristics as factors associated with American cutaneous leishmaniasis in rural locations with presence of dogs, Brazil. *PLoS One*. 2012;7(11):e47050.
22. Zambrano-Hernandez P, Ayala-Sotelo MS, Fuya-Oviedo P, Montenegro-Puentes CA, Aya-Vanegas NM, Aguilera-Jaramillo G, et al. Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de salud publica*. 2015;17:514-27.
23. Morales DF, Castaño CS, Lozano EA, Vallejo HJ. Descripción de la epidemia de leishmaniasis cutánea en Chaparral y San Antonio, 2003 y 2004 (semana 24). *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 2004;9(12):177-92.
24. Rincón MY, Silva SY, Dueñas RE, López-Jaramillo P. Leishmaniasis cutánea diseminada: reporte de dos casos en Santander, Colombia. *Revista de salud publica*. 2009;11:145-50.
25. Melo GD, Goyard S, Fiette L, Boissonnas A, Combadiere C, Machado GF, et al. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. *Scientific reports*. 2017;7(1):8454.

26. Laurenti M, de Santana Leandro Jr M, Tomokane T, De Lucca H, Aschar M, Souza C, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 2014;205(3-4):444-50.
27. Krawczak FdS, Reis IA, Silveira JAd, Avelar DM, Marcelino AP, Werneck GL, et al. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015;48(1):64-8.
28. Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JC. Detection of Leishmania DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental parasitology*. 2008;119(3):343-8.
29. Colombia., El Congreso de Colombia. Ley por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Ley 84 de 1989 (diciembre 27).
30. Garcés Giraldo LF, Giraldo Zuluaga C. Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista lasallista de investigación*. 2012;9(1).
31. Costa M, Lima W, Figueiredo M, Michalick M, Tafuri W, Tafuri W. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Veterinary pathology*. 2008;45(5):613-6.
32. Abda IB, De Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(1):17-22.
33. Álvarez-Hernández G, Delgado-DelaMora J. Diseño de Estudios Epidemiológicos. I. El Estudio Transversal: Tomando una Fotografía de la Salud y la Enfermedad. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora*. 2015;32(1):26-34.

34. Hernández Ávila M. Epidemiología: diseño y análisis de estudios: Ed. Médica Panamericana; 2007.
35. Huaynates MG. Leishmaniasis canina. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
36. Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Morán M, Russomando G. Caracterización de cepas de Leishmania, por medio de la técnica de PCR-RFLP de la región del Spliced Leader Miniexon (SLME), aisladas de humanos y caninos en Paraguay. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 2012;10(1).
37. Al-Nahhas SA, Kaldas RM. Characterization of Leishmania species isolated from cutaneous human samples from Central Region of Syria by RFLP Analysis. ISRN parasitology. 2013;2013.
38. Guerrero G, Alvarado G, Gutiérrez M, González G, Álvarez O, Luna R. Detection of three citrus viroids species from Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico by conventional and real time RT-PCR. Revista Mexicana de Fitopatología. 2013;31(1):20-8.
39. Generalitat de Catalunya. Decreto por el que se establecen los métodos de eutanasia para los animales de compañía que se tienen que sacrificar. Decreto 254 de 2000 (julio 24): Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya
40. Comunidad Autónoma de Cataluña. Decreto legislativo por el que se aprueba el Texto refundido de la Ley de protección de los animales. Decreto Legislativo 2 de 2008 (abril 15).
41. Colombia., El Congreso de Colombia. Ley por la cual se adopta al Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Ley 84 de 1989 (diciembre 27).
42. Colombia., Ministerio de Salud. Resolución por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Resolución 008430 de 1993 (octubre 4).
43. Thrusfield M. Veterinary epidemiology: John Wiley & Sons; 2018.

44. Ferro C, Marín D, Góngora R, Carrasquilla MC, Trujillo JE, Rueda NK, et al. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(5):847-56.
45. Ferro C, Fuya P, Perez S, Lugo L, Gonzales G. Valoración de la ecoepidemiología de la leishmaniasis en Colombia a partir de la distribución espacial y ecológica de los insectos vectores [Assessment of the eco-epidemiology of leishmaniasis in Colombia via the spatial and ecological distributions of vector insects]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2011;31(suppl 3):50-9.
46. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(1):e584.
47. Giannuzzi A, Ricciardi M, De Simone A, Gernone F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *Journal of Small Animal Practice*. 2017;58(3):125-38.
48. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary parasitology*. 2013;196(3-4):296-300.
49. Montenegro Arcila MC, Barbosa S, Carlos J. Evaluación de tres pruebas de pcr para la identificación de *Leishmania (Viannia)* en diferentes muestras biológicas: Facultad de Ciencias; 2009.
50. Montalvo A, Fraga J, Monzote L, Garcia M, Fonseca L. Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Revista cubana de medicina tropical*. 2012;64(2):108-31.
51. Burna A, Alvarez J, Sánchez Negrette M, Maidana H. Confirmación histopatológica de leishmaniosis visceral en un canino de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*. 2010;21(2):148-50.
52. Acero P, Ángel B, Fonseca B, Ferrer L, Roura X. Canine Leishmaniosis: tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 2015;20(3):4822-42.

53. Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in parasitology*. 2008;24(8):371-7.
54. Fonseca LG, de Paz Capó V, López M, Gutiérrez A. Detection of *Leishmania infantum* in an experimentally-infected hamster using immunohistochemistry. *Revista cubana de medicina tropical*. 2011;63(3):257-62.
55. Vásquez Huerta L, Ruelas Llerena N, Córdova Benzaquen E. Patrones de coloración en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas. *Acta Médica Peruana*. 2011;28(1):19-22.
56. Moreira PRR, de Barros Bandarra M, Magalhães GM, Munari DP, Machado GF, Prandini MM, et al. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 2013;192(1-3):149-57.
57. Ramos-Vara J, Ortiz-Santiago B, Segales J, Dunstan R. Cutaneous leishmaniasis in two horses. *Veterinary pathology*. 1996;33(6):731-4.
58. Vélez L, Diego J, Carrillo C, Cristina D. Leishmaniasis cutánea y anfotericina B liposomal: Reporte de caso. *Infectio*. 2013;17(4):201-4.
59. Wang J-H, Gouda-Vossos A, Dzamko N, Halliday G, Huang Y. DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffinembedded human brain tissue. *Neuroscience bulletin*. 2013;29(5):649-54.
60. Llanes A, Restrepo CM, Del Vecchio G, Anguizola FJ, Lleonart R. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. *Scientific reports*. 2015;5:8550.
61. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin J-C. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(4):368-71.

62. Baena Del Valle JA, Ramos Moreno AJ, Gómez Alegría CJ, Gómez-Camargo DE. Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2013;15(1):172.
63. Ilhak OI, Arslan A. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2007;31(3):159-63.
64. QIAGEN. QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook. For purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: QIAGEN Sample & Assay Technologies; 2012. 24 p.
65. Ríos Yuil JM, Yuil de Ríos E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares en leishmaniasis cutánea. *Rev med cient*. 2010;23(2):45-60.
66. Bongiorno G, Papparcone R, Manzillo VF, Oliva G, Cuisinier A-M, Gradoni L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—A preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*. 2013;197(3-4):691-5.
67. Ramírez C, Dea-Ayuela M, Gutiérrez-Blázquez M, Bolas-Fernández F, Requena J, Puerta C. Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis*. *Journal of proteomics*. 2013;94:124-37.
68. Nocua P, Ramírez C, Requena JM, Puerta CJ. Secuencia parcial del genoma del maxicírculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos. *Universitas Scientiarum*. 2011;16(1):29-50.
69. Diaz JR, Ramírez CA, Nocua PA, Guzman F, Requena JM, Puerta CJ. Dipeptidyl peptidase 3, a novel protease from *Leishmania braziliensis*. *PloS one*. 2018;13(1):e0190618.
70. López K, Tartaglino LC, Steinhorst II, Santini MS, Salomón OD. Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2016;36(1).

71. Monsalve S, Mattar S, González M. Zoonotic transmitted by wild animals and its impact on emerging and re-emerging diseases. *Revista MVZ Córdoba*. 2009;14(2):1762-73.
72. Calvay-Sánchez KD, Rojas-Palomino NM, Sandoval-Juarez AC, Cisneros-Tarmeño A, Obregón-Cahuaya C, Minaya-Gómez GS. Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de leishmania (*viannia*) *braziliensis* y leishmania (*viannia*) *peruviana*, en línea celular dh82. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2015;32(1):33-40.
73. Fernández M J, Escovar JE, Lozano CA, Nicholls RS, Vargas JJ, Moncada LI, et al. Prevalencia de Leishmaniosis visceral canina en municipios de Huila-Colombia. *Revista de salud publica*. 2002;4(3):278-85.
74. Fernández MS. Eco-epidemiología de vectores de *Leishmania* spp. en el noreste de la Argentina (Provincia de Misiones): Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires; 2012.
75. Pennisi MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Veterinary parasitology*. 2015;208(1-2):35-47.
76. Travi BL. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014;34(1):7-12.
77. Ramírez J, Hernández C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific RepoRts*,2016 .| 6:28266 |DOI: 10.1038/srep28266.
78. Azzimonti J, La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: problemas y solución. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39 (4): 435-44

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1. Encuesta eco-epidemiológica

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE LEISHMANIASIS EN CANINOS EN HUILA Y TOLIMA

DATOS	Dirección:	Personas
Materiales		
Volantes informativos		
<i>Número de personas. ¿Existen personas enfermas?</i>		Bareque ___ Concreto ___ Guadua ___ Tabla ___
Signos agudos a crónicos		<i>Disposición de excretas y basuras:</i>
Estadios Febriles		Recolección programadas relleno municipal
<i>Presentan algún tipo de lesión ulcerosa</i>		Acopio improvisado
Ubicación de lesión		Entierro.
Tienes bordes definidos Si o No		Tiempo almacenamiento de basuras
Tamaño		<i>Presencia de plantas intradomiciliarias</i>
<i>¿Signos Gástricos?</i>		¿Qué plantas?
Diarreas inespecíficas		¿Cultivos cerca?
Hemorragias		Plátano
Tiempo de presentación de los síntomas		¿Qué más?
<i>Actividad económica familiar: Tipo de vivienda / Materiales</i>		<i>Cercanía a quebradas o caños</i> Si, ¿cuál?
		<i>Presencia de animales. ¿Cuáles?</i>

Inventario de animales domésticos
(perros y caballos) y silvestres existentes en
la zona que puedan ser reservorios

Presencia de plagas.

Presencia extra y peri domicilio

Mosquitos. Horarios de mayor
presencia

Ha observado ratas o zarigüeyas

Fecha de última fumigación

Reconoce este insecto

Número de caninos:

Sexo _____ Edad _____ Tiempo de
permanencia _____ Lugar de
permanencia _____ Raza de
caninos _____

Nota: Realizar seguimiento los
perros, caballos y otros animales que puedan
presentar lesiones cutáneas sospechosas en
las que se pueda identificar el parásito.

Examen Clínico Animal

Evaluación general y condición
corporal

1 = delgado _____ 2 = bajo de
peso _____

3 = ideal _____ 4-5 = sobrepeso _____

Dieta:

*Presencia de signos anormales
¿tiempo de presentación?*

Úlceras cutáneas

Onicogriphosis o hipertrofia de las
uñas

Áreas depiladas o alopecicas

Prurito

Lesiones eritematosas

Problemas gástricos.

Linfadenitis

Hepatomegalias

Antecedentes hemorrágicos

Otros

*Estado sanitario –Colocar la
información relevante en cualquiera de estos
aspectos*

Desparasitación

Dieta

Tratamiento previo

Historia de vacunación:

Desplazamientos en los últimos 6
meses – 1 año

Observaciones

10.2 Anexo 2. Consentimiento informado

GRUPO DE INVESTIGACIÓN _____

INVESTIGACIÓN:

Título: CARACTERIZACION HISTOPATOLOGICA, MOLECULAR DE LEISHMANIASIS SPP. EN CANINOS DE TOLIMA Y HUILA

 _____ Ciudad y fecha: _____ Yo,
 _____ con CC _____ una vez informado sobre los propósitos, objetivos, procedimientos de intervención y evaluación que se llevarán a cabo en esta investigación y los posibles riesgos que se puedan generar de ella, autorizo a _____, estudiante de la Universidad Autónoma de Manizales, para la realización de las siguientes procedimientos:

1. Realización de Necropsia _____
2. Toma de muestras de órganos blanco para histopatología e identificación molecular _____

Adicionalmente se me informó que:

Mi participación y la de mi perro en esta investigación son completamente libre, voluntaria y estamos en libertad de retirarnos de ella en cualquier momento.

No recibiré beneficio personal de ninguna clase por la participación en este proyecto de investigación. Sin embargo, se espera que los resultados obtenidos permitirán mejorar los procesos de evaluación de pacientes humanos y caninos con condiciones clínicas similares a las mías y las de mi mascota.

Toda la información obtenida y los resultados de la investigación serán tratados confidencialmente. Esta información será archivada en papel y medio electrónico. El

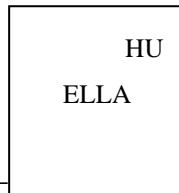
archivo del estudio se guardará en la Universidad Autónoma de Manizales y del Tolima bajo la responsabilidad de los investigadores.

Puesto que toda la información en este proyecto de investigación es llevada al anonimato, los resultados no pueden estar disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros u otras instituciones educativas. Esto también se aplica a mi cónyuge, a otros miembros de mi familia y a mis médicos.

Acepto y autorizo que se tomen muestras del animal y en caso de que la prueba resulte positiva, sea entregado a la autorización sanitaria competente para que sea realice la eutanasia bajo todas las condiciones de bienestar animal para la toma de órganos blancos sin recibir pago alguno como propietario del animal.

Hago constar que el presente documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad de manera libre y espontánea.

Firma Documento de identidad _____ No. _____



Huella Índice derecho:

10.3 Anexo 3. Base de datos encuesta eco epidemiológica

ANIN O	ERS ON AS ENF ER MA S	IVI EN DA	AS UR AS	LA NT AS	UEB RAD AS	NI MA LES	LA GA S	IGN OS	IA JE S	AN ID AD	IST OLO GIA	D A D	EX O	COR POR AL	ERO LO GIA
ABRA DOR B Caso 5)	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	RES ENCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
ARZA N Caso 1)	O	AR EQ UE	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	RES ENCI A		AC HO	MAC IACI ON	OSI TIV O
ABRA DOR C Caso 6)	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
UAM O- TOLI	O	UA DU A	O	I	O	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O

MA															
NIAS Caso 9)	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
EX Caso 7)	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
IRAD OR Caso 10)	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	I	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
LUTO N	O	ON CRE TO	O	I	I	USE NCI A	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
EUS	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UCAS	O	ON CRE TO	I	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ASAN DRA	O	ON CRE	I	I	I	RES EN	USE NCI	USE NCI	I	I	USE NCI		EM BR	ORM AL	EGA TIV

		TO				CIA	A	A			A		A		O
ITBU LL	O	ON CRE TO	I	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UNA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OBY	O	ON CRE TO	I	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
INA	O	AB LA	I	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ULGO SA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
COT	O	ON CRE TO	I	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ACH A	O	ON CRE TO	I	I	O	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ACH O	O	ON CRE TO	I	I	O	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

ACH A	O	ON CRE TO	I	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
RONC O	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ICHE LLE	O	AB LA	I	O	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ATI	O	UA DU A	O	I	I	USE NCI A	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
USY	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
INO	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A		I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ONY	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OEL	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

EGRA	O	AB LA	O	O	O	USE NCI A	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HIQU I	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
IMON	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UNEC A	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ALU	O	ON CRE TO	I	O	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ATEO	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
SCOB Y	O	ON CRE TO	I	O	O	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
INA	O	AB LA	I	I	O	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O

ELUS A	O	AR EQ UE	I	O	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
ECHA S	O	AB LA	O	O	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
ARA	O	AB LA	I	O	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ACO	O	AB LA	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
OSAL BA	O	AB LA	O	O	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
NAK Y	O	AB LA	O	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
AISE R	O	AB LA	O	O	O	USE NCI A	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
NA	O	ON CRE TO	O	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O

IRUL AIS	O	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
ROSK Y	O	AB LA	O	O	O	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
UNA	O	ON CRE TO	I	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
OBY	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
HILIN DRIN A	O	ON CRE TO	I	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HOM AS	O	AB LA	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ANC HAS	O	ON CRE TO	O	O	O	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ATU	I	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

HALL O	O	AB LA	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ASTI AN	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UINC HA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
RIDA	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
STRE LLA	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ACH A	O	ON CRE TO	I	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OBY	O	AB LA	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ITI Caso 8)	I	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	OSI TIV O

ASHA	O	AB LA	I	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
EPO	O	AB LA	I	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ARTI N	O	AR EQ UE	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
INO1	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
ZABA CHE	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OTAS	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OBIA S	O	ON CRE TO	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
INO2	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

AMB O	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
USY	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
LOR	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
UANI TA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	BES O	EGA TIV O
OCK Y Caso 4)	O	ON CRE TO	I	O	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
ART	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
INO	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
UNEC A	O	AB LA	O	I	I	RES EN	RES EN	USE NCI	O	I	USE NCI		EM BR	ORM AL	OSI TIV

						CIA	CIA	A			A		A		O
IARA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ONY	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ODA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
LACA	O	ON CRE TO	I	O	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ACOB O	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
LANC ANIE VES	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HOLU PA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
COBY	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

IRA	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
AND Y	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
UNA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
INKY	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OBY	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
AMO N	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
EO	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OCO	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

ATEO	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UCK Y	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
AMA NTA	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HUK Y	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
RINC ESA	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ASSIE	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HEST ER	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
HAD O	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

NAST ASIA	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
IMBO L	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
AYSO N	I	AB LA	O	I	O	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
INKY	O	ON CRE TO	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	I	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ISKY	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ENYI	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OTTA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
EGAL O	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

UCAS	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
OTTA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
AMB O	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ENIZ A	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
NIX	O	AB LA	O	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ONA	O	AB LA	O	O	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ACH A	O	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ONG A	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

ICKY	I	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ARZA N	O	AB LA	O	O	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
URQ UESA	O	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ATEO	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ATHY	I	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
RUN O	I	ON CRE TO	O	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ARIP OSA	O	ON CRE TO	I	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
UNEC O	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O

ERON	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UPE	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ANC HAS	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ATAS HA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HOM AS	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
HIST ER	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
UPIT A	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OG	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	BES O	OSI TIV O

ARIP OSA	O	AB LA	O	O	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	MAC IACI ON	EGA TIV O
RINCI PE	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
IA	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
USIT A	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ICAS	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	EGA TIV O
ROSK Y	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ONAL UNA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
IEJA	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O

ERRY	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
ANEL A	O	AB LA	O	I	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ANIA	O	UA DU A	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	I	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OLIA T	O	ON CRE TO	I	O	O	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
AZY	O	AB LA	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
ITLE R	I	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	O	USE NCI A		AC HO	MAC IACI ON	OSI TIV O
ANG O	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
ISKY 2	O	AB LA	O	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O

ICHY	O	AB LA	O	I	O	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
OLA	O	AB LA	O	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	EGA TIV O
HIQU ITIN	O	AB LA	O	O	O	RES EN CIA	RES EN CIA	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	EGA TIV O
VATA R Caso 2)	O	ON CRE TO	I	I	I	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
EBE	O	AR EQ UE	O	I	I	RES EN CIA	USE NCI A	USE NCI A	O	O	USE NCI A		EM BR A	ORM AL	OSI TIV O
RCA	I	AR EQ UE	O	I	I	USE NCI A	USE NCI A	USE NCI A	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
RUN O Caso 3)	O	ON CRE TO	I	I	O	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	I	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O

ARBO NERO CAIF AS Caso 11)	O	UA DU A	O	I	O	RES EN CIA	RES EN CIA	RES EN CIA	O	I	USE NCI A		AC HO	ORM AL	OSI TIV O
---	---	---------------	---	---	---	------------------	------------------	------------------	---	---	-----------------	--	----------	-----------	-----------------

10.4 Anexo 4. Extracción del DNA a partir de muestras embebidas en parafina

Concentración de ADN y verificación de calidad basado en absorbancia a A260 nanómetros

Código	Cuantificación A260	A260	260/280
N1ABaUT	96,6 ng/uL	1,932	1,64
N1BCoUT	28,4 ng/uL	0,543	1,59
N1CHiUT	7,9 ng/uL	0,157	1,93
N1DInUT	27,6 ng/uL	0,552	1,74
N1ENIUT	28,7 ng/uL	0,599	1,66
N1FPaUT	43,9 ng/uL	0,871	1,71
N1GPiUT	10,2 ng/uL	0,192	1,74
N1HPuUT	33,2 ng/uL	0,664	1,61
N1IRiUT	9,6 ng/uL	0,191	1,63
N2AInUT	38,3 ng/Ui	0,766	1,62
N2BPuUT	11,4 ng/uL	0,229	1,76
N2CRiUT	21 ng/uL	0,419	1,61
N2DB1UT	39 ng/uL	0,762	1,47
N2EB2UT	45,2 ng/uL	0,912	1,62
N2FB3UT	20,6 ng/uL	0,412	1,54
N3ABaUT	7,8 ng/uL	0,157	1,46
N3BInUT	13,1 ng/uL	0,261	1,55
N3CPiUT	19,6 ng/uL	0,392	1,66
N4AEnUT	25,8 ng/uL	0,517	1,82
N4BInUT	36 ng/uL	0,719	1,61
N4CPaUT	21,6 ng/uL	0,42	1,58
N4DPiUT	12,1 ng/uL	0,242	2,07
N4EPuUT	44 ng/uL	0,881	1,61
N4FRiUT	38,3 ng/uL	0,766	1,62
N5AInUT	24,9 ng/uL	0,491	1,74

N5BPuUT	91,8 ng/uL	1,836	1,82
N6AB1UT	14,3 ng/uL	0,286	1,83
N6BB2UT	26,6 ng/uL	0,538	1,57
N7AHiUT	14,5 ng/uL	0,29	1,61
N7BDerUT	3,7 ng/uL	0,073	1,45
N7CBaUT	12,4 ng/uL	0,248	1,64
N7DInUT	6,1 ng/uL	0,123	1,43
N7ETonUT	14,6 ng/uL	0,296	1,52
N7FPuUT	19,6 ng/uL	0,392	1,51
N7GRiUT	15,5 ng/uL	0,31	1,62
N7HPuUT	15,5 ng/uL	0,31	1,45
N7IPuUT	9,9 ng/uL	0,203	1,49
N8AGaUT	34 ng/uL	0,687	1,83
N8BRiUT	37,8 ng/uL	0,772	1,84
N8CNoUT	14,1 ng/uL	0,358	1,74
N8DCoUT	9,6 ng/uL	0,192	1,6
N8EPuUT	60,5 ng/uL	1,194	1,86
N8FRiUT	40,5 ng/uL	0,811	1,22
N8GRiUT	40,2 ng/uL	0,807	1,75
N8HPaUT	30 ng/uL	0,618	1,83
N8IBaUT	41,2 ng/uL	0,91	1,64
N8JYeUT	34,8 ng/uL	0,765	1,7
N8KCiUT	44,7 ng/uL	0,9	1,78
N8LTrUT	7 ng/uL	0,14	1,4
N8MCoUT	10,7 ng/uL	0,24	1,51

Pruebas realizadas por el centro nacional de secuenciación genómica de la Universidad de Antioquía para lograr la detección molecular de *Leishmania* spp., a partir de tejido embebido en parafina.

10.5 Anexo 5. Calculo Kappa

[1] Concordancia entre dos observadores:

Datos:

	1	2
1	1	1
2	2	7

Nivel de confianza: 95,0%
 Número de categorías: 2
 Tipo de ponderación: No ponderar

Resultados:

Acuerdo observado: 0,7273
 Acuerdo esperado: 0,6446

Kappa	EE*	IC (95,0%)	
0,2326	0,3220	-0,3986	0,8637

*EE: error estándar

Kappa mínimo: -0,1579
 Kappa máximo: 0,4923

Resultados:

Acuerdo observado: 0,7273
 Acuerdo esperado: 0,6446

Kappa	EE*	IC (95,0%)	
0,2326	0,3220	-0,3986	0,8637

*EE: error estándar

Kappa mínimo: -0,1579
 Kappa máximo: 0,4923

10.6 Anexo 6 Comunicados de aceptación seminario nacional e internacional.

ENICIP 2017

Cordial saludo,

Es un agrado para nosotros informarle que su trabajo "Diagnóstico serológico e histopatológico de Leishmania spp. en caninos en regiones endémicas del Tolima y Huila" fue aceptado para la presentación en el XIV Encuentro Nacional y VII Internacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias a realizarse en el mes de noviembre del presente año. Estar pendiente en la página del evento para el proceso de pago.

Juan Carlos Carmona Agudelo
Coordinador Comité Científico y Evaluador ENICIP 2017

Sociedad Española de Epidemiología (SEE) y del XIII Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia 2018.



Yenny Paola Picón-Bonilla
Ceagrodex del Huila S.A.
Neiva-Huila
Colombia

Lisboa, 09 de julio de 2018

Estimado/a Yenny Paola Picón-Bonilla,

En nombre del Comité Científico de la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Española de Epidemiología (SEE) y del XIII Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia (APE), que tendrá lugar en la Universidade Nova Lisboa (España), los días 12 al 14 de septiembre de 2018, le informamos que su trabajo:

1168 - Diagnóstico serológico e histopatológico de Leishmania spp. en caninos en regiones endémicas del Tolima y Huila, 2016

cuyos autores son:

YP. Picón-Bonilla, VE. Rodríguez Gutiérrez, DA. Urrea, N. Verjan García, JA. Cuellar Gil
ha sido aceptado para su presentación como póster electrónico con defensa en esta Reunión.

Creemos que su particular experiencia puede ser especialmente enriquecedora, por este motivo, tenemos el placer de invitarle oficialmente a participar en este importante evento.

Le envío la presente carta de invitación oficial para que pueda realizar los trámites pertinentes y venir a Lisboa.

Esta invitación no cubre el coste de su inscripción o cualquier otro tipo de apoyo económico. Por favor, si desea más información no dude en visitar la página web del congreso: www.reunionanualsee.org

Esperando poder contar con su participación y quedando a su disposición para cualquier consulta al respecto, aprovechamos la ocasión para saludarle atentamente.

Silvia De Sanjosé
Presidenta del Comité Científico