

## SEROPREVALENCIA Y FACTORES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS E (GENOTIPO 3) EN PERROS DEL SUR DE ESPAÑA

B HUERTA<sup>1</sup>, C TARRADAS<sup>1</sup>, M GONZÁLEZ<sup>1</sup>, B PERALTA<sup>2</sup>, E. M. MATEU<sup>2</sup>, RJ ASTORGA<sup>1</sup>, A CARBONERO<sup>1</sup>, I LUQUE<sup>1,\*</sup>

### RESUMEN

En este trabajo se ha determinado la seroprevalencia de IgG frente al genotipo 3 del Virus de la Hepatitis E (VHE) en una muestra representativa de perros de una provincia del sur de España, y se han analizado los posibles factores de riesgo asociados a la seropositividad. Un total de 296 muestras de suero fueron analizadas mediante ELISA. Todas las muestras con una densidad óptica positiva, cerca del punto de corte, fueron confirmados por *Western Blot*. La seroprevalencia global fue del 15,5% (IC del 95%, 11,42-19,66%). El análisis de los diferentes factores relacionados con el animal y con el ambiente demuestran que existe una mayor seroprevalencia en perros machos (OR 2.07, P = 0,026), y una correlación entre la seropositividad y el aumento de la *edad* de los animales, así como *chequeos sanitarios* infrecuentes (P < 0,05). Estos resultados muestran claras similitudes con los obtenidos en la población humana. Todas las muestras seropositivas (n = 46) fueron sometidas a técnicas de RT-PCR, para la detección del genoma vírico en el suero, pero en todos los casos fue negativo. Por este motivo, consideramos que se requieren más estudios que aclaren el papel desempeñado por los perros como reservorios de VHE humano.

**Palabras clave:** *virus de la hepatitis E, factores de riesgo en perros.*

---

<sup>1</sup>Dpto. Sanidad Animal. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Campus de Excelencia Internacional CeIA3, 14071-Córdoba

<sup>2</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Edifici CReSA. Campus UAB. 08193-Bellaterra (Barcelona)

\*Inmaculada Luque Moreno, Correo electrónico [sallumoi@uco.es](mailto:sallumoi@uco.es).

## SUMMARY

The seroprevalence of IgG against genotype 3 of hepatitis E virus (HEV) in dogs in a province of Spain and the possible associated risk factors were determined. A total of 296 serum samples were analyzed by ELISA. All samples with a positive Optical Density, near to cut-off point, were confirmed by Western Blot. Overall seroprevalence was 15.5% (95% CI, 11.42-19.66%). Analysis of different animal- and management-related factors shown a higher seroprevalence in male dogs (OR 2.07,  $P = 0.026$ ) and a slight correlation between seropositivity and both *age* and infrequent *health checks* ( $P < 0.05$ ). These results show clear similarities to those described for humans. Seropositive samples ( $n = 46$ ) were tested for HEV-RNA using a semi-nested PCR, but the viral genome was not detected in any case, for this reason further studies are required to clarify the role played by animals as reservoirs for human HEV.

**Key Words:** *Hepatitis E virus, Risk factors in dogs*

## INTRODUCCIÓN

La hepatitis E es un tipo de hepatitis viral de transmisión entérica, producida por un Hepevirus (familia Hepeviridae) que afecta al hombre, siendo considerada una enfermedad emergente en países desarrollados (Balayan 1997, Farovov y col 1996, Ruiz-Moreno y col 2000; Buti y col 2006, López-Izquierdo y col 2007). Hasta hace relativamente pocos años, la enfermedad se había descrito solo de forma esporádica en personas que habían viajado a países infectados y en drogodependientes. No obstante, en los últimos años ha ido aumentando considerablemente la existencia de casos autóctonos, con tasas de seroprevalencia que han alcanzado en algunas zonas el 11% (Mateos y col 1998, Buti y col 2006, Galiana y col 2008, Krüttgen y col 2011), parece ser que el aumento progresivo de esta zoonosis está asociado directamente a fenómenos de globalización, tales como la proliferación del turismo a zonas afectadas y la elevada inmigración en todos los países desarrollados (López-Izquierdo y col, 2007). Por otro lado y desde el punto de vista etiológico cuando se estudia la secuencia genética del virus responsable de la infección se comprueba que existen cuatro genotipos (Mushahwar 2008, Okamoto 2007, Zhang y col 2008). Los genotipos 1 y 2 responsables de la infección en el hombre en países de climas tropicales, con pobres condiciones sanitarias, y los genotipos 3 y 4 aislados de cerdos y aves, responsables también de casos esporádicos de hepatitis E en el hombre pero siempre en países desarrollados (Meng 2010).

Una de las cuestiones que aún quedan por responder, a pesar del número de trabajos publicados, es cuál es el principal reservorio y fuente de infección para el hombre. En países tropicales y subtropicales, un importante reservorio lo constituyen las aguas residuales, de donde se han realizado aislamientos genéticamente similares al virus de la hepatitis en el hombre (Pina y col 2000). Los estudios realizados para

valorar el posible papel de los animales como reservorio biológico, han permitido poner en evidencia la presencia de anticuerpos en un número elevado de especies animales, como cerdos, roedores, terneros, cabras, gatos, ciervos, caballos, palomas, perros y aves (Kuno y col 2003, de Deus y col 2008, Peralta y col 2008, Zhang y col 2008). No obstante, hasta la fecha, el virus sólo se ha aislado a partir de aves y cerdos, tanto domésticos como silvestres, en distintos estadios de producción (Meng, 2010; Mushahwar, 2008; Zhang et al., 2008). A pesar de todos los estudios realizados, no se ha podido demostrar el verdadero papel de los animales domésticos en la transmisión y contagio del virus de la Hepatitis E al hombre, si bien algunos investigadores han puesto de manifiesto que las personas en contacto con animales tienen un riesgo mayor de padecer la infección (Galiana y col 2008, Kuniholm y col 2009, Meng 2010) y por lo tanto se puede sospechar que los animales domésticos pueden jugar un papel fundamental en el ciclo epidemiológico de esta enfermedad.

El principal objetivo de este trabajo es intentar definir el papel de los perros en el ciclo epidemiológico de esta zoonosis emergente. Para ello, se ha determinado la prevalencia de anticuerpos específicos frente al virus de la hepatitis E en la población canina de una provincia del sur de España y los posibles factores de riesgo asociados a la seropositividad de esta especie. También se realizaron pruebas genéticas para detectar la presencia del virus en el suero.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Población en estudio*

Para definir la población en estudio se utilizaron los datos del Registro Andaluz de Identificación de Animales (RAIA), con una población estimada de 100308 perros. La recogida de muestras se ha realizado siguiendo la distribución en cuatro distritos sanitarios, estratificando la población de referencia según su procedencia (Figura 1). El tamaño de la muestra ( $n = 296$  animales, fracción de muestreo  $< 0,05$ ) fue calculada para una prevalencia esperada del 24 por ciento (Peralta y col 2006), un error del 5 por ciento y un nivel de confianza del 95 por ciento, utilizando el programa informático de epidemiología veterinaria *WinEpiScope* 2.0. (Ignacio de Blas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 2006).

Durante un periodo de seis meses (enero a junio), los veterinarios responsables de las clínicas participantes obtuvieron las muestras de suero de animales que asistían a consulta veterinaria, siendo congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Al mismo tiempo, rellenaron un cuestionario epidemiológico completo, en el que se recogieron datos

específicos y antecedentes epidemiológicos de los individuos analizados, con el objetivo de comparar grupos seropositivos y seronegativos e identificar los posibles factores de riesgo asociados a la infección con el virus HEP. Se recogieron las siguientes variables: *sexo*, *edad*, *hábitat* urbano / rural, *convivencia* con otros animales (perros, gatos, cerdos, rumiantes, aves, équidos y especies exóticas), *alimentación* (piensos comerciales exclusivamente o alimentación combinada con comida casera) y *chequeos sanitarios* a los que eran sometidos los animales al año.

### *Estudio serológico*

Los sueros para la detección de anticuerpos anti-HEV fueron analizados mediante una técnica ELISA (Arankalle y col 2001, Vitral y col 2005, Peralta y col 2009), sobre placas de 96 pocillos (Nunc, Ref. 269620) antigenadas con la ORF2 de la cepa paquistaní SAR55, diluida en 50 mM tampón carbonato-bicarbonato a pH 9.6; utilizando como conjugado anticuerpos policlonales de cabra IgG (H+L) anti-perro (Cultek, S.L) y realizando la lectura a 450 nm (Seminati y col 2007). Aquellas muestras con una densidad óptica cercana al punto de corte (0,300) fueron sometidas a una técnica de *Western Blot*, siguiendo metodologías descritas previamente (Peralta y col 2009).

### *Técnicas de PCR*

Todas las muestras de suero positivas fueron analizadas mediante técnicas de RT-PCR, tras la extracción del ARN a partir de una muestra de 100  $\mu$ l suero con Tri-Zol (Invitrogen, SA). Los *primers* específicos utilizados para la prueba fueron F4340: 5'-CTDTTYGGCCNTGGTTCCG-3' y R4690: 5'-CCATRTTCCARACDGTRTTC-3' para la primera amplificación y para la amplificación *semi-nested* se utilizaron los *primers* F4340: 5'-CTDTTYGGCCNTGGTTCCG-3' y R4670: 5'-CANARNAGGGT-GCCVGGCTC-3' (Peralta y col 2006). Los productos esperados de la amplificación tenían un tamaño de 350 y 330 para la primera y segunda amplificación, respectivamente. En cada prueba se utilizó una muestra de un cerdo positivo al genotipo 3 del virus como control positivo y como control negativo se utilizaron muestras de agua.

### *Análisis estadístico*

Se calculó la seroprevalencia de la enfermedad y sus intervalos de confianza (95% CIs). Para realizar el análisis estadístico, la variable *edad* fue categorizada en cuartiles

(Tabla 1). La asociación entre las variables categóricas y la respuesta inmune frente a la infección fue determinada mediante el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o el test de Fisher. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. El grado de la asociación fue establecido mediante el cálculo de la Odds Ratio (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza (95% CI) para variables nominales, y mediante el coeficiente Kendall's tau-c para variables ordinales. Los cálculos estadísticos se han realizado utilizando el programa SPSS v.15 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta ampliamente demostrado que la Hepatitis E es una zoonosis emergente y que la especie porcina actúa como reservorio y fuente de infección para el hombre (Baechlein y col 2010), sin embargo algunos investigadores afirman que los animales de compañía también pueden intervenir en el contagio al hombre (Peralta y col 2006, 2009). No obstante, hasta la fecha no se ha demostrado el verdadero papel de estos animales en el ciclo epidemiológico de la enfermedad ni los factores de riesgo asociados. En este trabajo nos propusimos realizar una encuesta epidemiológica sobre una muestra representativa de la población canina de la provincia de Cádiz, situada al sur de España, con un clima mediterráneo oceánico de la costa atlántica. Esta provincia está dividida en cuatro distritos sanitarios (Figura 1), divisiones que se establecen oficialmente para la organización de la atención primaria en el ámbito de la salud pública en España.

Se han analizado un total de 296 sueros caninos, mediante técnicas de ELISA, obteniendo unos valores de seroprevalencia de Hepatitis E (HEV) del 15,5% (95% CI: 11,38-19,62%) (tabla 1), resultados ligeramente inferiores a los obtenidos en Barcelona, situada en la zona noreste de España, con un clima típico mediterráneo (Peralta y col 2006). En estudios epidemiológicos realizados en poblaciones humanas de nuestro país se han obtenido valores de seroprevalencia del 11,6%, tasas muy similares a las encontradas en la población canina encuestada en nuestro estudio (Galiana y col 2008). En otros países con climas tropicales y subtropicales como India, Vietnam y Brasil, se han obtenido valores de prevalencia que oscilan entre el 7 y el 27% (Tien y col 1997, Arankalle y col 2001, Vitral y col 2005).

Se han intentado establecer los posibles factores de riesgo asociados a la seropositividad. En primer lugar se determinó la relación con el *distrito sanitario*; no obstante, aunque existían zonas con niveles de seroprevalencia más elevada, como la obtenida en el Distrito Bahía de Cádiz (21,6%), las diferencias no han sido significativas ( $P =$

0,1255) (Tabla 1). En relación con el *sexo*, de los 296 perros incluidos en el estudio, 142 eran machos y 154 hembras, observando una asociación significativa ( $P = 0,026$ ) entre la seropositividad y el *sexo* macho (20,4% machos positivos vs. 11% hembras positivas), con valor de OR de 2,07 (95% CI: 1,08-3,95), es decir es dos veces más probable que un macho sea seropositivo a que lo sea una hembra. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la población humana, donde las diferencias son mucho más evidentes, de forma que el riesgo de infección es doce veces mayor en el hombre que en la mujer (Galiana y col 2008, Kuniholm y col 2009).

Otra de las variables estudiadas fue la *edad*, se analizaron animales que oscilaban entre los 4 meses y los 15 años, que se agruparon en cuartiles para el estudio estadístico (Tabla 1). Se ha observado un incremento de prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis E a medida aumenta la edad del animal (Kendall's-tau  $c = 0,062$   $P = 0,04$ ). Algunos investigadores aseguran que la seropositividad frente al virus de la hepatitis E en diferentes especies, como aves, cerdos y humanos, depende en gran medida de la edad del individuo, ya que generalmente se obtienen siempre prevalencias más altas en grupos de animales adultos que en individuos jóvenes (Meng y col 1999, Huang y col 2002, Buti y col 2006), resultados que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio.

En relación con las condiciones medioambientales, la mayoría de los animales procedían de áreas urbanas (Tabla 1), sin embargo la seroprevalencia encontrada fue muy similar a la obtenida en perros que vivían en áreas rurales (16,8% vs. 12,8%,  $P = 0,421$ ). Estos resultados difieren de los obtenidos en estudios realizados sobre la población humana, donde la seroprevalencia ha sido mayor en zonas urbanas (Pina y col 2000, Buti y col 2006). No hemos encontrado asociación entre la seropositividad y otras variables como la *convivencia* con animales, incluyendo perros, gatos, suidos, rumiantes, aves, équidos y otras especies exóticas ( $P > 0,05$ ) y la *alimentación*.

Uno de los indicadores más importantes para definir el nivel habitual de cuidados y medidas preventivas de los dueños sobre sus mascotas es la frecuencia de *chequeos sanitarios*, los resultados de nuestra encuesta epidemiológica demuestran que más del 80% de los perros visitaban al veterinario al menos una vez al año y como se refleja en la tabla 1 la prevalencia de anticuerpos anti-HEV era mayor entre los animales sometidos a escaso control sanitario ( $P = 0,027$ ). Por último, en la encuesta epidemiológica realizada se determinó la presencia de sintomatología derivada de una alteración hepática, que pudiera relacionarse con la infección por HEV. De los 46 animales seropositivos, dieciocho (6,08%) mostraron síntomas compatibles con una alteración hepática (vómitos, diarrea) y tres dolor abdominal, pero sólo un animal presentó aumento de las enzimas hepáticas.

Según los resultados obtenidos, podemos afirmar que los perros machos presentan el doble de probabilidad ( $P = 0.026$ ) de poseer anticuerpos IgG frente al virus de la Hepatitis E, también se ha encontrado una correlación entre la seroprevalencia y otros factores como la *edad* y los *chequeos* sanitarios infrecuentes ( $P < 0.05$ ), estos factores también han estado asociados a la infección en algunas poblaciones humanas (Mushahwar 2008, Kunihlom y col 2009), por lo tanto se puede sugerir que existe una gran similitud entre los factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos anti-Hepatitis E en el hombre y en el perro.

Por último, para demostrar que el perro puede actuar como reservorio de la infección para el hombre, resulta imprescindible poner en evidencia el virus. Todas las muestras serológicamente positivas fueron analizadas genéticamente mediante RT-PCR para detectar la presencia del ARN-HEV, siendo los 46 animales a negativos a las técnicas moleculares, resultados similares a los obtenidos anteriormente por Liu y col (2009) y Galiana y col (2008) en perros y humanos respectivamente. Ahora nos tendríamos que plantear la siguiente cuestión ¿Por qué presentan algunos animales anticuerpos IgG frente al virus de la hepatitis E y no se detecta ninguna partícula vírica en su suero? En primer lugar estos resultados pueden ser debidos a que el virus permanezca durante un tiempo limitado en sangre y sea eliminado del organismo (Billam y col 2005, de Deus y col 2008), o bien que tenga un fuerte tropismo por algunos órganos parenquimatosos, como el hígado, donde queda acantonado dando lugar o no a manifestaciones clínicas. Independientemente de la causa, los resultados obtenidos justifican sin duda la necesidad de continuar los estudios sobre la patogenia y la epidemiología de esta infección en la especie canina, para esclarecer su posible papel como reservorio del virus.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Cádiz (España). Los autores quieren agradecer a todos los responsables de las clínicas veterinarias de Cádiz y a Federico Vilaplana presidente del Colegio de Veterinarios de dicha provincia, su estrecha colaboración y disposición para la recogida y envío de muestras, material imprescindible para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

Arankalle VA, MV Joshi, AM Kulkarni, SS Gandhe, LP Chobe, SS Rautmare, AC Mishra, VS Padbidri. 2001. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 8, 223-227.

- Baechlein C, A Schielke, R Johne, RG Ulrich, W Baumgaertner, B Grummer. 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* 144, 187-191
- Billam P, FF Huang, ZF Sun, FW Pierson, RB Duncan, F Elvinger, DK Guenette, TE Toth, XJ Meng. 2005. Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J Virol* 79, 3429-3437.
- Buti M, A Domínguez, P Plans, T Jardí, M Sxhaper, J Espuñes, N Cardeñosa, F Rodríguez-Frías, R Esteban, A Plasència, L Salleras. 2006. Community-Based Seroepidemiological Survey of Hepatitis E Virus Infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* 13, 1328-1332.
- de Deus N, M Casas, B Peralta, M Nofrarías, S Pina, M Martín, J Segalés. 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 132, 19-28.
- Galiana C, S Fernández-Barredo, A García, MT Gómez, M Pérez-Gracia. 2008. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 78, 1012-1015.
- Huang FF, G Haqshenas, HL Shivaprasad, DK Guenette, PR Woolcok, CT Larsen, FW Pierson, F Elvinger, TE Toth, XJ Meng. 2002. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J ClinMicrobiol* 40, 4197-4202.
- Krüttgen A, S Scheithauer, M Häusler, M Kleines. 2011. First report of an autochthonous hepatitis E virus genotype 3 infection in a 5 month old female child in Germany. *J Clin Virol* 50. 175-176
- Kunihlöm MH, RH Purcell, GM Mcquillan, RE Engle, A Wasley, KE Nelson. 2009. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *J Infect Dis* 200, 48-56.
- Liu J, W Zhang, Q Shen, S Yang, F Huang, P Li, X Guo, Z Yang, L Cui, J Zhu, X Hua. 2009. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among pet dogs in the Jiang-Zhe area of China. *Scandinavian J Infect Dis* 41, 291-295.
- Meng XJ, S Dea, RE Engle, R Friendship, YS Lyoo, T Sirinarumitr, K Urairong, D Wang, D Wong, D Yoo, Y Zhang, RH Purcell, SU Emerson SU. 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 59, 297-302.
- Meng XJ. 2010. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 140, 256-65.
- Mushahwar IK. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80, 646-658.
- Peralta B, M Martín, E Mateu. 2006. Detección de IgG e IgM contra el virus de la Hepatitis E en la población canina de Barcelona. *Avedila* 36, 2-6.
- Peralta B, M Casas, N de Deus, M Martín, A Ortuño, E Pérez-Martín, S Pina, E Mateu. 2009. Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol* 137, 66-73.
- Pina S, M Buti, M Cotrina, J Piella, R Girones. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 33, 826-833.
- Tien NT, HT Clayson, HB Khiem, PK Sac, AL Corwin, KS Myint, DW Vaught. 1997. Detection of immunoglobulin G to hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 57, 211.
- Vital CL, MA Pinto, LL Lewis-Ximenez, YE Khudyakov, DR do Santos, AM Gaspar AM. 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 117-122.
- Zhang W, Q Shen, J Mou, G Gong, Z Yang, L Cui, J Zhu, G Ju, X Hua. 2008. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health* 55, 291-298.

**Tabla 1. Factores de riesgo para la población canina estudiada, agrupada según la presencia o ausencia de IgG anti-HEV.**

|                                          | Seropositivos<br>n° (%) | Seronegativos<br>n° (%) | Análisis<br>estadístico       | OR<br>95% CI    |
|------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------|
| <b>Distrito Sanitario</b>                |                         |                         |                               |                 |
| Bahía de Cádiz-La Janda (n = 125)        | 27 (21,6%)              | 98 (78,4%)              | $p = 0,1255$                  |                 |
| Jerez- Campiña (n = 62)                  | 7 (11,3%)               | 55 (88,7%)              |                               |                 |
| Campo de Gibraltar (n = 65)              | 8 (12,3%)               | 57 (87,7%)              |                               |                 |
| Sierra de Cádiz (n = 44)                 | 4 (11,3%)               | 40 (88,7%)              |                               |                 |
| <b>Total</b> (n=296)                     | 46 (15,5%)              | 250 (84,5%)             |                               | 11,42-<br>19,66 |
| <b>Sexo</b>                              |                         |                         |                               |                 |
| Macho (n = 142)                          | 29 (20,4%)              | 113 (79,6%)             | $p = 0,026$                   | 2,07            |
| Hembra (n = 154)                         | 17 (11%)                | 137 (89%)               |                               | 1,08-3,95       |
| <b>Edad</b>                              |                         |                         |                               |                 |
| 10 meses (n = 31)                        | 4 (12,9%)               | 27 (87,1%)              | Kendall's<br>tau-c =<br>0,062 |                 |
| 11 a 48 meses (n = 120)                  | 15 (13,0%)              | 105 (87,0%)             |                               |                 |
| 49 a 84 meses (n = 72)                   | 14 (19,4%)              | 58 (80,6%)              |                               |                 |
| 85 meses (n = 70)                        | 13 (18,5%)              | 57 (81,5%)              | $p = 0,04$                    |                 |
| Sin respuesta                            |                         | 3                       |                               |                 |
| <b>Habitat</b>                           |                         |                         |                               |                 |
| Urbano (n = 219)                         | 37 (16,8%)              | 182 (83,2%)             | $p = 0,421$                   |                 |
| Rural (n = 70)                           | 9 (12,8%)               | 61 (87,2%)              |                               |                 |
| Sin respuesta                            |                         | 7                       |                               |                 |
| <b>Convivencia con otros perros</b>      |                         |                         |                               |                 |
| Si (n = 185)                             | 28 (15,1%)              | 157 (84,9%)             | $p = 0,603$                   |                 |
| No (n = 103)                             | 18 (17,4%)              | 85 (82,6%)              |                               |                 |
| Sin respuesta                            |                         | 8                       |                               |                 |
| <b>Convivencia con otros animales</b>    |                         |                         |                               |                 |
| Si (n = 77)                              | 10 (12,9%)              | 67 (87,1%)              | $p = 0,37$                    |                 |
| No (n = 207)                             | 36 (17,3%)              | 171 (82,7%)             |                               |                 |
| No response                              |                         | 12                      |                               |                 |
| <b>Alimentación</b>                      |                         |                         |                               |                 |
| Pienso comercial (n = 191)               | 30 (15,7%)              | 161 (84,3%)             | $p = 0,86$                    |                 |
| Mixta* (n = 97)                          | 16 (16,5%)              | 81 (83,5%)              |                               |                 |
| Sin respuesta                            |                         | 8                       |                               |                 |
| <b>Frecuencia de chequeos sanitarios</b> |                         |                         |                               |                 |

|                    |           |            |             |                      |
|--------------------|-----------|------------|-------------|----------------------|
| Una vez al año     | (n = 236) | 41 (17,3%) | 195 (82,7%) | Kendall's<br>tau-c = |
| Dos veces al año   | (n = 17)  | 2 (11,7%)  | 15 (88,3%)  | - 0,027              |
| ≥Tres veces al año | (n = 18)  | 2 (11,1%)  | 16 (88,9%)  | p = 0,027            |
| Sin respuesta      |           | 25         |             |                      |

\*Régimen de alimentación mixta de pienso comercial con comida hecha en casa.

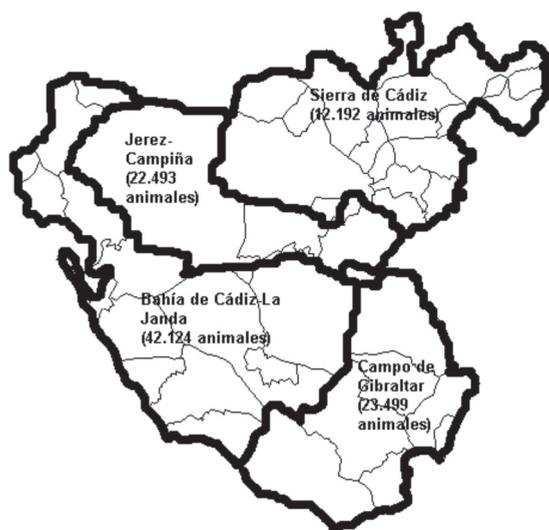


Figura 1. Número de perros censados en cada distrito sanitario de Cádiz (RAIA)