



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



SEROPREVALENCIA DE NUEVE SEROVARES DE *Leptospira interrogans* EN CARNÍVOROS, UNGULADOS Y PRIMATES SILVESTRES EN CAUTIVERIO

**EDUARDO ALEJANDRO MORENO BEAS**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE

2012



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## SEROPREVALENCIA DE NUEVE SEROVARES DE *Leptospira interrogans* EN CARNÍVOROS, UNGULADOS Y PRIMATES SILVESTRES EN CAUTIVERIO

### EDUARDO ALEJANDRO MORENO BEAS

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO ÁBALOS PINEDA	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: PATRICIO RETAMAL MERINO	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: PEDRO CATTAN AYALA	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2012

## **Agradecimientos y dedicatoria**

Han pasado muchas cosas en mi vida durante estos años de universidad, y cada uno de ellos aportó para que yo estuviera aquí en el último proceso antes de ser Médico Veterinario. Así mismo, muchas personas han aportado ya sea un granito de arena o una roca a este proceso, y es hora de agradecerles de alguna forma. Sé que muchos se me pasarán, pero eso no quiere decir que no esté agradecido con ellos.

En primer lugar, debo agradecer a mi familia, a mis padres y hermanos, quienes siempre han confiado en mí, en mis capacidades, y en que podré superar los obstáculos que se me ponen por delante cada día.

Obviamente, no puedo dejar de mencionar a mi polola, Alejandra, con quien hace cinco años que estamos mirando hacia adelante, con proyectos para los cuales debemos poner lo mejor de nosotros para que resulten. Durante estos cinco años haz sido mi compañera, no sólo en la universidad, sino en la vida, gracias por todo y sigamos adelante. Te amo.

Debo agradecer a Ezequiel, quien confió en mí para realizar este proyecto, el cual seguirá adelante, y con quien espero seguir trabajando en un futuro. Muchas gracias por creer en mí.

Al Doctor Ábalos, quien aceptó trabajar conmigo en la memoria de título, por su apoyo en ella, y guiarme por todo este proceso. Lo mismo para el Doctor Retamal, quien también me ha ayudado en este proyecto.

A la Doctora Ávalos, por permitirme realizar mi memoria de título en el SAG, por la buena disposición y apoyo.

A María Cristina, por todo el tiempo y entrega, por las conversaciones y la buena onda, te deseo lo mejor. A Alexza, pese a que no pudimos trabajar juntos al final, siempre me apoyaste.

A mis compañeros, "la generación cobayo", con quienes hemos tenido que pasar por mil y un cambio, arreglos, falencias, pero que aun así, hemos seguido adelante hasta llegar a la titulación.

Al doctor Barrios, a Pablillo, a la Doctora Pilar y al Doctor Celis, por el apoyo y los conocimientos durante mis días en el zoológico.

A todos mis amigos y no amigos que de alguna u otra forma han estado a mi lado durante esta etapa.

Muchas gracias a todos.

Eduardo Alejandro Moreno Beas

## **MEMORIA DE TÍTULO**

**“SEROPREVALENCIA DE NUEVE SEROVARES DE *Leptospira interrogans* EN CARNÍVOROS, UNGULADOS Y PRIMATES SILVESTRES EN CAUTIVERIO”.**

**“SEROPREVALENCE OF NINE SEROVARS OF *Leptospira interrogans* IN WILD CARNIVORES, UNGULATES AND PRIMATES MAINTAINED IN CAPTIVITY”.**

**Eduardo Alejandro Moreno Beas**

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

### **Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Conservación e Investigación del Parque Zoológico Buin Zoo (CIBZ).

## Resumen

Se recolectaron 130 muestras de suero desde 236 animales de los Órdenes Carnivora, Ungulata y Primates mantenidos en cautiverio en el Parque Zoológico Buin Zoo, y se determinó la presencia de anticuerpos para 9 serovares de *Leptospira interrogans* usando la Prueba de Microaglutinación (MAT). Trece (10%) de los sueros fueron reaccionantes a uno o más de los serovares. No existió diferencia significativa entre sexos donde 8,6% y 11,7% de las hembras y los machos respectivamente, fueron positivos. La edad tampoco resultó ser determinante, pese a que el 84,6% de los seropositivos son >36 meses. La ubicación dentro del zoológico no tiene relación significativa con los seropositivos, pese a que del total de seroreactivos, un 53,8% pertenecieron al sector C. Sin embargo, la seroprevalencia fue significativamente alta ( $p<0.05$ ) en Ungulados (20,4%) en comparación a Carnívoros (3,8%) y Primates (3,4%). De los siete serovares detectados en este estudio, el más frecuente fue Autumnalis, presente en el 53,4% de los seropositivos. La mayoría de los animales reaccionantes presentaron títulos  $\leq 1:200$ , a excepción de un *Chrysocyon brachyurus* que presentó una titulación de 1:400 frente al serovar Hardjo. En conclusión, la población ha estado expuesta a *L. interrogans*, pero presentando una baja seroprevalencia.

Palabras claves: *Leptospira interrogans*, seroprevalencia, animales de zoológico.

## Abstract

A total of 130 serum samples were collected from 236 animals belonging to the Orders Carnivora, Ungulata and Primate at the Buin Zoo Park. Seroprevalence to nine serovars of *Leptospira interrogans* (9 serovars) was determined using the Microscopic Agglutination Test (MAT). Thirteen (10%) of sera were positive to one or more serovars. There was not significant difference between the sexes: 8.6% and 11.7% of females and males respectively, were positive. The age also proved not to be decisive, although the 84.6% of seropositives are >36 months. The location within the zoo has no significant relationship with seropositive, although 53.8% of the total serological reagents, belonged to the sector C. The seroprevalence was significantly higher ( $p<0.05$ ) in ungulates (20.4%) compared to carnivores (3.8%) and primates (3.4%). The most frequent of the seven serovars detected in this study was Autumnalis, present in 53.4% of seropositives. Most animals reactants had titers  $\leq 1:200$ , except for a *Chrysocyon brachyurus* with titers 1:400 against serovar Hardjo. In conclusion, the population has been exposed to *L. interrogans*, but presents a low seroprevalence.

Keywords: *Leptospira interrogans*, seroprevalence, zoo animals.

## Introducción

El manejo sanitario de animales silvestres en cautiverio se basa en la medicina preventiva, que incluye la identificación y control de agentes infecciosos para los cuales pueden servir de hospedero o reservorio. En muchos casos, son capaces de transmitir estos agentes a otros animales o a humanos, representando en este último caso un riesgo potencial de salud pública. Un patógeno con estas características es *Leptospira interrogans*, que puede causar la leptospirosis en diversas especies de mamíferos.

Potencialmente todas las especies de mamíferos, incluyendo a especies acuáticas, pueden ser consideradas como susceptibles a la infección aguda (como hospedero incidental y presentando signología de la enfermedad) y/o crónica (como hospedero de mantención y sin signos clínicos) por *L. interrogans*, demostrando ser portadores de la bacteria, la cual se encuentra en todo el mundo exceptuado la Antártica. El tipo de infección dependerá del endemismo del serovar actuante en la especie animal involucrada (Adler y de la Peña, 2010; Hernández *et al.*, 2010).

Los animales, incluyendo a los seres humanos, se pueden dividir en hospederos de mantención e incidentales. Un hospedero de mantención o reservorio se define como una especie en cuya población la infección es endémica y es generalmente transferida de un animal a otro por contacto directo, adquiriendo generalmente la infección a una edad temprana, y aumentando la prevalencia de excreción crónica en la orina con la edad del animal. Los reservorios de *L. interrogans* más importantes en la naturaleza son los pequeños mamíferos silvestres (Richardson y Gauthier, 2003), que pueden propagar la infección a los animales de granja, mascotas y seres humanos (Levett, 2001). Estudios serológicos han implicado a los diferentes órdenes sinantrópicos y silvestres de *Didelphimorphia* y *Rodentia*, como diseminadores potenciales de los diferentes serovares de *leptospira* (Esteves *et al.*, 2005), siendo considerados los roedores como los diseminadores más relevantes (Adler y de la Peña, 2010). Los demás animales y humanos se pueden infectar por contacto indirecto con el hospedero de mantención. Los animales pueden ser reservorio de algunos serotipos, pero de otros son hospederos incidentales pudiendo cursar la enfermedad grave o mortal. La infección se transmite dependiendo de muchos factores, incluyendo el clima, la densidad poblacional y el grado de contacto entre el reservorio y el hospedero accidental (Levett, 2001).

La leptospirosis en humanos es adquirida desde una fuente animal (Adler y de la Peña, 2010), siendo facilitada su transmisión por la infección crónica de animales, manteniéndose la bacteria

en los túbulos renales del reservorio sin generar signos clínicos evidentes, liberándose al medio ambiente por medio de la orina (Monahan *et al.*, 2009). Estas bacterias no sobreviven bien en orina ácida, pero se mantienen viables en orina alcalina, es por esto que los herbívoros y los animales cuya dieta produce este tipo de orina son relativamente más importantes como diseminadores (Adler y de la Peña, 2010). La *Leptospira* puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo bajo diferentes condiciones ambientales, incluyendo el suelo y el agua, aumentando así la probabilidad de infectar a un hospedero susceptible. Esto facilita la transmisión indirecta del agente desde animales a humanos (Monahan *et al.*, 2009). Actualmente se le considera una enfermedad re-emergente en humanos que ha causado brotes epidémicos alrededor del mundo (Moreno y Agudelo, 2010; Roberts *et al.*, 2010), traducándose como un agente de importancia para la salud pública. Los humanos con riesgo de infección son principalmente personas que realizan actividades tanto ocupacionales como recreativas en las cuales tienen contacto directo con la orina de animales infectados y/o con el suelo o aguas contaminadas (Adler y de la Peña, 2010).

Los animales silvestres, son susceptibles a la infección con una gran variedad de serovares de *Leptospira* sirviendo de hospederos incidentales. En la literatura, se han descrito en diversos lugares del mundo la seropositividad a distintos serovares de *L. interrogans* en animales silvestres de vida libre, reportándose en menor medida en animales en cautividad (Lilenbaum *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2005). Los de vida libre, según los reportes, suelen ser positivos a serotipos comunes a su área nativa, pero en situación de cautividad, animales de distinto origen ecológico y de contextos epidemiológicos diferentes son forzados a vivir cerca unos de otros, facilitando la exposición e infección por otros serovares de *L. interrogans*. Además, esta condición aumenta las posibilidades de contacto con roedores, mapaches, zarigüeyas y otros animales de vida libre, lo que puede crear oportunidades para la propagación y exposición a éste y a otros agentes infecciosos (Lilenbaum *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2007). Algunos estudios han reportado la enfermedad, la infección fetal y la seropositividad frente a *Leptospira* en animales de zoológico (Jung *et al.*, 2007). Es por esto que los parques de este tipo potencialmente pueden ser fuentes de la leptospirosis humana (Jung *et al.*, 2007), pudiendo afectar a personas que se relacionan a diario con animales en zoológicos, como son médicos veterinarios, cuidadores y visitantes. Anderson *et al.* (1978) describen casos clínicos de leptospirosis en dos cuidadores de animales de un zoológico de Estados Unidos de América, causados por los serovares Copenhageni y Mankarso, tras pasados por el contacto con un oso polar (*Ursus maritimus*) y dos osos negros asiáticos (*Ursus thibetanus*) seropositivos a estos serovares.

En una revisión de 11 estudios entre 1975 y 2007, se observa que de 131 mamíferos mantenidos en zoológicos, un total de 129 individuos fueron reportados como seropositivos a la bacteria, siendo los serovares *Icterohaemorrhagiae* (26,4%), *Pomona* (15,5%), *Canicola* (13,9%) y *Grippotiphosa* (10,8%) los mayormente identificados (Nall y Maetz, 1975; Douglass, 1979; Rapley *et al.*, 1981; Jessup *et al.*, 1992; Murnane *et al.*, 1994; Luna *et al.*, 1996; Gamble y Alvarado, 2000; Juan *et al.*, 2001; Lilenbaum *et al.*, 2004; Esteves *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007).

La leptospirosis en los animales implica el estado de enfermedad causado por la bacteria, con presentación de signos clínicos pudiendo llevar hasta a la muerte del animal. Esto se debe a que las leptospiras se multiplican y propagan vía hematogena localizándose en hígado, riñón y útero. En la forma aguda de la enfermedad, especialmente por serotipos que pueden producir hemolisina, se presenta anemia hemolítica e ictericia, siendo manifestaciones graves de la infección. Las lesiones hepáticas agudas se localizan dentro de los hepatocitos pudiendo causar elevación de enzimas hepáticas e hiperbilirrubinemia. Después de la fase hepática, las bacterias se localizan en el riñón causando tubulonefritis. También se pueden localizar en los pulmones, el corazón y el cerebro con la inflamación posterior de éstos. Los tejidos infectados crónicamente, con frecuencia, están infiltrados por linfocitos, células plasmáticas y tejido conectivo fibroso. Las infecciones subclínicas de los adultos pueden resultar en abortos o pérdidas neonatales teniendo un impacto significativo en los programas de reproducción (McNamara *et al.*, 1997) y planes de conservación de la especie afectada (McNamara *et al.*, 1997; Neiffer *et al.*, 2001).

Pese a que la presencia de *L. interrogans* en fauna silvestre ha sido registrada a través de los años, la documentación de la signología de leptospirosis es rara (Hernández *et al.*, 2010). De nueve reportes realizados entre 1979 y el 2004 de animales con leptospirosis en cautiverio (Douglass, 1979; Rapley *et al.*, 1981; Perolat *et al.*, 1992; Murnane *et al.*, 1994; McNamara *et al.*, 1997; Gamble y Alvarado, 2000; Juan *et al.*, 2001; Neiffer *et al.*, 2001; Lilenbaum *et al.*, 2004), destaca que de 44 casos clínicos 29 (65,9%) terminaron con la muerte de los ejemplares. Los casos clínicos correspondieron a 5 carnívoros, 14 ungulados y 20 primates. De los 44 casos clínicos, 20,5% fue causado por *Pomona*, 20,5% por *Grippotiphosa*, 15,9% por *Icterohaemorrhagiae*, 9,1% por *Copenhageni*, 2,3% por *Bratislava* y un 2,3% por *Autumnalis*.

En el zoológico de Dallas, Estados Unidos, se reportaron casos de leptospirosis en un mono titi de vientre rojo (*Callicebus moloch*), un mono araña de manos negras (*Ateles geoffroyi*), dos gibones de mejillas blancas (*Hylobates concolor concolor*) y un borrego cimarrón (*Ovis*



*canadensis mexicana*), junto con la seropositividad a la bacteria en un rinoceronte negro (*Diceros bicornis minor*), relacionados a la construcción de un nuevo recinto exhibidor para los tigres de Sumatra (*Panthera tigris sumatrae*). Esta construcción alteró el hábitat de ardillas de vida libre, llevando a un cambio en sus conductas y rutas habituales aumentando el contacto entre éstas con los animales del zoológico, interacción que permitió la transmisión de *L. interrogans* hacia los animales anteriormente nombrados (Gamble y Alvarado, 2000). Esto demuestra la importancia de los animales silvestres libres existentes dentro de los zoológicos como diseminadores del agente.

Como ocurre con muchas otras enfermedades, el diagnóstico de leptospirosis en animales de zoológico presenta una serie de desafíos. Aunque las pruebas serológicas son el método de preferencia para el diagnóstico, la renuencia a inmovilizar a los animales para la extracción repetida de muestras de sangre a intervalos fijos de tiempo, hace difícil la obtención de muestras pareadas para demostrar el aumento en los títulos de anticuerpos. A esto se suma que los animales de zoológico pueden morir sin antecedentes clínicos y con la ausencia de muestras de sangre correspondientes a ese momento que ayuden a la identificación de la causa de la muerte. La vacunación de los animales en ausencia de la serología de referencia, puede complicar aún más la interpretación de los resultados serológicos. A falta de estos datos, el diagnóstico a menudo se debe basar en la evaluación histopatológica de los tejidos (McNamara *et al.*, 1997).

Ciertamente, todos los parques zoológicos deben tener estrictos programas de control de plagas, de protección en los comederos y bebederos para evitar la contaminación. Sin embargo, desde una visión realista de la situación, no importa la intensidad de los programas de control de roedores y de mamíferos salvajes que existan, es poco factible que la introducción de esta enfermedad se pueda prevenir. El problema es que, probablemente, está mucho más extendida de lo que actualmente se sospecha, porque, aunque los zoológicos pueden evitar la exposición accidental de los animales de la colección a los de vida libre, aún existe el riesgo de contraer la infección a partir de los animales que ya están dentro de las colecciones, ya que, por la falta de programas de vigilancia sanitaria, se desconoce su condición. Las preocupaciones sobre los riesgos durante la manipulación o las inmovilizaciones que son necesarias para realizar estos procedimientos, deben sopesarse frente al riesgo potencial de perder animales por la enfermedad (McNamara *et al.*, 1997).

La prueba de referencia o *gold standard* de diagnóstico serológico es la prueba de aglutinación microscópica o MAT (por las siglas del inglés *Microscopic Agglutination Test*), en la cual las

muestras de suero de los pacientes reaccionan con el antígeno vivo en suspensión de *Leptospira*, para determinar la presencia de anticuerpos específicos con la aglutinación (OIE, 2008). Tanto la sensibilidad como la especificidad de MAT son muy altas (Adler y de la Peña, 2010), pudiéndose mejorar la primera utilizando aislamientos locales en vez de cepas de referencia, pero éstas últimas ayudan en la interpretación de los resultados entre los laboratorios (OIE, 2008). Sin embargo, el MAT puede presentar problemas al necesitar mantener cultivos vivos de los diferentes serovares de las distintas áreas geográficas. Otro método es el ensayo por inmovinabsorción ligado a enzimas o ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), el cual evita la necesidad de mantener cultivos y se puede automatizar fácilmente, sin embargo, su sensibilidad y especificidad no se comparan con las de MAT, por lo que no se recomienda realizarlo como único ensayo para confirmar los resultados. La detección por cultivo es el diagnóstico definitivo, sin embargo, es obstaculizado por el lento crecimiento de algunas leptospiaras y los largos períodos de incubación antes de aislar y establecer el serovar involucrado (Adler y de la Peña, 2010).

Con el presente estudio, se determinó la seroprevalencia de los serovares Pomona, Grippotiphosa, Copenhageni, Hardjo, Canicola, Bratislava, Autumnalis, Tarassovi y Bataviae de *Leptospira interrogans*, mediante MAT en individuos de 49 especies de mamíferos silvestres de los Órdenes Carnivora, Ungulata y Primates mantenidos en cautiverio. Con esto se provee información básica, adecuada a la necesidad real, para programas de medicina preventiva, junto con generar información respecto a este agente infeccioso zoonótico en mamíferos silvestres mantenidos en cautiverio en Chile.

## Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, certificando el cumplimiento de lo estipulado por la Guía de Principios y Directrices Internacionales para el Uso de Animales en Investigación Biomédica, elaborado por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas.

La población objetivo del zoológico fue de 236 animales, de los Órdenes Carnívora, Ungulata y Primates, con 95, 89 y 52 individuos respectivamente, constituyentes de la mayor parte de los mamíferos silvestres pertenecientes a la colección del Parque Zoológico Buin Zoo.

El tamaño de la muestra se determinó, de acuerdo con Mateu y Casal (2003), tomando en cuenta que la población de animales del zoológico es pequeña, finita y cerrada. Se consideró, en base al estudio realizado por Jung *et al.* (2007), una seroprevalencia esperada del 25%, y se estableció una confianza del 95%, y un error admitido del 5%. Debido a que la población a estudiar estaba constituida por animales de tres Órdenes, se calculó la cantidad representativa de cada uno de ellos en relación al tamaño de la muestra.

Por lo tanto, se colectaron 130 muestras de sangre, de 52 carnívoros, 49 ungulados y 29 primates, de ambos sexos y de diferentes edades, clínicamente sanos y sin antecedentes de haber sido vacunados contra leptospirosis. Las muestras fueron tomadas por punción venosa utilizando jeringas y agujas hipodérmicas estériles desechables. El criterio de elección del volumen de la jeringa y del calibre de aguja, así como también la vena para realizar la venopunción y cantidad de sangre a colectar, se basó en la especie, la edad y masa corporal de los animales.

A las muestras se les extrajo las fracciones de suero por medio de centrifugación a 1400xg por 15 min y posteriormente fueron congeladas a -20°C en tubos de 1,5 mL debidamente identificados hasta su utilización. Ambos procedimientos fueron realizados en las dependencias del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, manteniendo medidas de bioseguridad como el uso de guantes desechables, delantal y gabinete clase II durante la manipulación de los sueros.

Las muestras fueron analizadas para la detección de anticuerpos contra *L. interrogans* en el laboratorio de Serología Bacteriana y Leptospirosis de la Unidad de Bacteriología del Subdepartamento de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG), mediante la prueba de aglutinación microscópica para los serovares Pomona, Grippotiphosa, Copenhageni, Hardjo, Canicola, Bratislava, Autumnalis, Tarassovi y Bataviae, disponibles en el laboratorio. El procedimiento diagnóstico debido a la utilización de cultivos vivos, se realizó bajo las normas de bioseguridad, correspondiendo al uso de gabinete clase II, guantes desechables, gorro, antiparras, delantal, cubre calzado y ropa exclusiva, dentro de un laboratorio con presión negativa e ingreso restringido.

La prueba se realizó usando como referencia el protocolo descrito por la OIE (2008), en el cual se especifica que las cepas seleccionadas deben cultivarse en un medio de cultivo líquido para *Leptospira* (por ejemplo, EMJH, Tween 80 BSA, u otro medio adecuado) a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ . Al momento de su uso como antígeno, los cultivos deben tener al menos cuatro días pero no más de ocho y densidades aproximadas a  $2 \times 10^8$  leptospiras por mL determinadas por absorbancia en un espectrofotómetro con filtro a 400 nm. La prueba consistió en el enfrentamiento del suero de los animales muestreados con los nueve antígenos vivos, para así determinar la presencia de anticuerpos contra alguno de ellos. Se realizó la prueba de detección con una dilución inicial del suero de 1/50. A cada pocillo se añadió posteriormente un volumen de cada antígeno igual al volumen del suero diluido, para hacer una dilución final de 1/100. Las placas de microtitulación se incubaron a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  durante dos a cuatro horas, y se examinaron mediante microscopía de campo oscuro (OIE, 2008). A los sueros que presentaron aglutinación se les volvió a enfrentar al antígeno específico con el cual presentaron reacción, ahora en diluciones iguales y superiores a 1/100, para así determinar el título de punto final, el cual correspondió a la dilución de suero, igual o superior a 1/100, que mostrara un 50% de aglutinación en comparación con un cultivo control diluido en tampón fosfato salino, siendo considerado positivo (OIE, 2008). A los sueros que presentaron aglutinación con más de una cepa antígeno se les consideró el título de punto final de las reacciones con cada una de ellas.

Para el análisis de los resultados, se categorizó a los animales en rangos de edades (<6 meses, 6-18 meses, 18-36 meses y >36 meses) en base a los datos encontrados en sus fichas clínicas. Hubo 12 animales a los cuales no se les pudo identificar la edad. Además, se sectorizó el zoológico en tres cuadrantes (A, B y C) utilizando la división usada en el Parque en base a la ubicación geográfica y a la de distribución de cuidadores (Ver Figura Nro. 1).

Debido al pequeño tamaño de la muestra, para el análisis de asociación de variables se utilizó la prueba exacta de Fisher.

## Resultados

De las 42 especies involucradas en el estudio, nueve (21,4%) presentaron reacción positiva al MAT y de las 130 muestras examinadas, trece (10%) presentaron títulos  $\geq 1:100$  frente a uno o más de los serovares de *L. interrogans* investigados (Ver Cuadro N° 1). A excepción de un guanaco (*Lama guanicoe*) que presentó reacción frente a los serovares Hardjo y Autumnalis, y de un lobo de crín (*Chrysocyon brachyurus*) con seropositividad a los serovares Copenhageni, Hardjo y Canicola, los demás animales fueron seropositivos a un solo serovar.

De las muestras reaccionantes, diez presentaron un título 1:100, cinco un título 1:200, y una muestra presentó una titulación de 1:400 frente al serovar Hardjo (Ver Cuadro N° 2).

Al realizar la prueba exacta de Fisher, se determinó que no existe diferencia significativa entre los géneros en relación a los resultados de los análisis, existiendo un 8,6% de hembras y un 11,7% de machos positivos. La edad tampoco presentó relación con la serorreacción, pese a que el 84,6% (n=11) de los seropositivos eran >36 meses. Al analizar los resultados de los animales en relación al cuadrante donde están incluidos (A, B o C), resultó que no existe una relación significativa entre ellos y los seropositivos, siendo, del total de animales del sector C, seroreactivos el 21,9% (n=7), del sector A el 6,1% (n=3), y del sector B también el 6,1% (n=3). En relación al total de animales muestreados seroreactivos (n=13), un 53,8% pertenecieron a C, y un 23,1% a A y B, respectivamente. Sin embargo, la seropositividad fue significativamente alta ( $p < 0.05$ ) en Ungulados (n=10; 20,4%) en comparación a Carnívoros (n=2; 3,8%) y Primates (n=1; 3,4%) (Ver Cuadro N°1).

De los siete serovares detectados en este estudio, el más frecuente fue Autumnalis, presente en el 53,4% (n=7) de los animales seroreactivos, seguido por Bratislava, Hardjo y Canicola presentes en el 15,4% (n=2) cada uno, y finalmente por Pomona, Grippotiphosa y Copenhageni en el 7,7% (n=1) de los reaccionantes.

## Discusión

Dado que la seroprevalencia obtenida fue de un 10%, se puede indicar que una parte menor a la presupuestada de la población de Ungulados, Carnívoros y Primates del Buin Zoo ha estado expuesta a *L. interrogans*, por lo cual, en caso de que los animales seropositivos sean diseminadores de la bacteria, el riesgo de transmisión a otros animales y/o humanos disminuye. Este resultado fue inferior al 25% esperado y determinado por Jung *et al.* (2007) en un zoológico de Corea. Pero para la comparación de este resultado, es importante destacar la diferencia en el título de punto final, ya que Jung *et al.* (2007) utilizó una titulación  $\geq 1:25$ , de sensibilidad mayor que el  $\geq 1:100$  recomendado por la OIE (2008), comúnmente usado en estudios de exposición en el pasado (Levett, 2004), y utilizado en éste estudio. Por lo mismo, Jung *et al.* (2007) detectó animales seropositivos con títulos  $< 1:100$ , y si sólo se consideran los animales por sobre esa titulación la seroprevalencia disminuye a un 4%, y en ese caso, éste estudio obtuvo una serorreacción superior a la estimada. Además, el número de serovares incluidos fue inferior al del estudio anteriormente mencionado, lo cual, impide encontrar animales seropositivos para serovares no investigados y que no presenten relación antigénica con los serovares utilizados. La inexistencia de estudios previos de seroprevalencia de *L. interrogans* en mamíferos silvestres en cautiverio en Chile y la falta de datos actualizados sobre el estado de infección de animales domésticos en la Región Metropolitana, hace difícil el análisis comparativo de los resultados tomando en cuenta factores locales tales como el medio ambiente, especies portadoras y diseminadoras, y serovares predominantes.

La baja prevalencia de anticuerpos para la bacteria se puede explicar debido a que los animales al estar en condición de cautividad se encuentran insertos en ambientes controlados, en los cuales están siendo constantemente implementados planes de higienización y eliminación de roedores, jugando un rol fundamental en el control de agentes infecciosos. No obstante, es imposible llevar estas cifras a cero ya que, y como dice McNamara *et al.* (2007), pese a la existencia de estrictos programas de control de plagas y de otros animales de vida libre, y a la toma de medidas de precaución para evitar la contaminación de comederos y bebederos, es poco factible que la introducción de esta infección se pueda prevenir. La posibilidad de que algunos animales de la colección sean los portadores de la bacteria no se puede descartar, ya que no existen estudios previos para este patógeno dentro de los programas de vigilancia sanitaria del zoológico, ni se han realizado los análisis para determinar su condición. Además, sería necesario determinar la prevalencia de los distintos serovares en los roedores silvestres de vida libre existentes en el zoológico, para así determinar su verdadero rol como posibles

reservorios y diseminadores de la bacteria entre los animales de la colección. También es importante la evaluación del correcto cumplimiento de las medidas de bioseguridad por parte de los cuidadores, ya que ellos, al tener acceso a distintos recintos de animales de taxones y especies diferentes, pueden ser vectores mecánicos de esta bacteria y de otros agentes infecciosos, pudiendo diseminarlos por el zoológico.

Si bien en el análisis estadístico resultó que no existe relación entre la serorreacción y el sector de ubicación dentro del zoológico, es interesante destacar el alto porcentaje de animales seropositivos pertenecientes al sector C (21,9% de animales del sector; y 53,8% del total de animales reaccionantes), ya que los recintos de éstos animales se encuentran colindantes entre sí (Ver figura N°1). Además, en un terreno próximo a estos exhibidores se han estado realizando trabajos de construcción de nuevos recintos en los últimos años, lo cual, podría ser un factor de movimiento de animales silvestres de vida libre, como roedores, que sean reservorio de la bacteria, ocurriendo un hecho similar al descrito por Gamble y Alvarado (2000).

Algo similar ocurre con la serorreacción y la edad de los animales muestreados, ya que, pese a no existir una relación significativa entre ellas, un alto porcentaje de los animales seropositivos (84,6%, n=11) son >36 meses. Esto se puede deber al pequeño número de animales muestreados y al tipo de muestreo realizado, o a que al tener mayor edad hay mayor posibilidad de contacto con el reservorio y con ello una mayor exposición a *L. interrogans*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cada una de las especie muestreadas tiene expectativas de vida diferentes alcanzando las etapas de madurez a distintas edades, pero debido a la acotada información disponible de los animales y buscando estandarizar los tiempos de exposición se clasificó en rangos etarios. Es por esto que no se identifica la existencia de alguna relación entre las etapas de vida de los animales con la prevalencia de anticuerpos.

Existieron dos animales seropositivos a más de un serovar. Al respecto y bajo el criterio establecido por Jung *et al.* (2007), los serovares que dieron los títulos más bajos se considerarían como reacciones cruzadas del serovar con los títulos más alto. En base a esto, el lobo de crín (*Chrysocyon brachyurus*) sería realmente seroreactivo sólo al serovar Hardjo, y el guanaco (*Lama guanicoe*) al serovar Autumnalis (Ver Cuadro N° 1). De todas formas, no se puede descartar sin otros análisis la existencia de una coinfección.

Como dicen Acha y Szyfres (2001), los títulos bajos pueden significar anticuerpos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación que aún no han tenido tiempo de

alcanzar un nivel alto. En este caso, si bien no habían antecedentes de signología compatibles con leptospirosis al momento de las tomas de muestras, no se realizaron pruebas seriadas de MAT o pruebas específicas para determinar en que etapa de la infección se encontraban los animales seropositivos. Es por esto que sólo se puede indicar, pese a los bajos títulos de anticuerpos en los seropositivos, que al momento en que fueron extraídas las muestras los animales habían tenido contacto con la bacteria y no que presentaban la enfermedad. Por esto mismo, no se justifica la aplicación de un tratamiento para la leptospirosis en éstos animales a menos que se realicen los análisis requeridos para descartar la enfermedad o el estado de portador-diseminador de *L. interrogans*.

Pese al alto porcentaje de seropositividad obtenido en Ungulados, no es posible asegurar que ellos actuarían como reservorio de la bacteria, ya que sólo demuestra la existencia de contacto de los animales con ella. Sin embargo, es evidente la importancia de estos animales dentro de la epidemiología de *L. interrogans* en el zoológico. Al ser estos animales herbívoros, según Adler y de la Peña (2010), serían relevantes como diseminadores, pero para determinar esto es trascendental realizar otros análisis, como cultivo de orina, que están fuera de lo que este trabajo descriptivo contemplaba.

Es importante destacar la alta seroprevalencia encontrada para el serovar Autumnalis, para el cual, los roedores han sido identificados como reservorio en otros países (Oliveira *et al.*, 2012). Además, es interesante el hecho de que éste serovar no sea considerado dentro de los análisis de rutina para los estudios de leptospirosis realizados por el SAG, en los cuales se utilizan los serovares Pomona, Grippotiphosa, Copenhageni, Hardjo y Canicola. En base a estos resultados, sería fundamental efectuar un monitoreo de fauna silvestre cautiva y libre e incluso de animales domésticos, para determinar si éste serovar ha tomado una mayor importancia en Chile, y establecer si los roedores están cumpliendo el rol de diseminadores de Autumnalis en la actualidad; o más bien, si tiene relación a las particularidades ecológicas y epidemiológicas del zoológico, ya que, como dice Levett (2004), el conocimiento de los serovares prevalentes y sus hospederos de mantención es esencial en la comprensión de la epidemiología y en la aplicación de medidas de control de la enfermedad en cualquier región. Al mismo tiempo, si bien MAT es la prueba más apropiada para estudios serológicos debido a que es posible aplicarla en sueros de cualquier especie animal y es factible ampliar o disminuir la cantidad de antígenos a utilizar, entrega una impresión general sobre los serogrupos presentes en la población, sin identificar específicamente al serovar infectante en todos los casos (Bharti *et al.*,



2003; Levett, 2004). En este caso, los resultados pueden ser indicativos de la presencia de un serovar perteneciente al serogrupo Autumnalis, y no específicamente al serovar Autumnalis.

Dentro de los métodos utilizados para prevenir la leptospirosis, además de disminuir la exposición al agente, se encuentra la vacunación. En relación a las vacunas comerciales de *Leptospira* para bovinos, cerdos y perros disponibles a nivel mundial y frecuentemente utilizadas en animales domésticos y silvestres en Chile, Adler y de la Peña (2010) describen que su utilización ha demostrado ser eficaz sólo parcialmente, debido a que la inmunidad inducida está restringida a los serovares incluidos en ella, pudiendo existir otros serovares a nivel local distintos a éstos. Esto concuerda con los resultados del estudio, ya que, basándose en las vacunas existentes en Chile, donde las principalmente utilizadas para perros son de carácter polivalentes y contienen cepas inactivadas de Icterohaemorrhagiae y Canicola, con la excepción de una que incluye además a Pomona y Grippotiphosa; mientras las disponibles para bovinos y cerdos contienen, una a las cepas Pomona, Hardjo, Grippotiphosa, Canicola e Icterohaemorrhagiae, y otra a los serovares Pomona, Sejroe, Hardjo, Wolffii, Tarassovi y Hebdomanis. En ambos casos, darían una inmunidad parcial y frente a serovares que resultaron ser de baja prevalencia en los animales del zoológico, sin inducir inmunidad frente al serovar de mayor importancia que es Autumnalis, por lo que, basado en resultados alcanzados, la vacunación no se justificaría. Esto demuestra que un programa de vacunación exitoso requiere de constantes estudios epidemiológicos para evaluar la incidencia y prevalencia local de diferentes serovares de *Leptospira* en una población dada.

Tal como plantean Boadella *et al.* (2011), la monitorización resulta necesaria para la identificación de cambios de prevalencia de las enfermedades y para medir el impacto de eventuales intervenciones. Además, la monitorización sanitaria de la fauna genera información que beneficia al menos a tres sectores, sanidad animal, salud pública y conservación. El presente estudio entrega por primera vez en Chile un antecedente de la realidad epidemiológica de *L. interrogans* en animales silvestres en cautiverio, aportando información de ayuda para la elaboración y reestructuración de planes de vigilancia sanitaria por parte de ésta y otras instituciones que traten con éstos animales, y para la realización de futuras investigaciones relacionadas.

Si bien, en éste estudio se determinó que la seroprevalencia de *L. interrogans* en el Parque Zoológico Buin Zoo es baja, lo que podría indicar un riesgo leve de exposición de humanos y animales a la bacteria, es importante tomar medidas de manera preventiva. Es por esto, que la

única forma de control del agente en los parques zoológicos es a través de la correcta implementación de medidas de higiene y el control de los pequeños mamíferos silvestres, en el caso de Chile los roedores, con la capacitación constante del personal respecto a éste y a otros agentes infecciosos y zoonóticos, y con la ejecución de programas de vigilancia sanitaria que incluyan a *L. interrogans*, acompañados por un plan de vacunación acorde a los serovares presentes en el lugar. Así, se evitarán casos de leptospirosis no sólo en animales silvestres, sino que también en animales domésticos que vivan a los alrededores del zoológico, y sobre todo, en humanos que tengan contacto ya sea directo o indirecto con los animales portadores, como son médicos veterinarios, cuidadores y visitantes.

## Referencias

- Acha P.N., Szyfres B. 2001. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales: Bacteriosis y Micosis. Vol.1. 3th ed. Publicación Científica y Técnica No. 580, Washington DC: OPS. 175-186 pp.
- Adler B., de la Peña A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140(3-4):287-296.
- Anderson D.C., Geistfeld J.G., Maetz H.M., Patton C.M., Kaufmann A.F. 1978. Leptospirosis in zoo workers associated with bears. *Am J Trop Med Hyg.* 27(1 Pt 1):210-211.
- Bharti A., Nally J., Ricaldi J., Matthias M., Diaz M., Lovett M., *et al.* 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 3(12): 757-71.
- Boadella M., Gortázar C., Acevedo P., Carta T., Martín-Hernando M.P., de la Fuente J., Vicente J. 2011. Six recommendations for improving monitoring of diseases shared with wildlife: examples regarding mycobacterial infections in Spain. *Eur J Wildl Res.* 57: 697–706.
- Douglass E.M. 1979. Hemolytic anemia in two Black Rhinos. *Proc Am Assoc Zoo Vet Conf;* Oct; Denver, Colorado, United States of America. 116-117 pp.
- Esteves F.M., Guerra-Neto G., Girio R.J., Silva-Vergara M.L., Carvalho A.C. 2005. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. *Arq Inst Biol.* 72(3): 283-288.
- Gamble K.C., Alvarado T.P. 2000. Multi-species leptospirosis in an urban zoo: exhibit modification impact on a wildlife point source. *Proc Joint Conf Am Assoc Zoo Vet/ Internatl Assoc for Aquatic Animal Med;* Sep 17-21; New Orleans, Louisiana, United States of America. 153-154 pp.
- Hernández N., López C.A., Guerrero M. 2010. Seroprevalencia de *Leptospira interrogans*, hematología y perfil bioquímico en cánidos silvestres del Parque Nacional El Cimatario, Querétaro. México. *Therya.* 1(2): 121-128.
- Jessup D.A., Miller R.E., Bolin C.A., Kock M.D., Morkel P. 1992. Evaluation of Leptospirosis in free-ranging Black Rhinoceroses by Microscopic Agglutination Titers. *Proc Joint*

Conf Am Assoc Zoo Vet/ Am Assoc Wildl Vet. Nov 15-19; Oakland, California, United States of America. 1992. 197-199 pp.

Juan C., Parás A., García L., Garner M.M., Ramos J.A., Luna M.A., Martínez O., Hernández A. 2001. Leptospirosis in a Mexican Grey Wolf (*Canis lupus baileyi*): Survey for *Leptospira* infection in captive and local free-ranging wildlife and feral animals at Africam Safari, Puebla, México. Proc Joint Conf Am Assoc Zoo Vet/ Am Assoc Wildl Vet/ Assoc Rept Amphib Vet/ Nat Assoc Zoo and Wildl Vet; Sep 18-23; Orlando, Florida, United States of America. 374-376 pp.

Jung B.Y., Choi J.S., Kim K.T., Song Y.K., Lee S.H., Lee K.W., *et al.* 2007. Seroprevalence of leptospirosis in Korean municipal zoo animals. J Vet Med Sci. 69(8):861-3.

Levett P.N. 2001. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 14(2):296-326.

Levett P.N. 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. Clin. Applied Immunol. Rev. 4(6): 435–448.

Lilenbaum W., Monteiro R.V., Ristow P., Fraguas S., Cardoso V.S., Fedullo L.P. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Res Vet Sci. 73(3):319-321.

Lilenbaum W., Monteiro R.V., Albuquerque C.E., Ristow P., Fraguas S., Cardoso V.S., *et al.* 2004. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Vet J. 168(2):191-193.

Luna M.A., Moles L.P., Torres J.I., Gual F. 1996. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la ciudad de México. Vet Méx. 27(3): 229–234.

Mateu E., Casal J. 2003. Tamaño de la muestra. Rev. Epidem. Med. Prev. 1:8-14.

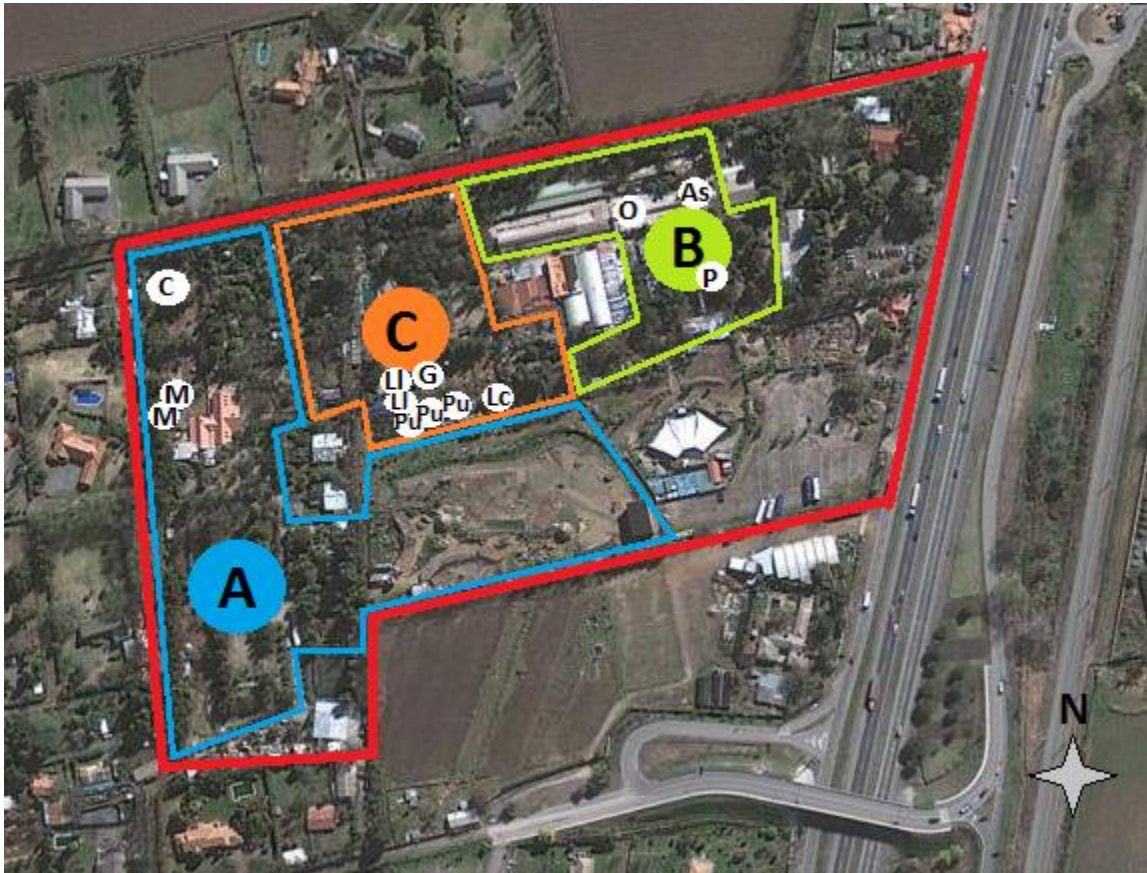
McNamara T., Linn M., Calle P., Cook R., Karesh W., Raphael B. 1997. Leptospirosis: An under-reported disease in zoo animals?. Proc Am Assoc Zoo Vet Conf; 1997 Oct 26-30; Houston, Texas, United States of America. 248-251 pp.

- Monahan A.M., Miller I.S., Nally J.E. 2009. Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol.* 107(3):707-716.
- Moreno N., Agudelo P. 2010. Application of conventional and multiplex PCR assays for identification of isolates of *Leptospira spp.* in Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 27(4): 548-556.
- Murnane R.D., Raverty S.A., Briggs M., Phillips L.G. 1994. Chronic recurrent anemia, massive pulmonary and systemic mineralization, chronic interstitial nephritis and membranoproliferative glomerulonephritis, and hemosiderosis with myelophthisis in a euthanatized Black Rhinoceros. *Proc Joint Conf Am Assoc Zoo Vet/ Assoc Rept Amphib Vet*; Oct 23-28; Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America. 282-286 pp.
- Nall J.D., Maetz H.M. 1975. Leptospirosis outbreak in Birmingham, Alabama Zoo. *Proc Am Assoc Zoo Vet Conf*; Nov 2-6; San Diego, California, United States of America. 162-166 pp.
- Neiffer D.L., Klein E.C., Wallace-Switalski C. 2001. *Leptospira* infection in two black rhinoceroses (*Diceros bicornis michaeli*). *J Zoo Wildl Med.* 32(4):476-486.
- OIE. Office International des Epizooties. 2008. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 6th ed. Paris: OIE. 251-255 pp.
- Oliveira M., Said R.A., Strenzel G.M., Langoni H. 2012. Seroprevalence of anti-*Leptospira spp.* antibodies in dogs in Bahia, Brazil. *Prev Vet Med.* Epub 2012 Apr 15.
- Perolat P., Poingt J.P., Vie J.C., Jouaneau C., Baranton G., Gysin J. 1992. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 46(5): 538-545.
- Rapley W.A., Cranfield M.R., Mehren K.G., Vas S.I., Barker I.K., Lathe F. 1981. A natural outbreak of Leptospirosis in a captive Black-Tailed Deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) Herd and in Dall's Sheep (*Ovis dalli*) at the Metropolitan Toronto Zoo. *Proc Am Assoc Zoo Vet Conf*; Oct 5-8; Seattle, Washington, United States of America. 115-120 pp.

Richardson D.J., Gauthier J.L. 2003. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3(4):187–193.

Roberts M.W., Smythe L., Dohnt M., Symonds M., Slack A. 2010. Serologic-based investigation of leptospirosis in a population of free-ranging eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) indicating the presence of *Leptospira weilii* serovar Topaz. *J Wildl Dis.* 46(2): 564-569.

## Figuras



Lc= Lobo de Crín (*Chrysocyon brachyurus*); Pu= Pudú (*Pudu pudu*); Ll= Llama (*Lama glama*); G= Guanaco (*Lama guanicoe*); O= Ocelote (*Leopardus pardalis*); As= Antílope Sitatunga (*Tragelaphus speki*); P= Papión Sagrado (*Papio hamadryas*); C= Camello (*Camelus bactrianus*); M= Muflón (*Ovis orientalis musimon*).

**Figura N° 1:** Foto satelital del Parque Zoológico Buin Zoo, ubicado en Panamericana Sur km. 33 comuna de Buin, donde se muestran los cuadrantes A, B y C, junto con la ubicación de los animales seropositivos. Fuente: Google Maps ©2012.

## Cuadros

**Cuadro N° 1:** Animales silvestres cautivos seropositivos en Parque Zoológico Buin Zoo.

Nombre común	Nombre Científico	Sexo	Rango Etario	Orden	Cuadrante	Titulación
Lobo de Crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Macho	6 - 18 meses	Carnivora	C	<b>Co= 1:200</b> <b>H= 1:400</b> <b>Ca= 1:200</b>
Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	Macho	> 36 meses	Carnivora	B	<b>A= 1:100</b>
Papión Sagrado	<i>Papio hamadryas</i>	Macho	> 36 meses	Primate	B	<b>A= 1:100</b>
Camello	<i>Camelus bactrianus</i>	Macho	> 36 meses	Ungulata	A	<b>Br= 1:100</b>
Antílope Sitatunga	<i>Tragelaphus spekii</i>	Macho	18 - 36 meses	Ungulata	B	<b>P= 1:100</b>
Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	Macho	> 36 meses	Ungulata	C	<b>H= 1:100</b> <b>A=1:200</b>
Llama	<i>Lama glama</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	C	<b>A= 1:100</b>
Llama	<i>Lama glama</i>	Macho	> 36 meses	Ungulata	C	<b>A= 1:100</b>
Pudú	<i>Pudu puda</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	C	<b>G= 1:100</b>
Pudú	<i>Pudu puda</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	C	<b>Br= 1:100</b>
Pudú	<i>Pudu puda</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	C	<b>A= 1:100</b>
Muflón	<i>Ovis aries</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	A	<b>A= 1:200</b>
Muflón	<i>Ovis aries</i>	Hembra	> 36 meses	Ungulata	A	<b>Ca= 1:200</b>

Co= Copenhageni; H= Hardjo; Ca= Canicola; A= Autumnalis; Br= Bratislava; P= Pomona; G= Grippytyphosa

**Cuadro N° 2:** Seroreactividad a *L. interrogans* en animales silvestres cautivos en el Parque Zoológico Buin Zoo.

Serovar	n° positivos	Títulos MAT		
		1:100	1:200	1:400
<b>Autumnalis</b>	7	5	2	-
<b>Bratislava</b>	2	2	-	-
<b>Pomona</b>	1	1	-	-
<b>Hardjo</b>	2	1	-	1
<b>Grippytyphosa</b>	1	1	-	-
<b>Canicola</b>	2	-	2	-
<b>Copenhageni</b>	1	-	1	-
Total	16	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>1</b>