

Estudio seroepidemiológico en un criadero canino para evaluar la respuesta en anticuerpos frente a *Leptospira spp*

CARMEN SIMÓN VALENCIA*

CARMELO ORTEGA RODRÍGUEZ**

CLAUDIO SALDIVIA SALDIVIA***

JOSÉ LUIS ALONSO MARTÍNEZ****

Fecha de recepción: 2 de septiembre de 2009

Fecha de aprobación: 10 de noviembre de 2009

Resumen

Se realizó un estudio seroepidemiológico entre mayo y julio del 2003, en un criadero canino de Huesca (nordeste de España) para evaluar el título de anticuerpos frente a leptospiras (LPT). Se analizaron 207 perros de razas Golden Retriever (GR), Labrador Retriever (LR) y Perro de Montaña del Pirineo (PM) (80 adultos y 127 cachorros). Se recogieron muestras de suero secuencialmente en cachorros: a las 6 semanas de edad (D0), a las 8 semanas de edad (D1, primera vacunación de LPT), a las 10 o 12 semanas (D2, segunda vacunación), y a las 2-4 semanas de la anterior (D3, tercera vacunación). Todas las vacunas eran polivalentes. Los perros adultos eran vacunados anualmente en abril con una vacuna pentavalente. El suero se extrajo en julio. Se usó la técnica Elisa para detectar Acs IgG frente a LPT. Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa Epi-Info. La media de título de Acs de los adultos ($7,7 \text{ Log}_2, 1/208$) era superior a la de los cachorros ($5,6 \text{ Log}_2, 1/49$), ($p = 0,0000$). Se encontró asociación entre el género y el título de Acs ($p \leq 0,05$), siendo más elevado en las hembras adultas. En los cachorros, el momento de la extracción estaba asociado con diferencias en el título de Acs ($p \leq 0,05$). Entre las 6 y 8 semanas de edad, se observó un ligero aumento del título de Acs sin estar vacunados. Puede que los cachorros hubieran contactado con leptospiras del entorno. Tras la vacunación, se observó seroconversión parcial. La raza GR mostró mejor respuesta a la primera vacunación.

*

M.V., Ph.D.,
Profesora titular
Facultad de Veterinaria
de la Universidad de
Zaragoza. Unidad de
enfermedades infecciosas
del Departamento de
Patología animal, Correo
electrónico:
mcsimon@unizar.es

**

MV. Ph.D, Profesor
titular Facultad
de Veterinaria de
la Universidad de
Zaragoza. Unidad de
enfermedades infecciosas
del Departamento de
Patología animal
Correo electrónico:
epidemio@unizar.es

MV. Ph.D, U. de Zaragoza. Profesor del Departamento de Medicina y Cirugía del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA). Barquisimeto Venezuela. Correo electrónico: claudiosaldivia@ucla.edu.ve

MV. Ph.D, Profesor titular Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Correo electrónico: jalonso@unizar.es

Palabras clave

Criadero, epidemiología, leptospira, perro, respuesta inmune, vacunación

ESTUDO SEROEPIDEMIOLÓGICO NUM CRIADOR DE CÃES PARA AVALIAR A RESPOSTA A ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA SPP.*

Resumo

Realizou-se um estudo seroepidemiológico, desde maio a julho de 2003, num criador de cães de Huesca (Nordeste de Espanha), para avaliar o título de anticorpos (Acs) anti-leptospira (LPT). Testaram-se 207 cães das raças Golden Retriever (GR), Labrador Retriever (LR) e Cão de Montanha dos Pirinéus (PM): 80 adultos e 127 cachorros. Recolheram-se amostras sequenciais de soro em cachorros: às 6 semanas de idade (D0), às 8 semanas de idade (D1, primeira vacinação LPT); às 10 ou 12 semanas (D2, segunda vacinação); e, por último, após 2-4 semanas após a extração anterior (D3, terceira vacinação). Todas as vacinas eram polivalentes. Os cães adultos eram vacinados anualmente, em abril, com uma vacina polivalente, sendo o soro extraído em julho. Utilizou-se a técnica ELISA para detectar Acs IgG anti-LPT. Os resultados analisaram-se estatisticamente recorrendo ao programa Epi-Info™. A média de título de Acs dos adultos (7.7 Log^2 , 1/208) era superior à dos cachorros (5.6 Log^2 , 1/49), ($p = 0.0000$). Encontrou-se uma associação entre o género e o título de Acs ($p \leq 0.05$), sendo este mais elevado em fêmeas adultas. Nos cachorros, o momento da extração estava associado a diferenças no título de Acs ($p \leq 0.05$). Entre as 6 e as 8 semanas de idade, observou-se um ligeiro aumento do título de Acs nos animais não vacinados: é possível que os cachorros tenham estado em contacto com leptospirose presente no ambiente. Após a vacinação, observou-se uma seroconversão parcial. A raça GR mostrou uma melhor resposta à vacinação.

Palavras chave

Criador, epidemiologia, leptospira, cão, resposta imune, vacinação

SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY IN A KENNEL TO EVALUATE THE ANTIBODIES RESPONSE AGAINST *LEPTOSPIRA SPP*

Abstract

It was carried out a seroepidemiologic study from May to July 2003, in a canine breeding in Huesca (Northeastern Spain), to evaluate the antibody titer against leptospires (LPT).

The study included 207 dogs of different breeds: Golden Retriever (GR), Labrador Retriever (LR), and Pyrenean Mountain dog (PM). 80 were adult and 127 puppies. Serum samples of puppies were taken sequentially: at 6 weeks old (D0), at eight weeks old (D1, day of the first LPT vaccination), at 10-12 weeks old, (D2, day of the second LPT vaccination); at 2-4 weeks of the previous (D3, third vaccination). All these vaccines were polyvalent. Adult dogs were vaccinated annually in April with a pentavalent vaccine, serum was taken in July. The ELISA test was used to detect IgG antibodies against pathogenic LPT. The results were analyzed by Epi Info statistical programme. Adult dogs showed higher mean of Ab titres against LPT (7.7 Log^2 , $1/208$) than that of the puppies (5.6 Log^2 , $1/49$), ($p = 0.0000$). There was association between genre and Ab titres reached ($p \leq 0.05$), where adult females had the higher Ab titres. In puppies, the moment of sampling was associated to differences on Ab titres ($p \leq 0.05$). In the interval from 6 to 8 weeks old it was observed a slight increase of the mean of Ab titres, without being vaccinated, probably they had natural contact with leptospires. It was observed a partial seroconversion after the first and second LPT vaccination. GR breed showed the best immune response to the first LPT vaccination.

Keywords

Breeding, canine, epidemiology, immune response, leptospira, vaccination

Introducción

El manejo de un criadero para prevenir las enfermedades infecciosas se basa en una compleja variedad de medidas relacionadas con el control de microorganismos y parásitos en el entorno, como cortar las vías de transmisión, mantener a los perros en buenas condiciones de salud por medio de una adecuada dieta, controlar la genética y el estrés y llevar a cabo programas de vacunación y antiparasitarios que pretenden evitar importantes pérdidas económicas (Lawler, 2006).

Los programas de vacunación deben ser especialmente diseñados para cada criadero o colectividad canina (Greene & Schultz, 2006), aunque generalmente empieza a las 6 semanas de edad, con las valencias del virus del moquillo (CDV) y/o parvovirus canino (CPV2), vivas atenuadas. En las siguientes vacunaciones, las vacunas polivalentes pueden contener además del CDV y CPV2, el adenovirus

canino tipo 2 (CAV2) vivo, el virus parainfluenza 2 canino (PiV) vivo y leptospiras serovariedades *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* (LPT) inactivadas, que suelen ser el diluyente de los virus vivos liofilizados. Estas vacunas polivalentes son usadas con edades igual o superiores a 8 semanas. Los cachorros que permanecen más tiempo en el criadero reciben una tercera vacuna polivalente alrededor de los 3 meses de edad. Los perros que se quedan en el criadero son vacunados anualmente con vacunas polivalentes.

En consecuencia, un criadero ofrece la oportunidad de trabajar con una población canina que comparte numerosos factores comunes (el manejo, la alimentación, los programas de vacunación y antiparasitarios, las condiciones medioambientales, el clima, la microflora medioambiental, etc.), y las variaciones del título de la respuesta en anticuerpos (Acs) a la vacunación se puede esperar que se deban a la capacidad individual de respuesta del sistema inmune o a factores inherentes a estos individuos, como la raza, el género o la edad.

Con el fin de detectar los efectos de los programas de vacunación intensiva y evaluar los factores que, potencialmente, pueden estar relacionados con los títulos de Acs alcanzados frente a LPT, se estudió un criadero de perros de las razas Golden Retriever (GR), Labrador Retriever (LR) y Perro de Montaña del Pirineo (MP).

Este estudio no pretende establecer si los perros de este criadero estaban bien protegidos o no frente a la infección por leptospiras, lo que debería realizarse con costosos y éticamente poco recomendados estudios de desafío con el agente virulento. Únicamente se pretende dar una idea aproximada del estado inmune humoral producido por la vacunación en perros de una colectividad canina en la que los cachorros son la población más importante.

Por otro lado, un criadero tampoco puede representar a la respuesta inmune que dan los perros domésticos individualmente, en los que las condiciones de vida pueden ser muy diferentes, por lo que los resultados de este estudio se han considerado como un ejemplo de los que se puede encontrar en un criadero de condiciones similares.

Materiales y métodos

Animales del estudio

El criadero Torre de Justo está ubicado en Huesca (España), en un área forestal de 20000 m², a 2 km de esta ciudad. Este criadero no ha tenido brotes de moquillo, parvovirus hepatitis infecciosa canina o leptospirosis al menos en los 5 años anteriores a la realización del estudio.

El criadero está formado por 2 edificios de 300 m², con parque para cada sala en la zona de alojamiento de los adultos, y sin parque en las salas de cría de los cachorros. Los adultos se distribuyen por la edad, la raza, el sexo y el comportamiento. Las razas estudiadas son Golden Retriever (GR), Labrador Retriever (LR) y Perro de Montaña del Pirineo (MP).

Se analizaron 207 perros, 80 de ellos adultos y 127 cachorros. En los perros adultos, 22 eran GR (5 machos y 17 hembras), 49 LR (9 machos y 40 hembras) y 9 PM (3 machos y 6 hembras). En el grupo de los cachorros, fueron 41 GR (22 machos y 19 hembras), 70 LR (22 machos y 48 hembras) y 16 PM (7 machos y 9 hembras).

Vacunas

El criadero utilizaba de forma habitual vacunas de la casa Intervet S.A. La vacuna viva atenuada Puppy DP de Moquillo (CDV) y Parvovirus Canino (CPV2). Vacuna Nobivac DHPPi+L con una fracción viva atenuada liofilizada formada por las valencias CDV, CPV2, CAV2 y CPiV con el diluyente que contiene la vacuna muerta de *Leptospira* serovariedades *Canícola* e *Icterohaemorrhagiae* (LPT).

Diseño del estudio

El estudio se realizó entre mayo y julio del 2003. Cuatro muestras de suero de los cachorros se tomaron de forma secuencial: el día 0 (D0), se vacunaba frente a CDV y CPV2. Tras 2 semanas (D1), se vacunaba por primera vez frente a LPT con la vacuna polivalente. Tras 2 a 4 semanas de la anterior (D2), se repetía la vacuna polivalente (segunda vacuna frente a LPT). Los cachorros que permanecían más tiempo en el criadero recibían otra vacuna polivalente entre 2 a 4 semanas

tras la anterior (D3). Los perros adultos son vacunados cada año con la vacuna polivalente en abril, y se realizó una sola extracción de suero en julio.

Test serológico

La detección de Acs IgG frente a leptospiras patógenas se realizó por el método Elisa, según la técnica utilizada en la Unidad de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Utrecht (The Netherlands). El antígeno de la prueba se había obtenido a partir de la envoltura de la cepa Wijnberg de *Leptospira* sv. *Copenhageni*, por un método de extracción con detergente aniónico (Sting y Dura, 1994).

Análisis de datos

Este es un estudio observacional transversal. Los datos se introdujeron en la base de datos Excel y el análisis estadístico se realizó con el programa EpiInfo, usando el Anova y el test de Kruskal-Wallis, aplicado al Log^2 del título de Acs.

Resultados y discusión

El test Elisa utilizado en el estudio para detectar los Acs IgG en suero se ha desarrollado como sustitución del test de Microaglutinación (MAT), debido a la dificultad y riesgo que entraña este último al utilizar como antígeno las leptospiras vivas. El método de extracción de los antígenos de la envoltura de leptospiras es el propuesto por Sting y Dura (1994). No es específico de la serovariedad, pero es común a todas las leptospiras patógenas. En general, la medición de la tasa de Acs es el método de laboratorio preferido para evaluar la inmunidad (Burr, 2006). Los sueros control usados en la técnica Elisa habían sido evaluados por la técnica MAT y los títulos se han calculado de acuerdo a los resultados obtenidos con los controles positivo y negativo. En general, diferentes estudios que comparan ambas técnicas le dan niveles de correlación superiores al 95% cuando se establece el dintel 1/100 de positividad con la técnica MAT. Se ha reconocido la utilidad de las pruebas serológicas para demostrar la respuesta a la vacunación y en estudios seroepidemiológicos (Adler, 2010; Jimenez-Coello y col., 2008; Sting y Dura, 2004).

En el conjunto de la población estudiada (tabla 1), los perros adultos del criadero presentaron una media del título de Acs ($7,7 \text{ Log}_2$; 208), superior a la media de los

cachorros (5,6 Log₂; 49). Estas diferencias eran estadísticamente significativas (p = 0,0000). También el género estaba asociado al título de Acs (p = 0,0298), siendo las hembras las que mostraban los títulos más altos. No se observaron diferencias entre las razas cuando se consideraron en conjunto los adultos y los cachorros.

Tabla 1. Media del título de anticuerpos IgG frente a LPT en relación con la edad, la raza y el sexo en el conjunto de los perros del criadero (técnica Elisa)

Factor	n.º	Media	Título ¹	Factor	n.º	Media	Título	Factor	n.º	Media	Título ¹
Ad	80	7,7	208	GR	87	6,2	74	Hembra	156	6,6	97
Ch	164	5,6	49	LR	120	6,6	97	Macho	88	5,8	56
				MP	37	5,6	48				
Obs	244	P =	0,0000	Obs	244	P =	0,0776	Obs	244	P =	0,0298

El suero de los adultos se había recogido a los 2-3 meses de la última vacunación con LPT, y como se esperaba, la media del títulos de Acs fue más elevada que la de los cachorros (Day, 2007). Las vacunas frente a LPT son bacterinas a las que se les atribuye baja inmunogenicidad. Esto podría explicar una peor respuesta inmune en los cachorros, en los que, a pesar de nacer con el sistema inmune desarrollado y tener capacidad para responder frente a antígenos, se sabe que esta respuesta es inferior a la del adulto durante el primer año de vida (Day, 2007; Schultz y col., 2010).

En el conjunto de los perros, se encontró que las hembras presentaban mayor título que los machos. En un estudio realizado con perros Labrador Retriever se ha puesto de manifiesto diferencias en la calidad y cantidad de la respuesta inmune en machos y hembras (Greley y col., 2001). Por el contrario, otros autores no encuentran diferencias en los títulos alcanzados frente a la vacuna de rabia en relación con el género (Kennedy y col., 2007), aunque se trata de vacunas diferentes y pueden originar diferentes tipos de respuesta.

En los perros adultos no se ha encontrado asociación entre la raza y el género con la respuesta de anticuerpos, tampoco se ha encontrado cuando se analizan las madres por separado (P > 0,005).

1 Para el cálculo de la media en este apartado, se han tenido en cuenta el conjunto de observaciones realizadas. Acs: anticuerpos IgG; Ad: adultos; GR: golden retriever; LPT: *Leptospira* spp; LR: labrador Retriever; Obs: n.º de observaciones; MP: perro de montaña del Pirineo; Ch: cachorro.

En el grupo de los cachorros (tabla 2), no se observó asociación del título de Acs con el sexo o la raza; sin embargo, sí se observó en relación con el momento de la recogida de la muestra ($p = 0,0000$). Es un hecho curioso que la media de los títulos fuera aumentando progresivamente en cada extracción, aunque en las dos primeras no se hubieran vacunado.

Tabla 2. Media de anticuerpos IgG frente a LPT en cachorros y su relación con el momento del muestreo, la raza y el sexo² (técnica Elisa)

Factor	n.º	Media Log2	Media título	Rango título	Rango Log2
D0	26	2,9	7	0 - 35	0,0 - 5,1
D1	47	5,1	34	0 - 1280	0,0 - 10,3
D2	74	6,3	79	0 - 1280	0,0 - 10,3
D3	17	7,9	239	16 - 1100	4,0 - 10,1
Obs	164	P =	0,0000		
GR	63	5,7	51	0 - 1280	0,0 - 10,3
LR	73	5,7	51	0 - 989	0,0 - 9,9
PM	28	5,0	32	2 - 603	1,0 - 9,2
Obs	164	P =	0,3770		
Hembra	93	5,7	54	3 - 1080	1,6 - 10,1
Macho	71	5,4	43	0 - 1280	0,0 - 10,3
Obs	164	P =	0,3399		

En la primera extracción (D0), con 6 semanas de edad, los títulos oscilaban desde negativo a 1/35 (5,1 Log²), lo que indica que se trata de restos de Acs maternos. El título 1/100 en MAT se considera el umbral de positividad en suero (Levett, 2003), y dada la alta correlación encontrada entre la técnica MAT y ELISA, se podría decir que los sueros de los cachorros a las 6 semanas ya eran negativos y, en consecuencia, podían encontrarse indefensos ante la infección (figura 1).

2 Se tiene en cuenta la media del total de observaciones hecha a lo largo del periodo de estudio; Acs: anticuerpos; D0: 6 semanas de edad; D1 y D2: momento de la inoculación de la primera y segunda vacunación frente a leptospiras; D3: 2 a 4 semanas tras la segunda vacunación; GR: golden retriever; LPT: *Leptospira* sv. Canicola e Icterohaemorrhagiae; LR: labrador retriever; MP: perro de montaña del Pirineo.

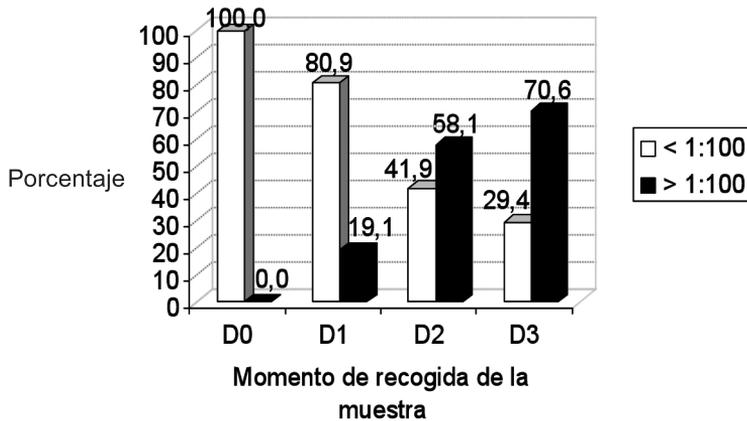


Figura 1. Porcentaje de cachorros con título de Acs frente a LPT $\leq 1/100$ o $> 1/100$ (técnica Elisa), en relación con el momento de la extracción³

En el D1 (día en el que reciben la primera vacuna frente a leptospiras), con 8 semanas de edad, se detectó un 80,9% de sueros con títulos inferiores a 1/100 (figura 1). Sin embargo, 9 de los cachorros tenían sueros positivos, y 5 presentaron valores superiores a 1/400. Esto sugiere que los cachorros habían tenido contacto con leptospiras patógenas en su entorno y aunque no mostraban síntomas de infección. Títulos tan elevados pueden indicar infección activa (Adler, 2010; Levett, 2003).

Los perros y los roedores (ratones y ratas, principalmente) son considerados reservorios de algunas serovariedades de LPT (*Caninola* en el perro, *Bataviae*, *Bra-tislava*, *Icterohaemorrhagiae* en ratas y ratones, etc.). Los perros infectados por la sv. *Canícola* pueden excretar la bacteria en la orina, incluso tras la vacunación, ya que se considera que no siempre protege frente a la infección (Adler, 2010; Andre-Fontaine, 2000).

Tras 2-3 meses de la última revacunación, los perros adultos de este criadero presentaban un rango de título de Acs desde 1/18 (4,2 Log₂) a 1/644 (9,3 Log₂), ya que solo 1 de los 80 perros adultos alcanzó el título 1/1024 (10,0 Log₂). Por

3 D0: 6 semanas de edad; D1: 8 semanas de edad, momento de la primera vacunación frente a leptospiras; D2: 2 a 4 semanas tras la primera vacunación y segunda inoculación de vacuna frente a leptospiras; D3: 2 a 4 semanas desde la segunda vacunación.

otro lado, 6 adultos (7,5 %) no superaron el título 1/100, y 4 de ellos eran hembras. Una respuesta deficiente a la vacunación podía ser la causa de la presencia de portadores de leptospiras entre los adultos del criadero, y las hembras en esta situación podrían ser la fuente de infección para sus cachorros. Por otro lado, en el entorno campestre en el que se encuentra ubicado el criadero es muy difícil controlar los roedores y estos podrían contaminar con su orina infectada el ambiente en el que se encuentran los cachorros (Adler, 2010; Prescott, 2008).

Tras 2 a 4 semanas desde la primera vacunación frente a leptospiras (D2), la media del título de Acs no era superior al valor 1/100 (6,3 Log²; 79) y el aumento del título respecto a la del día D1 (5,1 Log²; 34) no se puede considerar seroconversión positiva. Únicamente tras 2 a 4 semanas de la segunda vacunación (D3), se observó una media del título de Acs superior a 1/100 (7,9 Log²; 239), con un aumento de 3,02 veces respecto a la media del D1 (figura 1). Además, solo un 70,6% de los cachorros habían alcanzado valores superiores a 1/100 tras la segunda vacunación. Únicamente los cachorros de raza Labrador Retriever llevaron una progresión continua ascendente y tras la segunda vacunación la media del título fue superior a 1/400, siendo más elevada que la alcanzada por los cachorros Golden Retriever y montaña del Pirineo.

Se admite que la protección frente a la infección es de tipo humoral (RIH), salvo en algunas especies como los bóvidos, en los que se ha demostrado respuesta inmune celular (RIC) (Adler, 2010; Naiman y col., 2001). Esto también se ha sugerido para la respuesta a la vacunación en los perros (Tronel et ál., 1999); sin embargo, no ha sido confirmado posteriormente. Se sabe que los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las leptospiras están implicados en la protección. Las vacunas utilizadas en especies animales y en humanos son inactivadas de las bacterias completas o fracciones de su membrana externa, en las que el componente antigénico más importante son los LPS, aunque también se encuentran involucradas proteínas y lipoproteínas de la membrana externa (Adler, 2010). Sin embargo, se les atribuye baja inmunogenicidad, de modo que se considera necesario realizar un mínimo de dos vacunaciones en la primovacuna, y en casos de alto riesgo se asume que las revacunaciones se deben realizar en intervalos inferiores a un año.

Tras la observación de los resultados hallados en este criadero, sería más recomendable hacer una tercera inoculación a los cachorros para aumentar el por-

centaje de perros con títulos de anticuerpos superiores a 1/100. Las bajas tasas de anticuerpos es posible que protejan frente al desarrollo de la enfermedad pero podrían ser insuficientes para evitar el desarrollo de portadores de la bacteria en la orina. También es necesario recordar que no hay protección cruzada entre serogrupos, de modo que los perros vacunados con las serovariedades *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* podrían infectarse con otras serovariedades prevalentes en el medioambiente (Prescott, 2008).

Más recientemente, han sido comercializadas vacunas en las que se ha estudiado la protección frente a la infección y se proclama que los perros está protegidos frente a la infección con las sv *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* al menos 1 año en una mayoría de los vacunados, tras la segunda vacunación (Klaasen y col., 2003; Minke y col., 2009; Schreiber y col., 2005). Este estudio se realizó en épocas anteriores a la comercialización de estas nuevas vacunas y no es posible saber si su uso podría mejorar el estado inmune de los perros frente a esta infección en condiciones naturales, y particularmente en criaderos donde las hembras están sometidas a la reproducción continuada, y la inmunodepresión asociada a la gestación, al parto y a la convivencia en colectividad numerosa, que podría estar influyendo en la intensidad de la respuesta y la duración de la inmunidad tras la vacunación.

No se ha encontrado asociación entre los títulos de Acs IgG frente a LPT y la raza de los cachorros, aunque la raza montaña del Pirineo mostraba la media de títulos más baja. Recientemente, en relación con la respuesta a la vacuna de la rabia, se ha observado que las razas de tamaño pequeño muestran títulos más altos y mayor duración de la inmunidad que las razas grandes (Kennedy y col., 2007). En este caso, dentro de las tres razas del criadero, la de montaña del Pirineo es la de mayor tamaño y el resultado concuerda con lo observado por estos autores.

Al estudiar cada raza por separado (tabla 3), los cachorros de las tres razas estudiadas mostraban asociación ($p < 0,05$), entre el momento del muestreo y el título de Acs. En el D0 y D1, en los que los cachorros no habían sido vacunados frente a LPT, los títulos eran bajos e irregulares en las tres razas. Dos semanas tras la primera vacunación frente a leptospiras se encontró asociación entre la raza y el título de Acs alcanzado ($p = 0,0193$). Solo los cachorros de Golden Retriever presentaron una media de título de anticuerpos superior a 1/100 ($7,3 \text{ Log}^2$; 158) y se observó una buena seroconversión (aumento de 6 veces sobre el título anterior), seguido por los Labrador Retriever (aumento de 3,6 veces respecto al anterior),

mientras que los de raza Montaña del Pirineo presentaron la media de anticuerpos más baja (5,5 Log²; 45). En el D3, parece observarse una relación inversa entre el título alcanzado con la primera vacuna (momento D1) y el conseguido tras la segunda vacunación, aunque en este caso las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$), y el número de cachorros presentes en este momento en cada raza era muy bajo, por lo que los resultados son poco fiables.

Tabla 3. Media del título de Acs frente a LPT en los cachorros en relación con la raza y el momento del muestreo (técnica Elisa)⁴

GR	N.º	Media	Título	LR	N.º	Media	Título	MP	N.º	Media	Título	Valor de p
D0	14	2,8	7	D0	5	3,5	11	D0	7	2,6	6	0.4704
D1	16	5,4	42	D1	24	4,6	24	D1	7	6,0	64	0.3003
D2	26	7,3	158	D2	35	6,0	64	D2	13	5,5	45	0.0193
D3	7	6,7	104	D3	9	8,8	446	D3	1	8,6	388	0.2751
Obs.	63	P =	0,0000	Obs,	73	P =	0,0000	Obs,	28	P =	0,0038	

Los cachorros de este criadero son vendidos a partir de las 6 semanas de edad, cuando han recibido la primera vacuna viva atenuada frente a CDV y CPV2 y deberán continuar su programa de vacunación en su nueva residencia. Se sabe que las vacunas frente a LPT son reactogénicas y no siempre son usadas en las vacunaciones de rutina, a pesar de que las nuevas vacunas han eliminado de su composición los restos de proteínas empleado en el cultivo de las leptospiras reduciendo el riesgo de producir reacciones anafilácticas (Klaasen y col., 2003; Minke y col., 2009; Schreiber y col., 2005). Por otro lado, la leptospirosis es, actualmente, una enfermedad que se observa en baja proporción en los países desarrollados, y esto puede interpretarse, erróneamente, como ausencia de infección, sin tener en cuenta que las infecciones subclínicas pueden dar lugar al desarrollo de portadores renales (Adler, 2010; Andre-Fontaine et ál., 2003; Broughton y Scarnell, 1985; Klaasen, 2003; Schultz, 2000). A esto se debe añadir que los síntomas de la infección no son específicos y pueden confundirse con otras infecciones si no se realiza un diagnóstico en el laboratorio, de modo que se puede considerar un infección infradiagnosticada (Levett, 2004).

4 Acs: anticuerpos; D0: 6 semanas edad; D1. D2: momento de la primera y segunda vacunación frente a LPT; D3: 2 a 4 semanas tras la segunda vacunación; GR: Golden Retriever; LPT: *Leptospira* spp; LR: Labrador Retriever; MP: Perro de Montaña del Pirineo.

Las pautas de vacunación frente a leptospiras recomendadas para el perro indican que se debe comenzar la vacunación a los 3 meses de edad y administrar una segunda dosis entre 2 a 4 semanas más tarde. Posteriormente, se puede realizar la revacunación anual excepto en los casos de riesgo alto de infección que este programa puede ser intensificado (Paul y col., 2006), añadiendo una tercera dosis en los cachorros y revacunando en periodos inferiores a un año. Si los cachorros de este estudio finalizan el programa de vacunación tras dejar el criadero, probablemente estarán protegidos frente a la enfermedad, pero no es seguro que lo estén frente a la infección. Un hecho importante a recordar es que los perros pueden ser fuente de esta infección para las personas, y en consecuencia, los criaderos deberían recomendar que se finalice correctamente el programa vacunal una vez que los cachorros son adquiridos y que se mantenga la revacunación con la periodicidad adecuada según el riesgo y a lo largo de la vida (Adler, 2010; Andre-Fontaine et ál., 2003; Broughton & Scarnell, 1985; Klaasen, 2003; Schultz, 2000).

Conclusión

La vacunación anual de los adultos frente a LPT en este criadero es posible que no sea una garantía de la prevención frente al estado de portador renal, y los cachorros, que permanecen más tiempo en el criadero necesitarían hasta 3 vacunaciones (según el periodo de permanencia en el criadero), para conseguir mayor porcentaje de cachorros con respuesta inmune en Acs IgG superior a 1/100.

Es posible que la raza influya algo en la calidad de la respuesta en Acs IgG a la vacuna de LPT. Los cachorros Golden Retriever son los que han respondido mejor a la primera vacunación, aunque la administración del mínimo de 2 dosis ha conseguido mejorar la respuesta de todos los cachorros, de modo que los de raza Labrador Retriever han alcanzado la media de título más elevada.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento por el desinteresado envío del antígeno y sueros control para la realización de la técnica Elisa por parte del Dr. Kirk Douglas de la Unidad de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Utrecht (Holanda). Igualmente, agradecemos la inestimable colaboración del criadero canino “Torre de Justo”, de Huesca (España).

Referencias

- Adler, B; De la Peña Moctezuma, A. "Leptospira and leptospirosis". *Veterinary Microbiology* 140(3-4), (2010): 287-296.
- Andre-Fontaine, G; Branger, C.; Gray, A. W. ; Klaasen, H. L. B. M. "Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis". *Veterinary Record* 153 (2003): 165-169.
- Broughton, E. S. & Scarnell, J. "Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination". *Veterinary Record* 117 (1985): 307-311.
- Burr, P. "Serological testing—An alternative to boosters?". *Veterinary Microbiology* 117 (2006): 39-42.
- Day, M. J. "Immune System development in the dog and cat". *Journal of Comparative Pathology* 137, S1, (2007): S10-S15.
- Greeley, E. H.; Ballam, J. M.; Harrison, J. M.; Kealy, R. D.; Lawler, D. F.; Segre, M. "The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82, 1-2, (2001): 57-71.
- Greene, Cr. E. & Schultz R. D. "Immunoprophylaxis". In: Greene, Cr. E., Saunders Editor. *Infectious Diseases of the dog and cat*. 2006.
- Jiménez-Coello, M.; Vado-Solis, I.; Cárdenas-Marrufo, M. F.; Rodríguez-Buenfil, J. C.; Ortega-Pacheco, A. "Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan, Mexico, using two different tests". *Acta Tropica* 106, 1 (2008): 22-26.
- Kennedy, L. J.; Lunt, M.; Barnes, A.; McElhinney, L.; Fooks, A. R.; Baxter, D. N.; Ollier, W. E. R. "Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies". *Vaccine* 25 (2007): 8500-8507.
- Klaasen, H. L. B. M.; Molkenboer, M. J. C. H.; Vrijenhoek, M. P., Kaashoek, M. J. "Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine". *Veterinary Microbiology* 95 (2003): 121-132.
- Klaasen, H. L.; Molkenboer, M. J.; Vrijenhoek, M. O.; Kaashoek, M. J. "Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine". *Veterinary Microbiology* 95 (2003): 121-132.

Lawler, D. F. "Prevention and management of infection in kennels". In: Greene Cr. E., Saunders Editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2006.

Levett, P. N. "Leptospirosis: a forgotten zoonosis?" *Clinical and applied Immunology Reviews* 4 (2004): 435-448.

Levett, P. N. "Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis". *Clinical Infectious Diseases* 36 (2003): 447-452.

Minke, J. M.; Bey, R.; Tronel, J. P.; Latour, S.; Comlombet, G.; Yvarel, J.; Cariou, C.; Guiot, A. L.; Cozette, V.; Guigal, P. M. "Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine". *Veterinary Microbiology* 137 (2009): 137-145.

Naiman, B. M.; Alt, D.; Bolin, C. A.; Zuerner, R.; Baldwin, C. L.; "Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes". *Infection and Immunity* 69 (2001): 7550-7558.

Paul, M. A.; Carmichael, L. E.; Childers, H.; Cotter, S.; Davidson, A.; Ford, R.; Hurley, K. F.; Toth, J. A.; Schultz, R. D.; Thacker, E.; Welborn, L. "2006 Canine vaccination Guidelines". *American animal Hospital Association (AAHA) Canine Vaccine Task-Force* (2006): 80-89.

Prescott, J. F. "Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective". *Canadian Medical Association Journal* 178 (2008): 397-398.

Schreiber, P.; Martin, V.; Najbar, W.; Sanquer, A.; Gueguen, S.; Lebreux, B. "Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination". *Veterinary Microbiology* 108 (2005): 113-118.

Schultz, R. D. "Considerations in designing effective and safe vaccination programs for dogs". In: Carmichael, L. E. (Ed.) *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. International Veterinary Information Service (2000). <http://www.ivis.org/>.

Schultz, R. D.; Thiel, B.; Mukhtar, E.; Sharp, P.; Larson, L. J.; "Age and long-term protective immunity in dogs and cats". *Journal of Comparative Pathology* 142 (2010): S102-S108.

Sting, R.; Dura, U. "Isolation of serovar-specific Leptospiral Antigen for use in an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), compared with the Microscopic Agglutination Test and Immunofluorescence". *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*. 41 (1994): 166-175.

Tronel, J. P.; Bey, R. F.; Thevenon, J.; Minke, J.; Milford, F. "Efficacy of Leptodog[®] vaccine in dogs demonstrated by experimental challenges: evaluation at short term and duration of immunity". In: *Proceedings of the 24th World Small Animal Veterinary Congress*, Lyon, France, 1999.