

**ASPECTOS SANITARIOS Y REPRODUCTIVOS  
DEL PROGRAMA DE CONSERVACIÓN *EX SITU*  
DEL LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*)**



**Fernando Martínez Sánchez**

**2013**







**ASPECTOS SANITARIOS Y REPRODUCTIVOS  
DEL PROGRAMA DE CONSERVACIÓN *EX SITU*  
DEL LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*)**

**Fernando Martínez Sánchez**

**Directores:**

**Josep Pastor Milán**

**Xavier Manteca Vilanova**

**Departament de Medicina i Cirurgia Animals**

**Facultat de Veterinària**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2013**



Els doctors Xavier **MANTECA VILANOVA**, Catedràtic d'Universitat del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, i Josep **PASTOR MILÁN**, Professor Titular d'Universitat del Departament de Medicina i Cirurgia Animals, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMEN:

Que la memòria titulada “**ASPECTOS SANITARIOS Y REPRODUCTIVOS DEL PROGRAMA DE CONSERVACIÓN EX SITU DEL LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*)**”, presentada per Fernando Martínez Sánchez per a la obtenció del grau de Doctor en Veterinària per la Universitat Autònoma de Barcelona, s'ha realitzat sota la nostra direcció i, un cop considerada satisfactoriament finalitzada, autoritzem la seva presentació per tal que sigui avaluada per la comissió corresponent.

I perquè així consti als efectes que siguin oportuns, firmen el present informe a Bellaterra, 23 d'Abril del 2013

Josep Pastor Milán

Xavier Manteca Vilanova

Fernando Martínez Sánchez





*No te quejes de tu pobreza, de tu soledad o de tu suerte, enfrenta con valor y acepta que de una u otra manera son el resultado de tus actos y la prueba que has de ganar.*

Pablo Neruda

*Life is a play that does not allow testing. So, sing, cry, dance, laugh and live intensely, before the curtain closes and the piece ends with no applause.*

Charles Chaplin

*El cielo está a la vista durante buena parte del día y, en la noche, las estrellas, con la cercanía familiar que las distingue en la noche ecuatorial, despiden esa aura protectora, vigilante, que nos llena de sosiego, al darnos la certeza, fugaz, si se quiere, pero presente en el reparador trecho nocturno, de que las cosas siguen su curso con la fatal regularidad que sostiene a los hijos del tiempo, a las criaturas sumisas al destino, a nosotros los hombres.*

Maqroll El Gaviero

Álvaro Mutis, "La Nieve del Almirante"



## AGRADECIMIENTOS

La frase: “Los agradecimientos de una tesis los lee todo quisqui”...y ya que el grupo quisqui puede ser numeroso y variado significa que esta es la parte que requiere una mayor y cuidadosa atención, es decir, una tremenda responsabilidad...pues vamos allá!

Hablando con un amigo sobre qué poner en los agradecimientos me decía que no deben aplicarse únicamente a aquellos que han ayudado a que este proyecto saliera adelante desde el momento en que uno se sienta al ordenador frente a esa imponente hoja de texto tan vacía. No, me decía, y con razón, que en realidad los agradecimientos van más allá, ya que abarcan a todo el proceso que hizo que esto se gestara, creciera y finalmente naciera, y por tanto antes de lo que es la tesis en sí.

Hay personas, otros seres, sensaciones y cosas que me han acompañado en ese tiempo y a los que quiero dar mi más sincero agradecimiento.

Me siento afortunado por haber sido dirigido por excelentes profesionales y mejores amigos como Josep y Xavi, a los que admiro, y que antes fueron mis profesores en aquellos ya muy lejanos años de estudiante. Tal vez sean dos de las personas más ocupadas de la facultad de veterinaria, y por ello mi agradecimiento es mayor. A Rafi, por su cariño y por su capacidad de trabajo y de lucha. A Paco, por tan buenos momentos compartidos con los lince de fuera de las jaulas, y en otros lares...yo de mayor quiero ser como tú. A Déboh por su disponibilidad y ayudar con la estadística a uno de genética Neardenthal. Al Servei d’Hematologia Veterinària i al Servei d’Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS) de la Facultat de Veterinària de Barcelona que han soportado preguntas, visitas, y okupa-ciones de distinta índole.

A mi familia que siempre ha estado ahí, en los momentos soleados y sobre todo en aquellas tan desvitalizadas épocas grises. A ese Indio que no puede evitar que se le

envidrien los ojos aunque todas sus respuestas empiecen por un No, a la Holes que nos ha demostrado a todos lo que es la entereza cuando la varita maligna del Universo te toca, a la Sister que es además mi mejor amiga y que tanto me ha escuchado y ayudado, a la que ya busca a los buitres donde ellos vuelan y que tanta alegría nos dio, al espíritu budista que me encontró en una rotonda con un barco y que está siendo la mujer que más me ha soportado, y a esa pequeña criatura rubia que ha llegado como un torrente revitalizador para toda la familia y que todo lo transforma con su pequeña sonrisa.

A mis amigos que junto con la familia es mi única pero gran fortuna. Muchos y de verdad. A una gran mujer de besos alegres que llegó con una primavera y que tanto pasamos juntos; gracias por tantas cosas y por insistir en que acabara esto. Al Ilustre Consejo de Sabios, mis hermanos, con sus sedes en Cardiff, Santa Cruz de la Sierra, Sant Cugat, Barcelona, Terrasa y Viladrau, y que a pesar de los años y de la distancia seguimos unidos en la complicidad de la amistad más íntima y perpetua. A mi siempre socio, en la veterinaria y en la vida, en los nublosos bosques oseros de vaqueiras de alzada y en nuestro ZooVet forever. A los últimos del Foxos y esa dieta de bravas. A los Pedraitas de esa Playa agujero, que fue prisión y paraíso. A ese malagueño enamorado del Mediterráneo que tan buenos momentos pasamos juntos incluso alrededor de una mesa de acero inoxidable manchada de rojo... un abrazo torpedo!. A Ella, con sus ojos marrones y toda su música, que de alguna forma ha estado desde hace muchos años y probablemente siempre estará. A my favourite Black y su alegre bondad, que tanto nos reímos juntos entre biberones, Ziplocs y micrófonos apagados. A mi amool portugués y a su serena e inteligente belleza...un beijo grande!. A my Baby, zenquiuszausands pel paper dels f.l. i totes aquelles llunes. A mi Cari ,monstruo de la rehabilitación y del entusiasmo, que tanto, tanto me ha dado a mi y a mucha gente, y que debería ser clonado para hacer del mundo un sitio más humano y más auténtico. A la sonriente mujer del microscopio desde aquellos tiempos, con banda sonora de Luz y piscina con pájaros submarinistas, hasta ahora y esas conversaciones sobre el equilibrio y las prioridades. Al duo ecopatólogo que vinieron por el sur y que desde entonces hablamos de casi todo menos de veterinaria y de wildlife. A los que viven en casa de Lua, por su amor, por hacer de su casa la mia, y por ser anfitriones de cenas memorables y por esos desayunos exquisitos. Al colega lisboeta por su compañerismo y amistad, también después del mundo lince, y por las Sagres que cayeron en aquel bar de carretera del

Algarve. A ese buen par de amigos, que desde aquel viaje por el Atlas, seguimos pedaleando juntos aunque sin bici; seguro que volveremos a tener aquellos *sopars de germanor* aunque nos falte ella. A Supermum por toda su vitalidad y naturalidad de parte de su Nandox. A la mare de dues filles precioses i que quan pot es vesteix de sirena, i que un dia ens vam dir, que sempre seriem amics, i així és. A “mi” Sierra, de quejigos, sabinas, enebros y pinares, que me hizo sentir que yo también formaba parte de ella. Al tablero del destino para que este movimiento de ficha salga bien.

A ese invierno tan solitario, frío y lluvioso, y que a pesar de todo no me ganó el pulso. A esa puerta siempre abierta por las noches con furtiva visita zezeando y esos desayunos con churros. A los macarras con plumas que daban una chispa de vida al otro lado de la ventana, en el mundo exterior. A esas calles vacías y oscuras que con extrañeza me veían correr. A esas flores que llegaron anunciando que esto ya tenía fin. Al Océano que veía desde la ventana y que dejé olvidado por tanto tiempo. A Génesis y todos sus inquilinos que se quedaron en la Playa. A todos los amigos y sus mensajes diciendo que estaban allí y daban ánimos.

A la veterinaria que ha sido motor y pasión ...

A Berta Juanola



# ÍNDICE

<b>1. ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
3.1 Programas de manejo y reproducción de felinos silvestres en cautividad	11
3.1.1 Introducción	11
3.1.2 Perspectiva histórica	11
3.1.3 Tipos de programas de manejo	12
3.1.4 Programas de conservación <i>ex situ</i>	14
3.1.4.1 ¿Es necesario hacer un programa de conservación <i>ex situ</i> ?	14
3.1.4.2 ¿Qué hace falta para desarrollar un programa de conservación <i>ex situ</i> ?	14
3.2 El lince ibérico	16
3.2.1 Características generales	16
3.2.2 Hábitat	16
3.2.3 Alimentación	17
3.2.4 Comportamiento social	17
3.2.5 Biología reproductora	18
3.2.6 Estatus y amenazas de conservación	19
3.2.7 Enfermedades en vida libre	21
3.2.8 Programa de conservación <i>in situ</i>	24
3.2.9 Programa de conservación <i>ex situ</i>	27
3.2.9.1 Creación	27
3.2.9.2 Objetivos	28
3.2.9.3 Organización	28

3.2.9.4 Manejo genético y demográfico	28
3.2.9.5 Manejo de los animales	29
3.2.9.6 Situación del programa	29
3.3. Enfermedades de felinos silvestres en cautividad	31
3.3.1 Enfermedades infecciosas	31
3.3.1.2 Bacterianas y fúngicas	31
3.3.1.3 Víricas	33
3.3.1.4 Parasitarias	36
3.3.2 Enfermedades no infecciosas	37
3.4. Biología reproductora de felinos silvestres en cautividad	39
3.4.1 Técnicas de reproducción asistida	40
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>5. CAPÍTULOS</b>	<b>47</b>
5. 1. CAPÍTULO 1- Integrating health issues into the conservation of the Iberian lynx ( <i>Lynx pardinus</i> )	49
5. 2. CAPÍTULO 2- Morbidity and mortality of captive Iberian lynx ( <i>Lynx pardinus</i> ) in the <i>ex situ</i> conservation programme	71
5. 3. CAPÍTULO 3. Reproductive parameters of captive Iberian lynx ( <i>Lynx pardinus</i> ) in the <i>ex situ</i> conservation programme	85
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>105</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>117</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>121</b>



## **1. ABSTRACT**



## 1. ABSTRACT

The Iberian lynx (*Lynx pardinus*) is the only species of felid in major risk of extinction according to the International Union for Conservation of Nature. A captive breeding programme was initiated in 2004 in order to support the efforts for the conservation and recovery of the species in the wild. This study on the morbidity, mortality and reproduction of the species in captivity was done to improve the husbandry of the species and recommend lines of research.

An Iberian lynx health program was integrated into multidisciplinary efforts, which made it possible to obtain relevant biomedical information of the species. The program also established preventive measures in the captive population in order to reduce the risk of disease development. Renal toxicosis due to the administration of supplements with an excess of vitamin D affected 40.6% (39/96) of the animals. Other diet-related conditions consisted of sporadic cases of fatal salmonellosis, dermatophytosis, and gastrointestinal episodes. Intraspecific trauma cases were predominantly observed from sibling aggression. Suspected idiopathic epilepsy and femoral neck metaphyseal osteopathy were also observed. *Mycobacterium bovis* was found as a secondary infection in two of the vitamin D toxicosis deceased animals. Stillbirths and premature and non-attended cubs that died from secondary bacterial sepsis, accounted for 62.5% (25/40) of the mortality in the captive population. One third of the clinical signs remained undiagnosed.

Several reproductive parameters were determined in the Iberian lynx captive population and it was studied if they were affected by the age, condition (wild-born or captive-born) or origin of the breeders (Sierra Morena or Doñana areas). The mating period lasted a mean of 3.1 days, in which the animals copulated an average of 23 times. Captive-born males had a lower mating frequency than wild-born ones. The breeding proportion (number of births out of number of pairings) was 47.7%. Mating success of females (females that gave birth out of those that mated) was greater in older females and it was not affected by their condition or origin. Mean gestation time was 64.4 days, the average litter size was 2.4 cubs with a mean sex ratio of 1.15 (males out of females). Almost half of the litters were twins and one third triplets. As the mating frequency increased the probability of having triplets over twins increased. Although there was a tendency for bigger litters amongst the wild-born females from Sierra Morena, litter size was not significantly affected by the age, condition or origin of the female. First pregnancies registered a higher

perinatal mortality and non-attended cubs (81.8%). The assistance of cubs at risk increased significantly the cub survival and the reproductive output of females at weaning.

Casuistry indicated that improvement of diet-related conditions is a key factor in preserving the health of the captive population. Thus, the control of food and supplement composition, rabbit farm suppliers and hygiene should be standardized and improved. The analysis of clinical signs did not offer useful information on the health status of the captive population. Thus, more emphasis should be placed on recording data and getting diagnosis. Captivity related factors, including stress, could have had a negative impact on the lynx fitness. Low genetic variability could also be related to certain diseases and the lynx fitness. Thus, research in genetics and captive related factors should also be performed.

## **2. RESUMEN**



## 2. RESUMEN

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es la especie de felino en mayor riesgo de extinción según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. En el 2004 se inicia un programa de cría en cautividad para apoyar los esfuerzos de conservación y recuperación de la especie en la naturaleza. El presente estudio sobre la morbilidad, mortalidad y la reproducción de la especie en cautividad se ha realizado con el objetivo de mejorar el manejo de la especie y recomendar líneas de investigación.

El programa sanitario del lince ibérico se ha integrado en un esfuerzo multidisciplinar, lo que ha permitido obtener una sólida base de información biomédica de la especie. Este programa sanitario también ha establecido diversas medidas de medicina preventiva con el objetivo de reducir el riesgo de aparición de enfermedades. La toxicosis renal debido a la administración de suplementos con un exceso de vitamina D afectó al 40.6% (39/96) de los animales. Otras patologías asociadas a la dieta fueron casos esporádicos de salmonelosis, dermatofitosis, y ciertos cuadros gastrointestinales. Los traumas intraespecíficos se debieron principalmente a las agresiones entre cachorros. También se observó necrosis avascular de cuello de fémur así como cuadros sospechosos de epilepsia idiopática. La infección secundaria por *Mycobacterium bovis* se detectó en dos de los ejemplares que murieron debido a la intoxicación por vitamina D. Abortos, prematuros y neonatos no atendidos por sus madres constituyeron el 62.5 % (25/40) de las muertes registradas en la población cautiva. Un tercio de los signos clínicos no fueron diagnosticados.

En la población cautiva de lince ibérico también se determinaron ciertos parámetros reproductivos y se estudió si estos se veían afectados por la edad, la condición (nacidos en cautividad o en vida libre) y el origen (si proceden de la zona de Sierra Morena o Doñana) de los ejemplares. El periodo de cópulas duraba una media de 3.1 días, se producían una media de 23 cópulas por pareja. Los machos nacidos en cautividad realizaron menor número de cópulas que los que habían nacido en la naturaleza. La proporción de cría (número de partos respecto al total de emparejamientos) fue del 47.7%. El éxito de cópula de las hembras (proporción de hembras que paren respecto a las que han copulado) fue más elevado en hembras con mayor edad, y no se veía afectado ni por la condición ni por el origen de las mismas. El tiempo medio de gestación fue de 64.4 días, con un tamaño medio de camada de 2.4 cachorros, y un sex ratio medio de camada de 1.15 (relación del número de cachorros machos sobre el de hembras). El tamaño de camada no se veía

significativamente afectado por la edad, condición u origen de la hembra. Sin embargo las hembras de Sierra Morena nacidas en libertad presentaban una tendencia a un mayor tamaño de camada. Las primeras gestaciones tuvieron una mayor mortalidad perinatal y abandono de cachorros (81.8%). El tratamiento y cría artificial de neonatos en riesgo produjo un aumento significativo de la supervivencia de los mismos, así como del éxito reproductor de las hembras al destete.

Los resultados muestran que la mejora en los aspectos relacionados con la alimentación constituyen los factores claves para mantener la salud de la población cautiva. Por tanto, el análisis de la composición de la dieta y de los suplementos, el control de las granjas que suministran conejos como alimento, y el control de la higiene debería ser mejorado y estandarizado. El análisis de los signos clínicos no ha ofrecido información útil sobre el estado de salud de la población cautiva. Sería por tanto necesario realizar un mayor esfuerzo en el registro de la información clínica y en la realización de diagnósticos. Diversos factores asociados al mantenimiento en cautividad de los animales, incluyendo el estrés, podrían tener un impacto negativo en la supervivencia y la capacidad reproductiva de la especie. De igual forma, la baja variabilidad genética de la especie podría estar relacionada con su supervivencia y capacidad reproductiva, así como con el desarrollo de ciertas enfermedades. Por tanto, sería recomendable investigar si estos factores afectan a la salud y la reproducción de la población cautiva de lince ibérico.



### **3. INTRODUCCIÓN**



### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. Programas de manejo y reproducción de felinos silvestres en cautividad**

##### **3.1. 1 Introducción**

La conservación de especies constituye un gran reto debido a la rápida pérdida de biodiversidad del planeta (Butchart et al., 2010). Aunque las medidas de conservación *in situ* (en el medio ambiente) son sin duda las más efectivas para proteger tanto las especies como su hábitat, en muchos casos no son suficientes o simplemente no se pueden realizar. En estas situaciones los programas de manejo en cautividad ofrecen una oportunidad para mantener poblaciones amenazadas (una especie de “seguro de vida”), y pueden ayudar a la recuperación de las poblaciones silvestres mediante la cría en cautividad (Gilpen & Soulé 1986). Llevado al extremo, la cría en cautividad ha permitido evitar la extinción de especies que habían llegado a desaparecer en su hábitat. Así, 25 especies animales, incluyendo el turón de patas negras (*Mustela nigripis*), el cóndor de California (*Gymnogyps californianus*), y el órix cimitarra o dama (*Oryx dammah*), pudieron conservarse y criarse en cautividad tras su extinción en la naturaleza.

Sin embargo la conservación de especies no puede limitarse a su mantenimiento y cría en cautividad. Además los programas de cría en cautividad no son herramientas simples ni exentas de limitaciones (Synder et al., 1996) tal como veremos más adelante.

##### **3. 1. 2 Perspectiva histórica**

A principios de los 90 la cría en cautividad, como una estrategia de conservación, alcanzó un gran reconocimiento en la sociedad en general y en ámbitos conservacionistas. La *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) la respaldó mediante una declaración de política en cría en cautividad (IUCN 1987). Empezaron así a proliferar las recomendaciones de establecer programas de cría, y dentro de la IUCN, el *Conservation Breeding Specialist Group* (CBSG), mediante una serie de *Global Captive Action Recommendation*, recomendó la cría en cautividad del 34% de los 3550 taxones examinados (Seal et al., 1993). En Norteamérica se recomendó la cría en cautividad en el 63% de los 314 planes de recuperación de especies (Tear et al., 1993). Sin embargo, se estimaba que sólo existía espacio para unas 500 especies animales en los zoos e instituciones asociadas (IUDZG/CBSG 1993) además de un espacio indeterminado en agencias estatales.

Tras el gran apoyo y esperanza inicial en los programas de cría en cautividad empezaron a aparecer las primeras opiniones críticas por parte de la comunidad científica (Rahbek 1993; Rabinowitz 1995; Oates 1999). Snyder (1996) concluía en su trabajo (1) que la cría en cautividad estaba justificada en la recuperación de un número limitado de especies en peligro, cuando no existían otras alternativas, y (2) que la cría en cautividad siempre tenía que estar íntimamente ligada con el objetivo de recuperar las poblaciones silvestres, y no debía constituir una solución a largo plazo.

### **3. 1. 3 Tipos de programas de manejo**

Existen dos clases de programas de manejo intensivo de especies silvestres en cautividad. El primer tipo lo realizan instituciones zoológicas. Así los zoos norteamericanos adheridos a la *Association of Zoos and Aquariums* (AZA) desarrollan desde 1981 los *Species Survival Plans* (SSP), actualmente 116 programas. De forma similar, los zoos europeos dentro de la *European Association of Zoos and Aquaria* (EAZA) desarrollan desde 1985 los *European Endangered Species Programme* (EEP), otros 188 programas de manejo.

Para cada SSP y EEP existe un coordinador y un comité de expertos. El coordinador, entre otras funciones, mantiene un registro de reproductores o *studbook*, y junto con el comité revisan la evolución del programa y deciden el movimiento de animales entre los zoos, los emparejamientos de reproductores, y las necesidades de investigación.

Dentro de las 36 especies existentes de felinos, los programas SSP y EEP, manejan un total de 19 especies, incluyendo varias subespecies (Tabla 1).

El otro tipo de programa de manejo, los programas de conservación *ex situ* (fuera del medio ambiente), son similares a los que realizan los zoológicos, pero con la excepción de que se han creado como respuesta a un programa de recuperación de la población silvestre amenazada. Los objetivos fundamentales de estos programas son: (1) crear y mantener poblaciones cautivas autosostenibles, sanas, con comportamientos naturales y variabilidad genética, y de esta forma (2) disponer de individuos para programas de reintroducción (Ralls & Ballou 1986; Snyder et al., 1996; Frankham 2008; Robert 2009; Gonçalves da Silva et al., 2010).

Tabla 1. Especies y subespecies de felinos silvestres en programas de manejo EEP y/o SSP en zoológicos de la EAZA (Europa) y de la AZA (Estados Unidos) respectivamente.

Nombre científico	Nombre común	Programa
<i>Acinonyx jubatus</i>	Guepardo (genérico)	SSP
<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>	Guepardo del sur	EEP
<i>Acinonyx jubatus soemmerringi</i>	Guepardo del norte	EEP
<i>Catopuma temminckii</i>	Gato dorado asiático/de Temminck	EEP
<i>Felis margarita</i>	Caracal, Gato del desierto	EEP/SSP
<i>Felis nigripes</i>	Gato de patas negras	EEP/SSP
<i>Leopardus pardalis</i>	Ocelote	SSP
<i>Leopardus wiedii</i>	Margay	EEP
<i>Leptailurus serval</i>	Serval	SSP
<i>Lynx canadensis</i>	Lince canadiense	SSP
<i>Lynx rufus</i>	Lince rojo	SSP
<i>Neofelis nebulosa</i>	Pantera nebulosa	EEP/SSP
<i>Oncifelis geoffroyi</i>	Gato montes sudamericano/de Geoffroyi	EEP/SSP
<i>Otocolobus manul</i>	Gato de Pallas, Manul	EEP/SSP
<i>Panthera leo</i>	León (africano)	SSP
<i>Panthera leo persicus</i>	León asiático	EEP
<i>Panthera onca</i>	Jaguar	SSP
<i>Panthera pardus japonensis</i>	Leopardo chino del norte	EEP
<i>Panthera pardus kotiya</i>	Leopardo de Ceilán o de Sri Lanka	EEP
<i>Panthera pardus orientalis</i>	Leopardo de Amur	EEP/SSP
<i>Panthera pardus saxicolor</i>	Leopardo de Persia	EEP
<i>Panthera tigris</i>	Tigre (genérico)	SSP
<i>Panthera tigris altaica</i>	Tigre de Amur	EEP/SSP
<i>Panthera tigris jacksoni</i>	Tigre Malayo	SSP
<i>Panthera tigris sumatrae</i>	Tigre de Sumatra	EEP/SSP
<i>Prionailurus viverrinus</i>	Gato pescador	EEP/SSP
<i>Puma concolor</i>	Puma	SSP
<i>Uncia uncia</i>	Leopardo de las nieves	EEP/SSP

### **3. 1. 4 Programas de conservación *ex situ***

#### **3. 1. 4. 1 ¿Es necesario hacer un programa de conservación *ex situ*?**

Una forma de valorar la necesidad de llevar a cabo un programa de conservación *ex situ* es mediante la realización de un taller participativo de viabilidad de la población de la especie y de su hábitat, los conocidos como *Population and Habitat Viability Assessment* (PHVA) (Beissinger & Westphal 1998). Así el PHVC del lince ibérico (*Lynx pardinus*) (IUCN/MIMAM 1999) consideró la cría en cautividad como una herramienta necesaria para la conservación de la especie. Sin embargo, en el caso de la pantera de Florida (*Puma concolor coryi*), una subespecie de puma de la que apenas quedaban unos 30 individuos en 1995, se desaconsejó la cría en cautividad (USFWS 2008). Se conocía que la población silvestre era muy endogámica, con anomalías cardíacas y reproductoras (Roelke et al., 1993). En esta situación no era posible desarrollar un programa de cría, y se optó por un programa de recuperación genética con la introducción de 8 hembras de la subespecie de puma de Texas (*P. concolor stanleyana*), la más próxima genéticamente a la pantera de Florida.

#### **3. 1. 4. 2 ¿Qué hace falta para desarrollar un programa de conservación *ex situ*?**

##### (1) asegurar un apoyo administrativo

En términos prácticos, las dificultades en asegurar la continuidad de un apoyo administrativo es el mayor problema con el que se enfrentan muchos programas, aunque éste sea un factor muchas veces ignorado (Clarck et al., 1994).

##### (2) recursos económicos

Preparar unas instalaciones, su mantenimiento, la alimentación de los animales, el personal, los cuidados veterinarios, la investigación, etc., hacen que los programas de cría sean generalmente caros. Es por ello clave el asegurar la financiación a largo plazo. Es importante también que la disponibilidad de recursos económicos no comprometa los esfuerzos *in situ* que se puedan realizar paralelamente (Wildt et al., 2010).

##### (3) manejo genético y poblacional

Los programas de conservación *ex situ* procuran mantener la máxima variabilidad genética de la especie para evitar los efectos perniciosos de la depresión por endogamia, como el

incremento de los índices de mortalidad (Ralls et al., 1988), la disminución de la fecundidad (Lacy et al., 1993) o el aumento de la susceptibilidad a las enfermedades (O'Brien et al., 1985; Trinkel et al., 2011). Cómo será el manejo genético vendrá determinado por la duración del programa de cría y las características biológicas de la especie (edad de madurez sexual, esperanza de vida, intervalos de partos, tamaño de camada, supervivencia de cachorros). Mediante programas informáticos específicamente diseñados se establecen unos posibles escenarios de manejo genético y poblacional (Pollack et al., 2002). Cuanto más a largo plazo es el programa mayor cantidad de fundadores tendrán que ser capturados del medio. Por tanto, los programas a largo plazo resultan inviables en la situación en que se encuentran muchas especies en la naturaleza, ya que pueden comprometer su propia conservación *in situ*, y demorar peligrosamente la reintroducción de ejemplares. Esta es una de las razones por la que muchos programas de conservación están diseñados a medio plazo, como en el caso del lince ibérico, que se expondrá más adelante.

#### (4) instalaciones y manejo de los ejemplares

El emplazamiento de las instalaciones de cría es recomendable que se encuentre en el país o países donde se encuentra la especie, y próximas a su hábitat. Esto mejora las posibilidades de que las actividades *in situ* y *ex situ* se apoyen mutuamente y sean interactivas (Wildt et al., 2010). Se facilita además el movimiento de animales entre el campo y la cautividad lo que minimiza los costes, los riesgos de transmisión de agentes infecciosos, y el estrés de los animales. Probablemente uno de los aspectos más importantes es que de esta forma se pueden involucrar y formar a personas locales para que puedan convertirse en los profesionales expertos que en última instancia sean los responsables de la conservación de la especie (Wildt et al., 2010).

El diseño de las instalaciones y el manejo de los ejemplares deben permitir y fomentar las conductas naturales (Mellen & Shepherdson 1997). Las conductas naturales aprendidas o culturalmente transmitidas son especialmente susceptibles a perderse rápidamente en cautividad, y el manejo genético no tiene efecto alguno en evitarlo (Snyder et al., 1996). La pérdida de las conductas naturales pueden hipotecar el establecimiento de poblaciones silvestres autosostenibles cuando los animales son reintroducidos (Fleming 1994).

A título de ejemplo, las instalaciones para felinos deben disponer de zonas elevadas y otras

donde los animales puedan esconderse, deben permitir la búsqueda de alimento, el desplazamiento y la interacción con otros congéneres (Mellen & Shepherdson 1997).

#### 6) programa sanitario

En cualquier programa de conservación de felinos, tanto en cautividad como en vida libre, es necesario la implementación de un programa sanitario (Munson & Cook, 1993; Deem et al., 2001). Para evitar la entrada de agentes infecciosas en una población cautiva el programa sanitario debe incluir cuarentenas, control de la alimentación, exámenes y procedimientos diagnósticos de los ejemplares, realización de necropsias, disponer de barreras que impidan la interacción con otros carnívoros silvestres o domésticos, y protocolos de higiene y profilaxis. Además, el programa sanitario debe considerar y controlar aquellas condiciones asociadas a la cautividad, p.ej., la menor actividad física o el estrés, que pueden favorecer el desarrollo de ciertas enfermedades.

### **3. 2 El lince ibérico**

#### **3. 2. 1 Características generales**

El lince ibérico, *Lynx pardinus* (Temminck, 1827), es una de las 36 especies de felinos existentes en el planeta, y una de las cuatro especies del género *Lynx*. Es un felino de tamaño mediano, siendo los machos algo mayores que las hembras, con pesos entre 11-15 kg y 8-10 kg respectivamente. Su aspecto corporal es estilizado, con patas largas, aparentemente desproporcionadas, y cola corta, terminada en un mechón negro. Presenta unas orejas grandes y triangulares, que acaban en un característico penacho de pelo negro y la parte inferior de la cara aparece rodeada por largos pelos que forman unas espesas patillas terminadas en punta, y más desarrolladas en los animales adultos. El pelaje también es característico, presentando una base grisácea o rojiza, sobre la que aparecen motas de diversas formas y tamaño, conformando varios patrones diferentes de diseño. Se han descrito cuatro patrones, de los que habían desaparecido tres en el área de Doñana, probablemente debido a la consanguinidad (Beltrán & Delibes 1993).

#### **3. 2. 2 Hábitat**

El lince ibérico se encuentra en áreas donde la vegetación dominante es el monte mediterráneo, y que además dispongan de buenas poblaciones de conejo (Palomares et al., 2000). Así, está ausente en zonas de monte mediterráneo sin conejos o en áreas con



abundancia de conejos pero sin cobertura vegetal de matorral, o con vegetación no adecuada para la especie (Palomares et al., 2000). Precisa de lugares apropiados para parir y cuidar a los cachorros, como huecos en árboles o cuevas entre rocas, y de puntos de agua permanentes durante los periodos más secos, especialmente para el caso de hembras con cachorros.

### **3. 2. 3 Alimentación**

El lince ibérico está especializado en una presa, el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*), cuyos restos están presentes entre el 85-99% de los excrementos analizados (Delibes 1980; Gil-Sánchez et al., 1997; Palomares et al., 2001). Ocasionalmente el lince puede cazar otras especies, como varias especies de aves, liebres (*Lepus granatensis*) e incluso jóvenes de ciervos (*Cervus elaphus*) y gamos (*Dama dama*).

Esta acusada especialización llega hasta tal punto que a pesar del acusado descenso de las poblaciones de conejo debido a enfermedades, el lince no varía su dieta ni se produce una sustitución por otras presas alternativas (Calzada 2000). En zonas donde el conejo está ausente o en muy bajas densidades la especie no puede vivir.

### **3. 2. 4 Comportamiento social**

Los lince son animales solitarios (Ferrerías et al., 1997). No es habitual observar individuos juntos, salvo macho y hembra durante la época de celo, o bien a las hembras con sus cachorros. Los cachorros dejan de depender de la madre hacia los 7-8 meses de edad, y entre el primer y el segundo año de vida inician la búsqueda de un territorio propio y exclusivo frente a otros individuos (Palomares et al., 2001).

El tamaño y la defensa de estos territorios resulta variable en función del sexo y de la disponibilidad de conejo (Palomares et al., 2001). Los machos adultos tienen territorios mayores que las hembras y, aunque pueden solaparse con el de varias hembras adultas, generalmente no lo hacen con los de otros machos, a los que intentarán excluir mediante el marcaje con orina y excrementos en puntos clave. En zonas con alta densidad de conejo, los territorios de los machos y de las hembras adultos, alcanzan una superficie media de 1030 y de 530 ha respectivamente. En cambio, en zonas con bajas densidades de conejo, los territorios de los adultos se amplían hasta las 1690 ha para machos y 1260 ha para hembras adultas (Ferrerías et al., 1997). Los lince no toleran la presencia de otros

depredadores en su territorio y pueden eliminar a zorros (*Vulpes vulpes*), meloncillos (*Herpestes ichneumon*), y ginetas (*Genetta genetta*) (Palomares & Caro 1999).

### **3. 2. 5 Biología reproductora**

Los parámetros reproductivos básicos del lince ibérico en libertad son similares a los de las otras tres especies de lince (Tabla. 2). Las hembras normalmente crían entre los 3 y los 9 años de vida (Palomares et al., 2005). Los celos suelen ocurrir entre diciembre y febrero, y el periodo de partos suele oscilar entre marzo y abril. Sin embargo también se han registrado celos y partos más tardíos (Fernández et al., 2002; Palomares et al., 2005). Las camadas pueden ser de 1 a 4 crías, aunque las camadas con 3 crías son las más habituales. Los machos no participan en la cría de los cachorros. En la mayoría de ocasiones sólo 2 de los cachorros nacidos sobreviven hasta llegar al momento de dispersarse (Palomares et al., 2005).

La determinación de metabolitos de estrógenos en heces de hembras de lince ibérico en cautividad muestra que son reproductoras estacionales, ciclando desde enero hasta mayo-junio (Pelican et al., 2009). Sin embargo, no se ha podido determinar un ciclo estral claro ya que los aumentos de estrógenos no se correlacionan con el comportamiento de celo (Pelican et al., 2009). Existe un patrón estacional de excreción de estrógenos, con concentraciones basales que aumentan durante la época reproductiva, con independencia que tras las cópulas haya o no gestación. La excreción fecal de metabolitos de progestágenos es también variable a lo largo del año, y no varía entre hembras gestantes o pseudogestantes, por lo que su determinación no tiene utilidad como diagnóstico de gestación (Göriz et al., 2009).

Otra característica distintiva del lince ibérico y probablemente del género *Lynx* es una co-excreción significativa post-parto de metabolitos de estrógenos y progestágenos, y una elevación post-parto lactacional de hormonas esteroideas gonadales. Los exámenes ecográficos muestran además cuerpos lúteos que permanecen activos incluso después de la estación reproductora y que podrían explicar el mantenimiento de los niveles de progestágenos a lo largo de casi todo el año (Göriz et al., 2009; Brown 2011). Los cuerpos lúteos en otras especies de felinos normalmente desaparecen tras del parto.

La determinación de metabolitos de testosterona en heces de machos en cautividad, que se mantienen elevados a lo largo del año pero con concentraciones ligeramente superiores

entre diciembre y junio, indica que potencialmente los machos pueden engendrar durante todo el año (Jewgenow et al., 2006; Pelican et al., 2009). Estos resultados concuerdan con los análisis de muestras de semen, en los cuales no existen diferencias entre aquellas obtenidas durante la estación reproductiva y fuera de ella (Gañán et al., 2010). Los primeros intentos de la utilización de técnicas de reproducción asistida en la especie han logrado la fertilización *in vitro* de oocitos de gato doméstico con semen criopreservado de lince ibérico (Gañán et al., 2009).

Tabla 2. Parámetros reproductivos en las cuatro especies del género *Lynx* (Denhard et al., 2009)

	<i>L. lynx</i>	<i>L. pardinus</i>	<i>L. canadensis</i>	<i>L. rufus</i>
Peso al nacer	250-360 g	150-220 g	200 g	112-226 g
Tamaño de camada	2-3 (1-5)	2-3 (1-4)	2 (1-4)	3.5 (1-6)
Madurez sexual	2-3 a	2-3 a	2 a	?
Duración estro	2-7 d	2-7 d	-	2 d
Duración del ciclo	-	-	-	44 d
Gestación	68-72 d	63-66 d	60-65 d	50-60 d
Lactación	3 m	3-4 m	-	3 m
Comida sólida	6 s	8-9 s	-	7-8 s
Camadas/año	1	1	1	> 1
Periodo de cópulas	En-Ab	En-Feb	En-Feb	En-Jul

### 3. 2. 6 Estatus y amenazas de conservación

El lince ibérico es actualmente la única especie de felino en la categoría de “críticamente amenazado” establecida por la IUCN (IUCN 2007). Si bien la especie habitaba gran parte de la península ibérica, salvo una estrecha franja del norte y el noroeste, ya hacia 1960 ocupaba tan solo el 10% de su área de distribución histórica (Rodríguez & Delibes 1992). Su regresión continuó y hacia 1980 la especie ya estaba confinada en diez poblaciones muy fragmentadas sumando un máximo de unos 1100 ejemplares (Rodríguez & Delibes 1992).

A principios del presente siglo tan sólo restaban dos de esas poblaciones (Sierra Morena y Doñana), aisladas, y con un censo total inferior a 200 ejemplares (Guzmán et al., 2004). (Fig. 1).

Las causas que explican que se encuentre al borde de la extinción están, directa o indirectamente, relacionadas con la actividad humana, y son:

1) la disminución de su presa base, el conejo de monte, debido principalmente a infecciones víricas introducidas: la mixomatosis (causada por un poxvirus) hacia los años 50, y la enfermedad vírica hemorrágica (causada por un calicivirus) hacia finales de los 80. Trabajos recientes apuntan a que la disminución del conejo también se debió a la fragmentación y pérdida de hábitat (Delibes-Mateos et al., 2010). Entre 1973 y 1993 la población de conejos en la península ibérica se redujo alrededor de un 70% (Virgós et al., 2007).

(2) la destrucción y fragmentación del hábitat. En los últimos 60 años se están produciendo profundas modificaciones en el territorio como consecuencia del desarrollo de una agricultura extensiva, las plantaciones de coníferas y eucaliptos, la pérdida de corredores naturales como bosques de ribera y lindes naturales, el auge de una industria cinegética con un profundo impacto en la vegetación, la construcción de infraestructuras, y la urbanización del territorio.

(3) persecución directa . Entre 1950 y 1999 hay registradas las muertes de 1258 lince por causas no naturales, lo que supone una media de 30 animales anuales (Guzmán et al., 2004); alrededor de un 60% de las bajas fueron por trampeo y un 25% por caza. Esporádicamente siguen produciéndose bajas de lince por trampas y caza ilegal (Simón et al., 2009).

(4) atropellos. El aumento de los kilómetros de carreteras asfaltadas y la fragmentación del hábitat ha ocasionado también un aumento de las muertes por atropello; así en la zona de Doñana, en los años 80 el 21% de las muertes registradas de lince fue por atropellos (n=24), y entre 1992 y 1997 aumentó hasta un 48% (n=60) (Ferrerías et al., 2010).

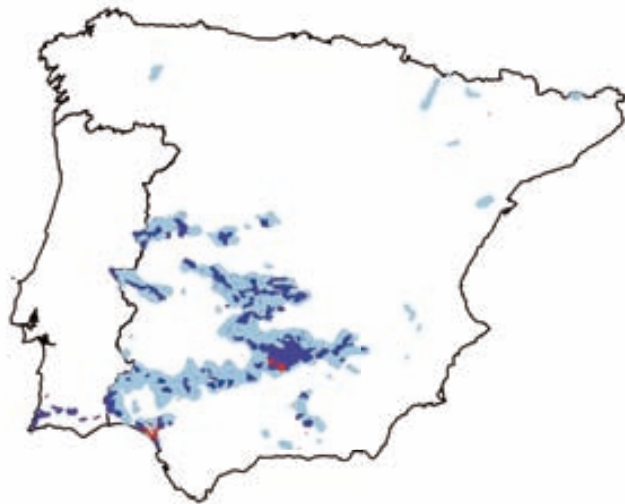


Fig. 1. (Por Simón et al., 2009). Área de distribución del lince en los años 60 (sólo en España; azul pálido), a principios de los 80 (azul oscuro) (Rodríguez & Delibes 1992) y en 2002 (rojo) (Guzmán et al., 2004).

### 3. 2. 7 Enfermedades en vida libre

La tabla 3 muestra los agentes infecciosos detectados en las poblaciones silvestres de lince ibérico. De todos ellos, se han registrado casos de enfermedad en infecciones por *Mycobacterium bovis*, por el virus del moquillo canino (CDV) y por el virus de la leucemia felina (FeLV), y que son expuestos a continuación. Finalmente también se describe la glomerulonefritis membranosa (GNM) y la depleción linfoide detectadas en el lince ibérico, y de las cuales no se conoce aún si pueden tener un papel en la conservación de la especie.

La tuberculosis afecta al lince ibérico por el consumo ocasional de ungulados silvestres infectados, probablemente por la inhalación de las micobacterias. La prevalencia de tuberculosis en ungulados silvestres es mayor cuando se encuentran en altas densidades, que habitualmente están favorecidas directa o indirectamente, por la protección de zonas naturales y por la industria cinegética (Gortázar et al., 2006), tal como ocurre en las zonas de presencia de lince.

Una de las patologías registradas en el lince con un mayor impacto en la conservación de la especie fue la epizootia por FeLV en la población silvestre de Doñana entre finales del 2006 y la primavera del 2007 (Meli et al., 2009; López et al., 2009). Cuatro animales fueron encontrados muertos en el campo, gracias a llevar radiocollares, y tras el inicio de una intensa campaña de capturas y exámenes sanitarios, se identificaron otros 8 animales

vivos infectados (7 virémicos que se retiraron a cautividad y otro con una infección latente que se liberó de nuevo). Todos los animales, mayoritariamente machos, procedían del núcleo más denso de la población de lince en Doñana. El origen de la infección fue probablemente a partir del contacto con gatos domésticos infectados (Meli et al., 2009; López et al., 2009). La infección por FeLV no es novedosa en el lince ibérico, tanto en Doñana como en Sierra Morena (Luaces et al., 2008; Meli et al., 2009) pero antes del 2007 no se había detectado la enfermedad en la especie. Se postula que la baja variabilidad genética de la especie, especialmente en la población de Doñana (Johnson et al., 2006; Godoy, datos no publicados), explique la alta virulencia de la infección en el lince ibérico.

También en Doñana se localizó en el 2005 un ejemplar muerto por la infección por CDV (Meli et al., 2010). El 22.9% de los lince ibéricos de vida libre de Doñana y el 5% de los de Sierra Morena, analizados entre 2003 y 2008, presentaban anticuerpos al CDV, pero esta muerte fue el primer caso detectado de enfermedad. Otros carnívoros domésticos y silvestres de Doñana también presentan anticuerpos a CDV (Meli et al., 2010). Roelke et al., 2008, no detectó anticuerpos a CDV en ejemplares muestreados entre 1989 y 2000. Estos resultados sugieren que la exposición al CDV es reciente, y por tanto supone una grave amenaza a la población silvestre.

Peña et al., 2006, en 17 animales (cuatro en cautividad) muertos por distintas causas entre 1998 y 2003, y de los que se pudo realizar estudios histológicos en 15 de ellos, encontró depleción linfocítica de distinto grado e hialinosis folicular en 14. No se pudo determinar el origen de esta afectación del sistema inmunológico. Dos de los ejemplares cautivos tenían tuberculosis, pero estos animales ya habían ingresado del campo con la enfermedad avanzada. Uno de los individuos con tuberculosis presentaba además un carcinoma de células escamosas con metástasis pulmonar. Los otros dos ejemplares cautivos también presentaban carcinomas de células escamosas y uno de ellos presentaba además un carcinoma de células transicionales (neoplasia de vejiga urinaria).

Jiménez et al., 2008, en un estudio de 27 animales necropsiados (seis en cautividad), que incluye los animales del estudio de Peña et al. 2006, encontró una GNM de focal a difusa, en todos ellos. Se analizó también la sangre y la orina de 23 ejemplares, tanto de vida libre como de cautividad, y 16 de ellos presentaban valores compatibles con una enfermedad renal crónica moderada. Sin embargo, ninguno de los animales presentaba

Tabla 3. Agentes y enfermedades infecciosas del lince ibérico (*L. pardinus*) en vida libre.

	Agente infeccioso	Enfermedad	Método de diagnóstico			Referencia
			Serología	PCR	Otras	
Virus	Virus del moquillo canino (CDV)	Moquillo canino (caso)	sí	sí		Meli et al., 2010
	Herpesvirus felino (FHV)		sí	no		Roelke et al., 2008; Meli et al., 2009
	Coronavirus felino (FCoV)		sí	no		Meli et al., 2009
	Calicivirus felino (FCV)		sí	no		Roelke et al., 2008; Meli et al., 2009
	Parvovirus felino (FPV)		sí	sí		Roelke et al., 2008; Meli et al., 2009
	Virus de la leucemia felina (FeLV)	Leucemia (epidemia)			sí	
Bacterias	<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberculosis (casos)		sí	cultivo	Briones et al., 2000; Pérez et al., 2001; Aranaz et al., 2004; Peña et al., 2006; Millán et al., 2009
	<i>Leptospira spp.</i>		sí	no	cultivo	Millán et al. 2009; Jiménez et al., 2008
	<i>Mycoplasma haemofelis</i> , " <i>Ca. M. haemominutum</i> ", " <i>Ca. M. turicensis</i> "			sí		Willi et al., 2007
	<i>Bartonella hensalae</i>			sí		Meli et al., 2009
	<i>Chamydophila felis</i>			sí		Meli et al., 2009
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		sí	no		Meli et al., 2009
Parásitos	<i>Leishmania infantum</i>			sí		Sobrino et al., 2008
	<i>Cytauxzoon spp.</i>			sí		Luaces et al., 2005; Millán et al., 2007; Roelke et al., 2008; Meli et al., 2009
	<i>Toxoplasma gondii</i>		sí			Sobrino et al., 2007; Roelke et al., 2008; Millán et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010
	<i>Neospora caninum</i>		sí	no		Sobrino et al., 2008

signos clínicos. Los resultados de este trabajo concluyen que la GNM es una enfermedad progresiva y probablemente de origen inmune. Los autores postulan una posible predisposición genética hacia la enfermedad, aumentada por el alta endogamia de la especie (Johnson et al., 2006; Godoy, datos no publicados), y que posiblemente esté relacionada con una enfermedad inmunomediada sistémica.

### **3. 2. 8 Programa de conservación *in situ***

El lince ibérico es una especie protegida desde 1973 en España y 1974 en Portugal, muchas de las zonas que ocupaba y que ocupa actualmente están bajo alguna figura de protección (Parque Nacional, Parque Natural, Reserva Integral), es un icono de la conservación, una especie mediática, y se han invertido millones de euros desde organismos europeos, estatales, regionales, y organizaciones no gubernamentales para su estudio y conservación. Sólo desde proyectos europeos de conservación (proyectos LIFE) se han destinados 94 millones de euros desde 1994 hasta el 2016 (Simón et al., 2012). Sorprendentemente, a pesar de todo ello, la especie ha tenido un declive progresivo hasta una situación crítica (Guzmán et al., 2004).

Sin embargo, en los últimos años se ha producido un aumento del número de ejemplares y de su área de distribución. Así desde 2002 a 2010 el número mínimo de animales identificados por trampeo fotográfico ha aumentado desde 93 a 252, y el área de distribución ha pasado de 29300 ha a 70300 (Simón et al., 2012).

Las medidas más destacadas, por su dotación presupuestaria y continuidad, para la conservación del lince, han sido las desarrollados por tres programas LIFE consecutivos: Recuperación de las Poblaciones de Lince Ibérico en Andalucía (2002-2006), Conservación y Reintroducción del Lince Ibérico en Andalucía (2006-2011), y Recuperación de la Distribución del Lince Ibérico en España y Portugal (2011-2016) .

Los objetivos de las medidas de conservación *in situ* son:

(1) incrementar y recuperar las poblaciones de conejo

Las medidas más empleadas han sido la liberación de conejos silvestres (Moreno et al., 2004) procedentes de zonas de alta densidad y el manejo de la vegetación (Moreno & Villafuerte 2005). Normalmente los conejos antes de su liberación pasan una cuarentena y son vacunados (Calvete et al., 2004). Si bien han habido algunos éxitos a pequeña escala



(Moreno et al., 2004), todavía es necesario estudiar y desarrollar métodos para recuperar poblaciones de conejo en áreas suficientemente extensas y que así permitan mantener poblaciones de lince ibérico.

(2) mejorar la reproducción y supervivencia de las poblaciones de lince

Los acuerdos con propietarios de fincas con presencia de lince han permitido realizar una serie de medidas para mantener y aumentar las poblaciones de lince. Los aspectos más importantes que incluyen los acuerdos son el compromiso de mantener y proteger el hábitat del lince, la eliminación de trampas, la vigilancia de la finca, permitir las actuaciones de control y seguimiento del lince, la disponibilidad del terreno para efectuar las actuaciones de mejora y gestión del hábitat, y en su caso, la veda del conejo o la compra de los derechos de caza (Simon et al., 2009).

Como ya hemos comentado anteriormente, aprender cómo recuperar poblaciones de conejo en zonas amplias es todavía una meta difícil de alcanzar. Mientras tanto, una opción muy empleada para proporcionar alimento a los lince silvestres es mediante las estaciones de alimentación suplementaria (Simón et al., 2009). Consisten en un sencillo recinto abierto por encima, normalmente de 2x2 m y con algo más de un metro de altura, lo suficiente para que los lince puedan acceder a su interior saltando, y al mismo tiempo evite la entrada de otros carnívoros. En las estaciones se colocan conejos domésticos. Sólo en Doñana, todos los lince en territorios donde hay estaciones los emplean (López-Bao et al., 2008). Sin embargo, las estaciones plantean una serie de potenciales efectos en los lince respecto al uso del territorio, la dispersión de jóvenes, modificación de las técnicas de caza, así como el aumento de interacciones entre los ejemplares y por tanto el riesgo de transmisión de agentes infecciosos (Ferrerías et al., 2010).

(3) aumentar el área ocupada por la especie por recolonización natural de los territorios limítrofes al área de distribución actual, y crear nuevas poblaciones mediante reintroducciones

La selección de áreas potenciales para la reintroducción del lince se basa en que cumplan una serie de requisitos (IUCN 1998). Tres de las premisas más importantes en el caso del lince es que estén próximas a zonas de distribución actual de la especie, que tengan un hábitat adecuado, y que mantengan buenas poblaciones de conejos. Finalmente se seleccionaron dos áreas (Guadalmellato en Córdoba y Guarrizas en Jaén) próximas a la

población de lince de Sierra Morena. Desde finales del 2009 hasta Junio del 2012 se han liberado 18 ejemplares en Guadalmellato y 14 en Guarrizas (CMA, 2012). Los animales proceden tanto de las poblaciones silvestres de Sierra Morena como de la cría en cautividad, y se han empleado métodos de suelta dura (liberación directa) y de suelta blanda (aclimatación en cercados durante un determinado tiempo antes de su liberación). Los ejemplares antes de su liberación reciben evaluación veterinaria (Ballou 1993; Woodford 2001; Ryser-Degiorgis, et al., 2009). A pesar de las inevitables bajas, se han establecido territorios de hembras reproductoras, se han registrado partos (Fig. 2), y se ha constatado el movimiento de ejemplares entre las zonas de reintroducción y la población remanente de Sierra Morena.

### (3) contrarrestar los efectos de la pérdida de diversidad genética

En Doñana, debido a la pérdida de machos por la epizootia de FeLV en el 2007, se inició un programa de reforzamiento genético mediante la liberación de ejemplares de la población de Sierra Morena. Hasta junio del 2012 se han liberado cuatro machos y se ha constatado la producción de cachorros por el emparejamiento de la población receptora con los animales translocados (Life Lince).



Fig. 2. Hembra de lince ibérico (izquierda) con sus cuatro cachorros en la naturaleza en la primavera del 2012. La hembra nació en cautividad y fue liberada en una de las zonas de reintroducción en el 2010. (Foto: Life Lince).

### **3. 2. 9 Programa de conservación *ex situ***

#### **3. 2. 9. 1 Creación**

La situación crítica del lince ibérico impulsó que el entonces Ministerio de Medio Ambiente de España (MIMAM) elaborara la Estrategia Nacional para la Conservación del Lince Ibérico en España (MIMAM 1999). Algunos de los documentos que sirvieron de base para la elaboración de la Estrategia incluyeron el Plan de Acción para el Lince Ibérico en Europa (Consejo de Europa/WWF 1999) y el PHVA del lince ibérico (IUCN/MIMAM 1999). Estos tres documentos contemplaban la cría en cautividad como una herramienta de apoyo a la recuperación del lince ibérico.

En respuesta a las recomendaciones contenidas en la Estrategia y al PHVA, el MIMAM promovió la elaboración de un Plan de Acción para la Cría en Cautividad del Lince Ibérico y que fue aprobado en el 2001.

El Plan de Acción proponía un programa de cría a pequeña escala y el desarrollo de técnicas de reintroducción. Los lincees en cautividad se manejarían como una metapoblación, permitiendo el intercambio de individuos entre centros de cría para el manejo genético y demográfico de la población cautiva. Entre las actuaciones contenidas en el Plan se encontraban, (1) el desarrollo de técnicas de cría natural y de cría artificial, (2) la creación de un banco de recursos biológicos, (3) el estudio de los riesgos sanitarios asociados a todo el conjunto del programa de cría, y (4) la evaluación de la eficacia de programas de reintroducción a partir de animales cautivos y de animales silvestres (Vargas et al., 2008).

Ya en el 1992, el MIMAM disponía de un Centro Experimental de Cría de Lince Ibérico, en la finca de El Acebuche, dentro del Parque Nacional de Doñana. Hasta el 2003 el centro llegó a albergar un total de 7 hembras y 2 machos, pero no hubo reproducción de la especie. La diferencia de criterios y actuaciones entre el MIMAM y la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (la única comunidad autónoma que seguía teniendo lincees en su territorio) no hacían posible un marco de trabajo para desarrollar el programa de cría del lince ibérico. Para procurar desbloquear la situación, se firmó en Junio de 2003 el “Convenio de Colaboración entre el Ministerio de Medio Ambiente y la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía para el desarrollo de un único programa coordinado de actuaciones para la aplicación de la Estrategia Nacional a la Conservación del Lince en Andalucía”. Bajo esta re-estructuración organizativa del

programa de conservación del lince ibérico, se aceleró el desarrollo del Plan de Cría en Cautividad (Vargas et al., 2008).

### **3. 2. 9. 2 Objetivos**

- (1) Mantener una población cautiva con la máxima variabilidad genética de la especie en libertad
- (2) Producir ejemplares sanos y óptimos, desde un punto de vista genético y comportamental, para su reintroducción en la naturaleza.

### **3. 2. 9. 3 Organización**

El programa de conservación *ex situ* del lince ibérico se integra en la Estrategia Nacional. Por tanto la cría en cautividad y la conservación *in situ* se coordinan en un esfuerzo común. El programa de conservación *ex situ* tiene una dirección científico/técnica de carácter ejecutivo y un comité asesor multidisciplinar, el Comité de Cría del Lince Ibérico (CCLI). El CCLI es el órgano de planificación del programa *ex situ* y el que impulsa el desarrollo del Plan de Acción. El CCLI se vertebra a través de grupos de trabajo en diferentes áreas como genética y manejo demográfico, manejo en cautividad, reproducción, aspectos sanitarios, etología, y conservación *in situ*. La función de cada grupo es desarrollar los objetivos, y las acciones que se desprenden de ellas, contenidas en el Plan de Acción. Distintas instituciones, como zoológicos, centros de investigación, universidades, y otros grupos de trabajo colaboran con el CCLI (Vargas et al., 2009).

El programa de cría funciona de moda similar a los programas de cría EEP o SSP. Así el CCLI, entre otras tareas, establece los emparejamientos de los ejemplares, y en su caso el movimiento de reproductores entre los centros.

### **3. 2. 9. 4 Manejo genético y demográfico**

Para mantener la máxima variabilidad genética, y evitar los riesgos de la endogamia primero fue necesario evaluar la información genética de la especie, y así decidir el escenario de manejo genético del programa. Los censos del 2003 arrojaban un máximo de 200 individuos (Guzmán et al., 2004), y una baja variabilidad genética (Johnson et al., 2006; Godoy, datos no publicados). El objetivo ideal hubiera sido poder mantener el 90% de la variabilidad genética de la especie en un periodo de 100 años. Ese escenario hubiera requerido la incorporación anual de un alto número de fundadores, y llegar a alcanzar una

población reproductora de 500 individuos. Sin embargo, el bajo número de ejemplares en la naturaleza, y las limitaciones de espacio y recursos hacían inviable este escenario. El escenario más realista para el lince ibérico, elaborado mediante el programa informático *Population Management 2000* (Pollack et al., 2002) fue el de conservar un 85% de su variabilidad genética en un periodo de 30 años, y mantener una población cautiva reproductora de 60 animales (30 machos y 30 hembras) (Lacy & Vargas 2004). Se estableció una hoja de ruta para alcanzar este objetivo que incluía la captura de 4 individuos anualmente de las poblaciones silvestres durante los primeros 5 años, así como la incorporación cada 2 años y a lo largo de todo el tiempo, de un ejemplar extra, como animales que habían ingresado en un centro de recuperación, y que pasarían al Programa en vez de liberarse de nuevo a la naturaleza. Cuando se alcanzara el número de 60 reproductores (se estimaba que para el año 2010), se podría empezar a emplear animales nacidos para su reintroducción; inicialmente a razón de 5-8 individuos anualmente durante los primeros 3 años, y después a razón de unos 12-13 individuos anualmente (Lacy & Vargas 2004).

### **3. 2. 9. 5 Manejo de los animales**

Afortunadamente existía abundante información y experiencia sobre el manejo en cautividad de felinos silvestres y de otras especies de lince en particular, en forma de guías de manejo realizados por la AZA y las EAZA, que ha podido aplicarse al lince ibérico (Mellen 1997; Shoemaker et al 1997; Krelekamp 2004). El manejo debía orientarse a mantener las conductas naturales de la especie (caza, interacciones sociales, territorialidad, etc.) en unas instalaciones lo más parecidas posible a su hábitat y minimizando el estrés para favorecer la reproducción. Los animales se monitorizan por videovigilancia y así también se puede obtener información de su comportamiento (Vargas et al., 2009).

### **3. 2. 9. 6 Situación del programa**

La población de lince del programa ha ido aumentando anualmente, tanto por la incorporación de animales capturados de la naturaleza como por los nacidos en cautividad. En el 2005 nacieron los primeros cachorros, y a finales del 2009 se iniciaron las primeras liberaciones con ejemplares nacidos en cautividad. La población de lince alcanzó los 47:50 individuos (32:33  $\geq$  de 2 años o potencialmente reproductores) en el 2011, y este crecimiento del programa ha seguido la evolución que marcó el PM2000 en el 2003

(Figura 3). El programa cuenta actualmente con cuatro centros de cría (El Acebuche-Huelva, La Olivilla-Jaén, Granadilla-Cáceres, Silves-Portugal) y un zoológico (Zoo Botánico de Jerez-Cádiz).

En estos primeros años de desarrollo del programa de conservación *ex situ* se ha obtenido abundante información y experiencia en aspectos sanitarios y reproductores de una especie muy amenazada. Toda esa información es aplicable al manejo de la especie tanto en cautividad como en vida libre, así como a otras especies de felinos.

El establecimiento de un programa sanitario en el lince ibérico con protocolos de trabajo y diagnóstico ha permitido determinar qué enfermedades han afectado a la población cautiva. El disponer de ejemplares cautivos en situaciones controladas también está permitiendo conocer la biología reproductora de la especie, y que como ya hemos visto presenta ciertas particularidades. Seguidamente expondremos de forma resumida las enfermedades más relevantes descritas en otras especies de felinos silvestres en cautividad, así como su biología reproductiva.

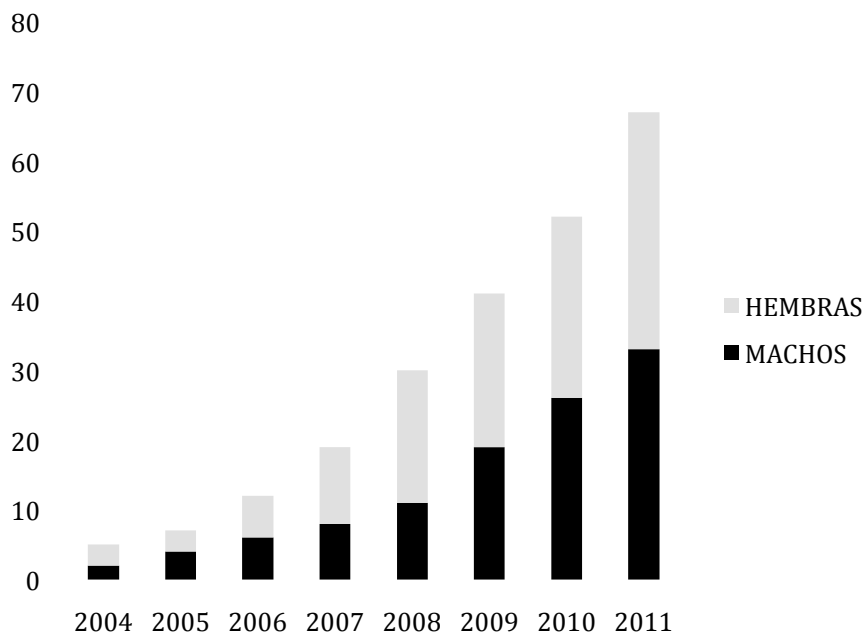


Fig. 3 Evolución de la población de lince en el Programa de Conservación *ex situ* de lince ibérico.

### **3. 3 Enfermedades de felinos silvestres en cautividad**

Los felinos silvestres mantenidos en cautividad pueden verse afectados por un amplio número de enfermedades infecciosas y no infecciosas. Su alojamiento en cautividad, con otros congéneres o la posibilidad de contacto con otras especies, hace que las enfermedades infecciosas suelen tener una mayor incidencia. En cautividad suele haber una alta densidad de animales, está más limitado el que desarrollen sus conductas naturales, y el confinamiento y la interacción con humanos puede provocar un estrés crónico que afectan a la salud de la población (Munson, et al., 2010). Así mismo, ya que en cautividad suele aumentar la esperanza de vida de los animales, se pueden desarrollar enfermedades crónicas y degenerativas.

De todo ello se desprende que la monitorización del estado sanitario de las poblaciones cautivas, la detección y control de enfermedades, son elementos clave de los programas de cría. Existen diversos ejemplos de enfermedades en programas de cría que han supuesto un gran impacto en la población y en el consiguiente manejo de la misma, como la peritonitis infecciosa felina (Everman et al.,1988) y la glomeruloesclerosis (Bolton & Munson 1999) en el guepardo, o la toxoplasmosis en el gato de Pallas (Swanson 1999), y que explicaremos más adelante.

En la tabla nº 4 se detallan las enfermedades reportadas de felinos silvestres en cautividad. A continuación sólo comentaremos las enfermedades más relevantes. No se han incluido los agentes infecciosos y enfermedades detectadas en el lince ibérico en cautividad ya que constituyen parte de un capítulo de este trabajo. Tampoco es objetivo de esta revisión abordar los numerosos estudios de seroprevalencia de agentes infecciosos en felinos silvestres en cautividad

#### **3. 3. 1 Enfermedades infecciosas**

##### **3. 3. 1. 1 Bacterianas y fúngicas**

*Helicobacter* sp. es una bacteria espiral que comúnmente se aísla en el estómago de felinos tanto en vida libre como en cautividad (Kinsel et al., 1998). *Helicobacter* suele ser un hallazgo accidental, si bien se han descrito en muchas especies de felinos algunos casos individuales de gastritis por *Helicobacter* (Schroder et al., 1998). Sin embargo, en el guepardo, alrededor de un 95% de los ejemplares en cautividad están afectados por gastritis linfoplasmocitarias de distinta gravedad (Eaton et al., 1993; Munson et al., 1993).

Los animales afectados muestran desde pérdida de peso a regurgitación y vómito crónico. Los guepardos con gastritis además suelen desarrollar amiloidosis secundarias con afectación renal (Papendick et al., 1997). Aunque se han utilizado distintos tratamientos contra las gastritis por *Helicobacter*, a corto plazo parcialmente efectivos, a largo plazo no evitan la progresión de la enfermedad (Citino & Munson 2005). Los tipos de *Helicobacter* encontrados en los guepardos de vida libre y en los cautivos son similares, sin embargo, los guepardos de vida libre raramente desarrollan la enfermedad, salvo cuando se mantienen en cautividad (Terio et al., 2005). Parece por tanto que el *Helicobacter* por sí mismo no desarrolla la enfermedad y que tienen que existir otros factores, probablemente el propio estrés de la cautividad, implicados en el desarrollo de la enfermedad (Terio et al., 2005).

Clyde et al., 1997, en un estudio de felinos en cautividad, aisló *Salmonella* spp. (normalmente *S. typhimurium*) en las heces del 90% de los ejemplares. La fuente de infección parecía ser la dieta contaminada. Aunque se encontraron algunos casos de diarrea, la mayoría de los animales eran asintomáticos. Otros trabajos señalan la infección por *Salmonella* como causa de muerte aguda en otros felinos, como guepardos en cautividad (Meltzer 1999).

La tuberculosis se ha descrito en felinos en vida libre (Keet et al., 1996; Keet et al., 2005; Michel et al., 2006) y más esporádicamente en cautividad (Helman et al., 1998; Lantos et al., 2003). La vía de infección principal es la inhalación de *Mycobacterium bovis* cuando están ingiriendo animales infectados, normalmente ungulados. Los animales afectados se adelgazan, llegando a la caquexia, y suelen presentar granulomas en ganglios linfáticos y pulmones.

La criptococosis, causada por el hongo *Cryptococcus neoformans*, es una enfermedad cutánea y sistémica que puede afectar a distintas especies felinos, si bien en guepardos es donde hay mayor número de casos descritos (Berry et al., 1997; Bolton et al., 1999; Meltzer 1999, Millward & Williams 2005). Los guepardos de estos estudios, si bien presentan serologías negativas a virus inmunosupresores (FIV y FeLV), se sospecha que puedan padecer algún tipo de disfunción del sistema inmunitario que intervenga en la patogenia de la enfermedad.

Las dermatofitosis, por *Microsporum*, han sido descritas en felinos silvestres en cautividad y vida libre (Rotsein 1999; Meltzer 1999). Las lesiones van desde alopecias focales hasta



alopecias más extensas con excoriaciones, úlceras, y piodermas. En la mayoría de los casos las lesiones son autolimitantes, si bien otros animales necesitan tratamiento.

### 3.3.1.2 Víricas

El virus del moquillo canino ha causado devastadoras epizootias en varias especies de carnívoros amenazados (Williams et al., 1988; Alexander & Appel 1994). En 1994 el CDV produjo la muerte del 30% de la población de leones en el Serengueti (Roelke-Parker et al., 1996). El aislamiento y caracterización del virus causante de esta epizootia, sugería que se trataba de una nueva cepa de CDV que podía cruzar la barrera de especie y que seguía siendo patogénico en cánidos; el origen del virus parecía encontrarse en los perros domésticos provenientes de los asentamientos humanos de la zona (Carpenter et al., 1998). Es interesante indicar, que los estudios serológicos realizados después del 1994 en la población de leones del Serengueti, constatan que si bien se produjeron otros eventos de infección por CDV no se había registrado una mortalidad significativa. Los eventos de mortalidad por CDV están asociados a infecciones concomitantes y elevadas por *Babesia* spp., y que éstas están relacionadas con ciertas condiciones climáticas y ambientales que favorecen la propagación de garrapatas, el vector intermediario; por tanto parece que la infección por CDV por sí sola no tendría un impacto relevante en las poblaciones salvo que existieran otras circunstancias que favorecieran a otros copatógenos (Munson et al., 2008). Además, CDV también ha afectado a otros felinos de vida libre (McBurney et al., 1998; Munson et al., 2001; Daoust et al., 2009; Quigley et al., 2010) y en cautividad (Fix et al., 1989; Appel et al., 1994; Nagao 2012).

El FHV causa un cuadro de enfermedad especialmente severa en poblaciones cautivas de gatos de Pallas (Ketz-Riley et al., 2003) y en guepardos (Junge et al., 1991). La enfermedad en los gatos de Pallas está asociada a la vacunación reciente con vacunas de virus vivos modificados (Kennedy-Stoskopf 2005). En los guepardos afectados si bien la forma de presentación más común es la de un cuadro respiratorio, algunos animales desarrollan dermatitis proliferativas alrededor de ojos y boca. En los guepardos, la vacunación contra herpesvirus no protege contra la enfermedad, probablemente por una pobre respuesta inmune.

La infección por coronavirus felino (FCoV) es frecuente en felinos y puede causar cuadros de enteritis moderada, colitis ulcerativa crónica y más raramente peritonitis infecciosa

Tabla 4. Enfermedades infecciosas relevantes en felinos silvestres en cautividad (no se incluye *L. pardinus*).

Enfermedad	Agente infeccioso	Especie	Referencia
Víricas			
Moquillo canino	Virus del moquillo canino (CDV)	<i>P. tigris</i> , <i>P. leo</i> , <i>P. pardus</i> , <i>P. onca</i> , <i>U. uncia</i>	Appel et al., 1994; Fix et al., 1989; Nagao et al., 2012
Herpesvirosis felina	Herpesvirus felino (FHV)	<i>A. jubatus</i> , <i>O. manul</i>	Junge et al., 1991; van Vuuren et al. 1999; Ket-Riley et al., 2003, Munson et al., 2004
Peritonitis infecciosa felina	Coronavirus felino (FCoV)	<i>A. jubatus</i>	Van Rensburg & Silkstone 1984; Evermann et al., 1988; Munson et al., 1993; Kennedy et al., 2002; Evermann & Benfield 2001
Conjuntivitis, queratitis o rinitis caliciviral	Calicivirus felino (FCV)	<i>P. leo</i> , <i>A. jubatus</i> , <i>P. tigris altaica</i>	Kadoi et al., 1997; Munson & Citino 2005; Harrison et al., 2007
Panleucopenia felina	Parvovirus felino (FPV)	<i>P. leo</i> , <i>P. tigris</i> , <i>U. uncia</i> , <i>F. silvestris</i> , <i>L. lynx</i> , <i>A. jubatus</i>	Fix et al., 1989; Valicek et al., 1993; Mochizuki et al., 1996; Wasieri et al., 2009; Duarte et al., 2009.
Papilomas	Papilomavirus felinos	<i>P. leo persicus</i> , <i>U. uncia</i> , <i>N. nebulosa</i>	Sundberg et al., 1996; Sundberg et al., 2000; Ott-Joslin et al., 2001.
Inmunodeficiencia	Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)	<i>P. leo</i>	Poli et al., 1995
Leucemia	Virus de la leucemia felina (FeLV)	<i>L. rufus</i> , <i>A. jubatus</i>	Sleeman et al., 2001; Marker et al., 2003
Influenza	H5N1	<i>N. nebulosa</i> , <i>P. pardus</i> , <i>P. tigris</i>	Keawcharoen et al., 2004; Thanawonguwech et al., 2005; Desvaux et al., 2009

Tabla 4. Continuación

Enfermedad	Agente infeccioso	Especie	Referencia
<b>Bacterianas</b>			
Tuberculosis	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>P. tigris altaica, P. uncia</i>	Helman et al., 1998; Lantos et al., 2003
Antrax	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>P. leo, A. jubatus</i>	Jager et al., 1990
Gastritis por <i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter sp.</i>	<i>A. jubatus, P. tigris</i>	Eaton et al., 1993; Munson et al., 1993; Kinsel et al., 1998; Schroder et al., 1998; Terio et al., 2005
Salmonelosis	<i>Salmonella sp.</i>	<i>A. jubatus, L. lynx</i>	Macri et al., 1997; Meltzer 1999
Criptococosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>A. jubatus</i>	Berry et al., 1997; Bolton et al., 1999; Millward & Williams 2005; Meltzer 1999
Dermatomicosis	<i>Microsporum canis</i>	<i>A. jubatus</i>	Rotsein et al., 1999; Meltzer 1999; Wack et al., 1992; Sykes et al., 2007
<b>Parasitarias</b>			
Sarna notoédrica	<i>Notoedres cati</i>	<i>A. jubatus, U. uncia</i>	Fletcher 1978; Meltzer 1999
Sarna demodéica	<i>Demodex spp.</i>	<i>A. jubatus</i>	Meltzer 1999
Cytauzoonosis	<i>Cytauzoon spp.</i>	<i>P. leo, P. tigris</i>	Garner et al., 1996; Peixoto et al., 2007
Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>O. manul, F. margarita, A. jubatus</i>	Van Rensburg & Silkstone 1984; Swanson et al., 1999; Kenny et al., 2002; Dubey et al., 2010

felina (FIP) (Kennedy et al., 2002). Las diferentes formas de presentación de la enfermedad están

asociadas, respectivamente, con diferencias en los biotipos virales del coronavirus entérico felino (FECV) y el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV). Aunque la FIP se ha descrito en distintas especies de felinos, los guepardos en cautividad parecen especialmente sensibles a la enfermedad (Evermann et al., 1988; Munson 1993).

Los parvovirus, tanto caninos como felinos, pueden afectar a los felinos silvestres. El parvovirus felino (FPV/panleucopenia) causa una enfermedad similar a la de los gatos domésticos, y se ha descrito en felinos silvestres en cautividad (Fix et al., 1989; Valicek et al., 1993; Mochizuki et al., 1996; Wasieri et al., 2009) y en vida libre (Stahl & Vandell, 1999; Schmidt-Posthaus et al., 2002). El parvovirus canino se ha descrito en casos de enteritis necrotizante con necrosis de las criptas en guepardos y en un tigre siberiano con diarrea. Algunos de los guepardos afectados habían sido vacunados para el parvovirus felino, lo que sugiere que las vacunas FPV no confieren inmunidad (Steinel et al., 2000).

A diferencia de otros virus felinos, hay pocos trabajos publicados de infección o exposición al FeLV en felinos silvestres en libertad (Daniels et al., 1999; Cunningham et al., 2008) o en cautividad (Sleeman et al., 2001).

### **3. 3. 1. 3 Parasitarias**

Las infecciones por *Sarcoptes scabiei* y *Notoedres* spp. se han descrito en varias especies de felinos silvestres en vida libre (Mwanzia et al., 1995; Ryser-Degiorgis et al., 2002; Schmidt-Posthaus et al., 2002) y cautividad (Meltzer 1999).

Los hemoparásitos son frecuentes en felinos silvestres en vida libre y son normalmente hallazgos accidentales (Willi et al., 2007). Los felinos en cautividad en climas cálidos son también susceptibles a la infección. Los piroplásmidos incluyen *Babesia* spp., *Theileria* spp., y *Cytauxzoon* spp., y han sido descritos en una amplia variedad de felinos. La enfermedad primaria por hemoparásitos en felinos silvestres es rara, con algún caso descrito de cytauxzoonosis mortal (Nietfeld & Pollock 2002).

*Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario que infecta a una amplia variedad de especies, incluyendo felinos silvestres en vida libre y cautividad, pero difícilmente causa enfermedad. Sin embargo, el gato Pallas en cautividad es especialmente susceptible a la infección,

causante de una alta mortalidad neonatal (Swanson 1999; Kenny et al., 2002). No se conoce la causa de esta particular susceptibilidad, aunque se sugiere que pueda deberse a que la especie no ha co-evolucionado con el parásito (Brown et al., 2005) o a que presenta deficiencias inmunitarias (Ketz-Riley et al., 2003).

### **3. 3. 2 Enfermedades no infecciosas**

En la tabla 5 se exponen las enfermedades no infecciosas más relevantes en felinos silvestres en cautividad.

La enfermedad renal crónica es muy común en felinos de edad avanzada en cautividad. En muchas especies se desconoce la causa de la enfermedad renal crónica, aunque sí que hay ciertas enfermedades renales con etiología conocida. Así la infección por *Leptospira* causa nefritis intersticial en pumas. Otra enfermedad renal primaria de la que se conoce su patogénesis es la glomeruloesclerosis en guepardos cautivos (Bolton & Munson 1999); la enfermedad tiene una alta prevalencia en la especie. Por el contrario, es poco frecuente en los guepardos en vida libre (Munson et al., 2005b). Aunque no se conoce su causa en cautividad, se sospecha que pueda deberse o a la dieta o a cambios metabólicos (hiperglicemia) asociados a un estrés crónico. Otra enfermedad, como la amiloidosis renal es común en los gatos de patas negras en cautividad (Terio et al., 2008).

Dentro de las enfermedades degenerativas, la espondilosis vertebral es común en grandes felinos de avanzada edad (Kolmstetter et al., 2000).

Hay una amplia variedad de enfermedades neoplásicas descritas en felinos silvestres incluyendo linfomas, tumores biliares, adenocarcinomas gastrointestinales, carcinomas pulmonares broncoalveolares y leiomiomas. Estas neoplasias normalmente se encuentran en animales en cautividad, ya que tienen una mayor esperanza de vida. Los tumores biliares son más frecuentes en grandes felinos (Pettan-Brewer & Lowestine 1999). También son frecuentes los leiomiomas ováricos y uterinos (Chassey et al., 2002).

Los gatos pescadores en cautividad tienen una alta prevalencia de carcinomas de células transicionales (Sutherland-Smith et al., 2004). Aunque no se conoce la causa, se postula que podría deberse a bajos niveles de vitamina E (Landolfi & Terio 2006).

Los jaguares presentan una alta prevalencia de cistoadenocarcinomas ováricos, un tipo de neoplasia ovárica poco habitual en otros felinos (Kazensky et al., 1998; Hope & Deem 2006).

Tabla 5. Enfermedades no infecciosas relevantes en felinos silvestres en cautividad. No se incluye *L. pardinus*

Enfermedades degenerativas		
Glomeruloesclerosis	<i>A. jubatus</i>	Bolton & Munson 1999; Munson et al., 2005
Amiloidosis renal	<i>F. nigripes</i>	Terio et al., 2008
Enfermedad degenerativa espinal	<i>P. leo, P. tigris, P. pardus</i>	Kolmstetter et al., 2000
Telangiectasia	varias spp.	Pettan-Brewer & Lowenstine 1999
Quistes biliares	varias spp; <i>P. leo</i>	Pettan-Brewer & Lowenstine 1999; Yu et al., 2007
Enfermedad venooclusiva	<i>A. jubatus, P. pardus, P. leo, P. tigris, A. jubatus</i>	Munson et al., 1993; Pettan-Brewer & Lowenstine 1999
Neoplasias		
Hepatobiliares	<i>P. leo, P. tigris, P. pardus, L. wiedii, P. onca</i>	Pettan-Brewer & Lowenstine 1999; Sakai et al., 2003; Hope & Deem 2006; Owston et al., 2008
Hemolinfáticas	<i>P. leo, L. rufus, P. tigris, A. jubatus</i>	Poli et al., 1995; Harrison et al., 2007; Owston et al., 2008
Sistema digestivo	<i>P. leo, P. onca, A. jubatus</i>	Owston et al., 2008
Sistema reproductor	<i>P. leo, P. pardus, P. tigris, P. onca, U. uncia</i>	Chassey et al., 2002; Hope & Deem 2006; Owston et al., 2008
Glándula mamaria	<i>F. chaus, F. concolor, P. onca, P. pardus, P. leo, P. tigris</i>	Harrenstein et al., 1996; Hope et al., 2006; Cagnini et al., 2012
Piel	<i>U. uncia, P. tigris</i>	Ott Joslin et al., 2002; Owston et al., 2008
Endocrino	<i>P. pardus, P. tigris, U. uncia, P. concolor</i>	Owston et al., 2008
Urinario (vejiga urinaria)	<i>P. viverrinus</i>	Sutherland-Smith et al., 2004; Landolfi et al., 2006
Cistoadenocarcinomas	<i>P. onca</i>	Munson et al., 1994; Kazensky et al., 1998; Hope & Deem 2008

### 3. 4 Biología reproductiva de felinos silvestres en cautividad

La disminución de la mayoría de especies y subespecies de felinos plantea la necesidad de programas de conservación *ex situ*. Sin embargo, con la excepción de unas pocas especies (como algunas del género *Panthera*) la mayoría de felinos silvestres no se reproducen bien en cautividad, e incluso pueden tener comportamientos aberrantes (p.ej., los machos de pantera nebulosa en cautividad pueden matar a las hembras, incluso estando en celo (Kitchener 1999)).

La posibilidad de monitorizar la actividad reproductiva mediante la determinación de hormonas es clave para diseñar estos programas de cría. Gracias al desarrollo de la monitorización no invasiva de hormonas en heces se está conociendo la gran variabilidad que existe entre los ciclos estrales en las distintas especies (Brown 2006).

Así por ejemplo, si bien todos los felinos tienen ovulaciones inducidas, también varía su presentación entre especies e incluso entre individuos. Por ejemplo, las panteras nebulosas, los gatos pescadores, los margays, y los gatos domésticos presentan, al menos de forma ocasional, ovulaciones espontáneas, mientras que o son raras o no se dan en las cuatro especies de lince, en los guepardos, tigres, leopardos de las nieves, y ocelotes (Brown 2006; Göritz et al., 2009).

También existen marcadas diferencias en cómo la estacionalidad influye en la función reproductiva. Así hay desde especies altamente sensibles como los gatos de Pallas, que sólo ciclan durante dos meses al año, a otras que prácticamente no se ven afectadas, como ocelotes, tigrillos (*Leopardus tigrinus*), margays, leones, leopardos o gatos pescadores (Brown 2006).

Además del fotoperiodo, otros factores afectan a la capacidad reproductiva de felinos silvestres en cautividad, que van desde el emplazamiento de los animales, los emparejamientos, la alimentación, o las enfermedades. Así por ejemplo en algunas especies se dan ovulaciones espontáneas cuando se alojan a las hembras juntas, mientras que en otras especies éstas ovulan incluso estando solas. Otra consecuencia de cómo se alojan a los animales sobre la función reproductiva es lo observado en hembras de guepardo: cuando se mantienen dos hembras juntas en la misma instalación se produce una supresión reproductiva mutua y dejan de ciclar; si se separan, vuelven a ciclar, incluso aunque existan otras hembras en instalaciones contiguas (Wielebnowski et al., 2002).

Como ya comentamos, normalmente los emparejamientos en los programas de cría se deciden en base a criterios genéticos. Sin embargo, algunos estudios demuestran que también deberían

considerarse las preferencias de los individuos al seleccionar su pareja, ya que así se aumenta la eficiencia reproductiva (Martin & Shepherdson 2012).

La calidad de la alimentación y/o el aporte de suplementos vitamínicos tienen una gran influencia, no sólo en la salud general sino también en la reproducción. Swanson et al., 2003, estudiando 185 machos de 8 especies diferentes de felinos, alojados en 44 zoológicos de Latinoamérica, y con una dieta deficiente y desequilibrada, encontró que el 20% de los ejemplares nunca se habían reproducido en cautividad, y que menos del 30% tenían un espermatozoides óptimo. En otros trabajos, con distintas especies de felinos en zoológicos de varios países, la suplementación con vitaminas y minerales en dietas desequilibradas, mejoró la calidad del espermatozoides (disminución de formas anormales, aumento de la motilidad, aumento de la concentración) (Morais et al. 2002; Paz et al., 2006).

Aunque siempre que sea posible es preferible que los animales se reproduzcan de forma natural, la necesidad de manejo genético hace necesario el desarrollo e implementación de técnicas de reproducción asistida.

### **3. 4. 1 Técnicas de reproducción asistida**

La inseminación artificial (AI), la fertilización *in vitro* (IVF), y la transferencia embrionaria (ET) son técnicas de reproducción asistida que ya se emplean o que están en fase de estudio en varias especies de felinos silvestres. Son valiosas herramientas en programas de cría ya que tienen el potencial de evitar el traslado de reproductores entre centros de cría distantes -con la consiguiente complejidad logística y estrés de los animales-, asegurar la reproducción de individuos genéticamente valiosos, y aumentar la fertilidad (Wildt et al., 2010). Sin embargo, son técnicas que requieren un buen conocimiento de la biología reproductora de la especie, equipos sofisticados, y una considerable experiencia (Pukazhenthil et al., 2006; Swanson 2006; Howard & Wildt 2009). Por ejemplo, para realizar inseminación artificial en un felino, que es la más sencilla de las tres técnicas, se requiere conocer el ciclo reproductivo de la hembra, el tipo de ovulación (inducida o espontánea), hacer un tratamiento para provocar la ovulación, la obtención y procesamiento del semen, y depositarlo en el interior de la parte craneal de un útero mediante laparoscopia (Wildt et al., 2010). Precisamente uno de los grandes retos actuales para realizar IA es resolver la alta variabilidad de respuesta a los tratamientos de inducción de la ovulación (Brown 2011).



Aunque todavía y salvo excepciones, el papel de las técnicas de reproducción asistida para manejar poblaciones de felinos sigue siendo teórico, se está investigando mucho, y ya hay resultados esperanzadores. Así, por ejemplo, con la AI se ha conseguido producir cachorros de gato leopardo, ocelote, tigrino, pantera nebulosa, leopardo de las nieves, puma, tigre y guepardo (Howard & Wildt 2009; Wildt et al., 2010). Además mediante IVF-ET se ha conseguido obtener cachorros de tigre, ocelote, caracal, gato pescador, serval, y gato silvestre africano (Pope et al. 2006; Swanson 2006).



## **4. OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS**

1. Presentar la organización y desarrollo del programa sanitario aplicado en el lince ibérico (*Lynx pardinus*).
2. Analizar los signos clínicos, morbilidad y mortalidad de los ejemplares de lince ibérico en el programa de conservación *ex situ*.
3. Describir los parámetros reproductivos del lince ibérico en cautividad y discutir si están relacionados con la edad, origen (cautividad o vida libre) o procedencia (Doñana o Sierra Morena) de los ejemplares.
4. Realizar, a partir de la información obtenida, recomendaciones de manejo e investigación de la especie en cautividad.



## **5. CAPÍTULOS**





## **5. 1. CAPÍTULO**

### **INTEGRATING HEALTH ISSUES INTO THE CONSERVATION OF THE IBERIAN LYNX (*Lynx pardinus*)**

Based on: Martínez, F., López, G., Pérez, M.J., Molina, I., Aguilar, J.M., Quevedo, M.A., Vargas, A., 2009. Health aspects integration in the Iberian lynx conservation, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 167-182.



## **INTEGRATING HEALTH ISSUES INTO THE CONSERVATION OF THE IBERIAN LYNX (*Lynx pardinus*)**

Fernando Martínez, Guillermo López, Josep Pastor, Irene Zorrilla, Álvaro Muñoz, Ignacio García, Laura Peña, M<sup>a</sup> Ángeles Jiménez, María José Pérez, Isabel Molina, José María Aguilar, Miguel Ángel Quevedo, Marina L. Meli, Hans Lutz and Astrid Vargas

From Programa de Conservación *Ex situ* del Lince Ibérico, Centro de Cría de Lince Ibérico El Acebuche, Espacio Natural de Doñana, Matalascañas, 21760-Huelva, España (Martínez, Vargas)

From Junta de Andalucía/Egmasa. Proyecto de Conservación *In situ* del Lince Ibérico. C/ Pepe Espaliú, 2, 14004-Córdoba, España (López, Molina)

From the Departamento de Medicina y Cirugía Animal (Anatomía Patológica), Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, Avenida de la Coruña, S/N, 28040-Madrid (Peña, Jiménez)

From the Servicio de Hematología Clínica y Servicio de Ecopatología, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, España (Pastor)

From the Synergia, sostenibilidad y energía. C/ Marqués 3-5<sup>o</sup> Izq., 29005 Málaga, España (Muñoz)

From the Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB&IRTA, Campus de la Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, España (García)

From the CMA-Junta de Andalucía/ EGMASA. Programa de Conservación *Ex situ* de Lince Ibérico, Centro de Cría de Lince Ibérico La Olivilla, Carretera N-IV, KM 257, Santa Elena, Jaén, España (Pérez)

From the Zoobotánico de Jerez, C/ Taxdirt S/N, Jerez de la Frontera 11404, Cádiz, España (Quevedo, Aguilar).

From the Clinical Laboratory, Vetsuisse Faculty University of Zurich, Zurich, Switzerland (Lutz, Meli).

**Abstract:** Conservation actions for the endangered Iberian lynx require the integration of expertise and veterinary skills into an interdisciplinary effort. Veterinary actions are overseen by the Iberian Lynx Health Advisory Group (GAAS). These actions involve developing and implementing working protocols (manuals), anesthetizing animals, collecting samples, performing examinations and necropsies, preparing technical reports, and maintaining a biomedical database. Three hundred and eighteen captures of 126 individuals were carried out during the period between December 2003 and November 2008, 60 of them belonged to the free-ranging population. In most cases, the animals were captured with a box-trap. A combination of ketamine and medetomidine was used for chemical immobilization. It was supplemented with isoflurane when necessary. Fifty-two necropsies were performed in the same period, 38 of them on free-ranging animals, revealing road-kills as the main cause of mortality. Intensive monitoring of the free-ranging population has shown that infectious diseases (feline leukemia, tuberculosis, canine distemper, feline panleukopenia) can be a serious threat to the survival of the species. A preventive medicine program is being implemented with the captive breeding population. It includes quarantines, vaccinations, fecal analyses, fecal cultures, and regular examinations of the animals. Several clinical cases have been diagnosed and treated in this population: clostridiosis, dermatitis, chlamydiosis, enteritis with fecal impaction, tooth abscess, idiopathic chylothorax, dermatomycosis, anal sac inflammation, umbilical hernias and epilepsy have all been diagnosed and treated. Scientific knowledge generated through the various clinical procedures, tests, and monitoring programs is applied to the management and conservation of this species.

**Keywords:** Anesthesia, necropsy, preventive medicine, diseases in captivity, biomedical database

## 1. Introduction

In spite of its highly endangered status, relatively little was known about biomedical aspects of both free-ranging and captive Iberian lynx populations (Beltrán & Delibes 1991; Ferreras et al., 1994; Torres et al., 1998; Briones et al., 2000; Vicente et al., 2004). The development of a health program that allows studying biomedical aspects and evaluating the incidence, as well as prevalence of infectious pathogens and diseases, is one of the most relevant aspects that need to be taken into account when designing a long-term conservation plan for the Iberian lynx. Previous experiences in other species (Munson & Cook 1993; Deem et al., 2001; Cleaveland et al., 2002; Deem & Karesh, 2002; Deem 2007; Furtado et al., 2008) clearly show that developing such a program is fundamental and necessary. The low number of individuals in two isolated subpopulations (Simón et al., 2009; Guzmán et al., 2004) make this species extremely vulnerable to stochastic factors, such as infectious diseases, as has already been observed in the Iberian lynx (Meli et al., 2009; López et al., 2009; Meli et al., 2010), and in other threatened terrestrial carnivores (Williams et al., 1988; Alexander & Appel, 1994; Roelke-Parker et al., 1996; Cunningham et al., 2008). In addition, low genetic variability (Godoy et al., 2009) may result in a reduced immunological response to pathogens (Peña et al., 2006), or in the development of uncommon pathologies (e.g., facial neoplasms in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) (McCallum, 2008)).

In addition to health aspects, a multidisciplinary effort to integrate management, genetics and reproduction is crucial to obtain optimal individuals for reintroduction, always trying to avoid the effects of genetic adaptation to captivity (Frankham 2008).

## 2. The Iberian Lynx Health Advisory Group

The Iberian Lynx Captive Breeding Action Plan determines the objectives and actions of the *Ex situ* Conservation Program (Vargas et al., 2009). The document is developed by a Breeding Committee, and is reviewed on an annual basis. The committee consists of several working groups specialized on different disciplines, including health aspects (Vargas et al., 2009). Although the initial focus for the Health Advisory Group (*Grupo Asesor de Aspectos Sanitarios*, GAAS) was the *Ex situ* (captive breeding) Program, the natural work flow and the necessary collaboration between *In situ* (in its natural habitat) and *Ex situ* Programs has led the GAAS to also encompass the health aspects of free-ranging animals. The interdisciplinary group consists of national and international veterinarians that commit themselves to collaborating with the Program on a voluntary basis and work in such diverse, complementary and necessary aspects as research,

pathology, clinical medicine, zoo medicine and wildlife rehabilitation. The group works in close collaboration with other groups of the Breeding Committee. Its main goals include the following:

**Development and implementation of working protocols** (Iberian lynx clinical manual, Iberian lynx hand-rearing manual, Iberian lynx necropsy manual)

These protocols are considered to be living documents that are periodically revised based on experience, scientific information and program needs. The protocols standardize work processes, and aim at maximizing the information that can be obtained each time a lynx, either alive or dead, is handled. Of course, the priority in live animals is their health and well-being. The protocols are available on the *Ex situ* Conservation Program's website ([www.lynxexsitu.es](http://www.lynxexsitu.es)).

### **Anesthesia, clinical examination, and sample collection**

Procedures where anesthesia is needed include: quarantine examinations; health and reproductive examinations (Roldán et al., 2009; Göritz et al., 2009), both in animals included in the Breeding Program and in free-ranging individuals; placement of radiotelemetry or GPS collars, and clinical or diagnostic procedures. A complete and easily mobile equipment unit is available (Figure 1).



Fig 1. Material used for field anesthesia in Iberian lynx. Isoflurane vaporizer and oxygen tank are also included but not shown in this picture.

In addition to the equipment necessary at each breeding center, specific equipment to anesthetize free-ranging individuals exists both in Sierra Morena and Doñana. The duplicate gear helps to avoid the risk of transmitting infectious agents between *in situ* and *ex situ* populations. Many anesthetic events have been carried out in the field, outside clinical facilities, but the procedure and equipment used have allowed the team to perform safe chemical immobilizations, monitoring, and sample collection (Figures 2a, 2b and 2c).



Fig. 2a Anesthesia and sampling of an Iberian lynx in an enclosure at a captive breeding center. This animal had to be repeatedly immobilized due to an osteomyelitis in a digit. According to protocol, a minimum of two veterinarians have to be involved in any Iberian lynx anesthesia.



Fig. 2b Organizing anesthesia and sampling of an Iberian lynx in the field.



Fig. 2c Anesthesia on an Iberian lynx with a gastrointestinal affection in a veterinary hospital. The animal has been radiographed before conducting a gastric fibroendoscopy.

At least two veterinarians participate in any Iberian lynx anesthesia: one of them exclusively monitors the animal, while the other is in charge of the clinical examination and sample collection. Independently of the reasons for the anesthesia, biological samples are systematically collected whenever possible according to protocol (Iberian lynx clinical manual). This sample collection has several goals: diagnosis, research (Pastor et al., 2009; García et al., 2009; Meli et al., 2009; Göritz et al., 2009), genotyping (Godoy et al., 2009), and sample storage for the biological resource banks (BRBs) (Roldán et al., 2009; León-Quinto et al., 2009). Several laboratories and institutions participate in sample analysis, backed up by the corresponding agreements: Unitat de Hematologia Clínica, Facultat de Veterinària de Bellaterra (Barcelona); Centro de Análisis y Diagnóstico (CAD) from Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (Málaga); Clinical Laboratory at the Vetsuisse Faculty, University of Zürich; Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria de Madrid; BanGes at the Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC (Madrid); Laboratorio de Bioingeniería at Universidad Miguel Hernández (Alicante); Laboratorio de Biología Molecular, Estación Biológica de Doñana, CSIC (Sevilla); Laboratorio de la Estación Experimental de Zonas Áridas, CSIC (Almería), and the Department for Reproduction at the Institute for Zoo and Wildlife Research-IZW (Berlin).

Free-ranging lynx are usually captured by means of double entry box live-traps and then transferred to a squeeze cage where they are administered immobilizing drugs through direct



intramuscular injection. To avoid stress and minimize trauma, captive animals are caught with squeeze-cage traps whenever possible (Figure 3). On other occasions they are captured with nets or blowdarts. A total of 318 chemical immobilizations of 126 individuals, among them 60 free-ranging lynx, were performed between December 2003 and December 2008. The most commonly used method of chemical restraint consists of a mixture of 5 mg/kg ketamine hydrochloride (Imalgene1000®; Merial) and 50 µg/kg medetomidine (Domtor®; Pfizer). Induction is fast (lateral recumbence at  $6.5 \pm 4.2$  minutes) and smooth, and the effect lasts about 40-50 minutes (Martínez, 2007). Anesthesia can be partially reverted with atipemazole (Antisedan®, Pfizer) if necessary. By the end of 2008, medetomidine was substituted by



Fig. 3 Squeeze-cage in a handling corridor in a breeding center, and the use of the squeeze-cage for direct intramuscular administration of anesthesia.

dexmedetomidine (Dexdomitor®, Pfizer) at a dose of 12.5 µg/kg, which has resulted in a reduction of cardiovascular depression, although more data is needed to confirm this first impression. Isoflurane or sevoflurane are used for longer procedures (Gómez-Villamandos et al., 2007), although on certain occasions (e.g., anesthesia for electroejaculations) ketamine has been used for supplementation to avoid sphincter relaxation and to minimize the risk of contaminating semen with urine (which would kill the spermatozoa). No accidents have been registered during anesthesia, and all animals recovered without complications.

### **Necropsies and forensic examinations**

For operational reasons and uniformity, the *Centro de Análisis y Diagnóstico* (first located in Sevilla, actually in Málaga, Spain) has been designated as the laboratory where all Iberian lynx necropsies shall be performed. This center is equipped with all the necessary materials and has the

necessary trained staff to carry out necropsies even in emergency situations. Necropsies are performed following the established protocol (Iberian Lynx Necropsy Manual). In addition to determining the cause of death, post-mortem exams and sample collection provide biological material for epidemiological studies (Meli et al., 2009), for genetic studies (Godoy et al., 2009) and for the scientific collections of skeletons and skins. They also provide materials for the Biological Resource Banks (BRBs). Communication and coordination with the BRBs is key to collect, transfer, and process viable reproductive tissues (testes and ovaries) as fast as possible to avoid deterioration of these valuable samples (González et al., 2007).

A total of 52 necropsies, 38 of them on individuals from the free-ranging populations and the rest mostly from captive-born prematures and neonates, have been performed between December 2003 and December 2008. The causes of death in the free ranging population (Table 1) were as follows:

- Seven animals died due to infectious causes. Four of them died of diseases associated with FeLV infection (Meli et al., 2009; López et al., 2009; Meli et al., 2010) and one of infection with canine distemper virus (CDV) (Meli et al., 2010). The losses to the wild population caused by capture and transfer of animals with FeLV to a rehabilitation center are not included in this chapter (López et al., 2009). One individual was infected with feline parvovirus (FPV) and had spleen rupture, probably caused by trauma (Guillermo López, pers. comm.). One lynx was infected with *Mycobacterium bovis*, although more cases were already known prior to this one (Pérez et al., 2001; Aranaz et al., 2004), this additional case underlines the susceptibility of the Iberian lynx for bovine tuberculosis. Six of the seven animals that died of infectious diseases were equipped with radiotelemetry or GPS collars, which reaffirms that tracking allows for the detection of deaths that, otherwise, would likely remain unnoticed. Similar results have been observed in other free ranging felids (Schmidt-Posthaus et al., 2002; Haines et al., 2005).
- Twenty animals died of non-infectious causes. The most frequent cause of death was road-kill (14 animals). Three animals died of aggression: two of them were cubs aged less than one month. The species that attacked them could not be determined. One adult lynx had lesions in the hindquarters that had probably been caused by hunting dogs. Another adult animal died after ingesting bait that had been deliberately impregnated with aldicarb. One animal died of lesions, dehydration, and cachexia following the amputation of a limb by a snare trap. The number of deaths that were detected and attributed to illegal poaching was

considerably lower during the study period than in a previous study (García-Perea, 2000). Multiple pellets from two previous buckshot wounds were found during the necropsy of an animal that had died following a collision with a vehicle. In contrast to this, no pellets were found in any of the 126 live animals that had been examined and radiographed. The death of one dispersing juvenile was attributed to starvation based on the observed cachexia and the absence of infectious or toxic agents.

- The cause of death could not be determined in 11 cases. Only skeletal and dry tissues remains were available for examination in these animals, which did not allow clarifying the actual cause of death.

TABLE 1.

	Cubs Youngs	Subadult	Adult	Unknown age	TOTAL
<b>Infectious causes</b>					
Bacterias	-	-	1	-	1
Virus	-	-	6 (6)	-	6 (6)
<b>Non infectious causes</b>					
Road-kill	4	6	4 (2)	-	14 (2)
Aggression	2	-	1 (1)	-	3 (1)
Illegal traping	-	-	1	-	1
Starvation	1	-	-	-	1
	-	-	1(1)	-	1 (1)
<b>Unknown causes</b>	6	-	2 (2)	3	11 (2)
	13	6	16 (:2)	3	38 (12)

Table 1. Mortality causes of free-ranging Iberian lynx (*Lynx pardinus*) at different ages from December 2003-2008. Numbers in brackets indicate adult animals equipped with radiotelemetry or GPS collars.

During the same period, mortality within the *ex situ* population (Table 2) was attributed to the following causes:

- Seven premature births and miscarriages were registered. Four offspring were stillborn, while two premature young died of septicemia caused by *Escherichia coli* (see *Discussion of clinical cases experienced within the Ex situ Program*, this chapter). No infectious causes could be determined in the other stillborn, premature cubs.
- Three offspring died of aggression. In one case, the lesions had been caused by a littermate (Antonevich et al., 2009), while the other two had been injured by the mother.

- One offspring had an idiopathic chylothorax, (see *Discussion of clinical cases experienced within the Ex situ Program*, this chapter).
- One animal died accidentally in quarantine after biting an electric wire of a surveillance camera.
- One animal died of enterotoxemia after ingesting meat contaminated with *Clostridium* toxin. It was also severely anemic and infested with fleas. Similar symptoms have been described in other captive non-domestic felids that were exposed to demographic explosions of flea populations (Carles J. Sallés, pers. comm.).
- A two-day-old offspring died suddenly. A non-traumatic perforation of the stomach wall and associated peritonitis were observed during necropsy. The initial cause of death could not be determined.

TABLE 2.

	Cub Young	Subadult	Adult	TOTAL
<b>Infectious causes</b>	-	-	-	-
<b>Non infectious causes</b>				
Miscarriages & premature birthings	7	-	-	7
Fighting	3	-	-	3
Chylothorax	1	-	-	1
Electrocution	-	1	-	1
Enterotoxemia	-	1	-	1
<b>Unknown causes</b>	1	-	-	1
	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>14</b>

Table 2. Mortality causes of Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from the *Ex situ* Conservation Program at different ages from December 2003-2008. The continuous video-surveillance, the hand rearing of ill and non-attended cubs and the fast intervention during cub fighting have avoided the lost of more cubs.

### Development of technical reports

Every examination during anesthesia, necropsy or clinical intervention is thoroughly documented and the corresponding report is sent to the appropriate institutions and/or administrations. The GAAS also issues reports and recommendations on specific topics related to health aspects (*Cytauxzoon*, tuberculosis, FeLV, etc.), whenever they are considered necessary.

## **Creation and maintenance of a biomedical database**

All clinical procedures and analytical results generate a significant amount of information that needs to be sorted and organized. A biomedical database (BDB) was therefore created and divided into different sections, including procedures, analytical results and clinical histories. It is a useful tool that can be used for research and management of the species. The BDB information is available to technicians, institutions and researchers that hold a collaborative agreement.

## **Courses, meetings, and workshops**

Courses on health issues of the Iberian lynx and other felids have regularly been held with the ultimate purpose of revising all available information generated on Iberian lynx health issues and learning from other related programs, as well as from each other. In addition, meetings and workshops have been held at the breeding centers to unify criteria and improve procedures and needs (workshops on pediatrics, cesarean procedures, hand-rearing, anesthesia, handling of severely injured patients, etc.). Also, GAAS members maintain active communication and discussions via an electronic forum and hold regular meetings to discuss problems and needs, while enhancing the communication between veterinarians and researchers.

## **3. Health management program for captive Iberian lynx**

Free-ranging animals that are captured and are candidates for incorporating to the *Ex situ* Program are quarantined in specific facilities, which are equipped with surveillance cameras to allow continuous monitoring of the animals. Two anesthetic events, with complete clinical exams, radiographs and sample collections, are performed during the quarantine period. The first one is performed 10 to 14 days after the beginning of the quarantine period and the second a month later. The animals are identified with a microchip and vaccinated against FHV, FCV and FPV (Fevaxyn-i-CHP®, FortDodge) as well as FeLV (Purevax FeLV®, Merial). After quarantine and evaluation of the clinical exam, analyses and video-monitoring, the animals that are considered suitable for the *Ex situ* Program are transferred to the breeding facilities (Vargas et al., 2009).

The health management of Iberian lynx belongs to the Captive Breeding Program is similar to that of other felid species (Meltzer 1999) and follows the recommendations issued by the EAZA and AZA (Joslin et al., 1998; Blomqvist et al., 1999; Woodford, 2001; Krelekamp, 2004). The inherent chronic stress registered in certain captive-kept felid species seems to be related to a higher prevalence of certain diseases when compared to free-ranging populations (Munson et al., 2005b). In addition to spacious facilities, limited entry to only center staff, environmental

enrichment and a captive diet as similar as possible to the natural diet, the preventive medicine program seeks to minimize stress and improve health through the following measures:

**Biosecurity system:** The procedures include footbaths, disinfection of the materials and changing clothes and footwear when entering the animal facilities.

**Parasitology analysis:** Feces are analyzed every three months. *Eimeria* (from rabbits offered as live prey to the animals) is a common finding in fecal exams. Anthelmintics are avoided unless a certain parasite load is detected or the animal shows signs of being parasitized. As part of the prevention measures for enteroparasite infection, daily husbandry includes removing feces from the enclosures on a daily basis.

**Fecal cultures:** Conducted to test for *Salmonella/Shigella/Campylobacter* is performed every six months. No bacterial growth of any of the organisms mentioned above has been registered to date in the *ex situ* or the free-ranging populations. Fecal cultures also aim at detecting the potential zoonotic risk to the staff at the breeding facilities. Cultures of rectal swabs taken during anesthesia of free-ranging and captive individuals were also negative for the abovementioned bacteria.

**Vaccinations:** A trivalent dead vaccine against FHV, FCV and FPV, and a recombinant vaccine against FeLV are used as it was described previously in this chapter. The offspring born in the breeding facilities are vaccinated at eight weeks of age and then re-vaccinated a month later, and eventually boosted at a yearly basis. Although some protocols in non domestic felids recommend initiating a vaccination plan at an earlier age (around six weeks), and to revaccinate every three weeks until the animals are 12 weeks old, the current protocol is considered sufficient and safe for captive Iberian lynx, given the known prevalence of infectious agents, the biosecurity barrier and the quarantine system. In addition, no infection with these agents has ever been detected in the *ex situ* population, and handling of the young is reduced to a minimum. In any case, the evaluation of the safety and efficacy of the vaccines is a pending action required by the Iberian lynx Captive Breeding Action Plan. Adult animals are revaccinated every two to three years, and breeding females are revaccinated two months before breeding season to maximize immunity transfer to the offspring.

**Brush and weed clearing:** Periodic clearing of the large, open enclosures reduces optimal ectoparasite habitats (mainly ticks) while it ensures proper control of the animals via the video surveillance system.

**Capture:** Whenever possible, the capture of an animal is programmed and done with a squeeze-cage specifically designed for Iberian lynx. Nets and darts are avoided to reduce stress, trauma and distrust of the animals towards the staff.

**Complete annual physical exams:** Adults are currently examined under anesthesia once a year. The objectives of the physical examinations are: 1) to periodically assess the health status of each individual; 2) to vaccinate and deworm if necessary; 3) to evaluate female reproductive health of by performing a sonographic examination of the reproductive tract (Göriz et al., 2009); 4) perform radiographic examinations; 5) to evaluate male reproductive health of by studying sperm quality (Gañán et al., 2009, 2010; Roldán et al., 2009) and performing a sonographic examination of the testes and prostate (Göriz et al., 2009); 6) to collect biological samples to complete the analyses considered in the working protocols, and 7) to collect biological samples for the BRBs.

**Elimination of external parasites:** *Spot-on* pipettes containing fipronyl (Frontline®, Merial) or selamectine (Stronghold®, Pfizer) are routinely applied when animals are captured and anesthetized. Animals suspected to be infested with ectoparasites causing unspecific dermatological problems have been captured sporadically with squeeze-cages and pipettes have been applied.

**Weighing:** The animals are weighed regularly by entering tunnels or handling corridors with platform scales. This effective method of obtaining information on the animal's health status is performed in such a way that it minimizes stress to the animals while avoiding domestication of the captive lynx (Vargas et al., 2009).

**Diet:** Food could be the port of entry for pathogens that could imperil the captive population, as has occurred in other species (Jauniaux et al., 2008) and in the Iberian Lynx (see Clostridiosis in *Discussion of clinical cases experienced within the Ex situ Program*, this chapter). The diet and supplements administered to the program's animals are prescribed with the help of a nutritionist (Helena Marqués, ConZoolting©). Ninety percent of the captive lynx diet consists of rabbit (live or dead), which are farmed under strict supervision from the program veterinarian. The remaining 10% include quail and cow meat. Besides the vitamin mix provided when dead rabbits are fed to the captive colony, beta-carotene is also added to the regular diet starting six to eight weeks prior to breeding season and until the pairs have copulated.

#### 4. Discussion of clinical cases experienced within the *Ex situ* Program

##### Miscarriages and premature births

Between 2005 and 2008, the *Ex situ* Program has seen the birth of 34 offspring, seven of which were either premature or miscarried. The normal gestation period of captive Iberian lynxes seems to vary between 63 and 66 days (n = 15; Vargas et al., 2009). One female miscarried two fetuses after 42 days of gestation (Figure 4a); several analyses (PCR, histopathology, microbiology) did not allow determining the cause of miscarriage, and the female did not show any signs of disease. One female whelped two young after 56 days of gestation; one was dead, while the other was abandoned by the mother and died 24 hours later. The necropsies of these two individuals revealed a generalized congestion and hemorrhage without any other lesions or noteworthy laboratory results. Another female gave birth to two premature offspring after 61 days of gestation and abandoned them immediately thereafter. They died of septicemia caused by *E. coli* (Figure 4b). Finally, one female delivered two premature offspring after 60 days of gestation. One was born dead, while the other one with a septicemia survived thanks to intensive medical care.



Fig. 4a. Miscarried Iberian lynx (at 44 gestational days).



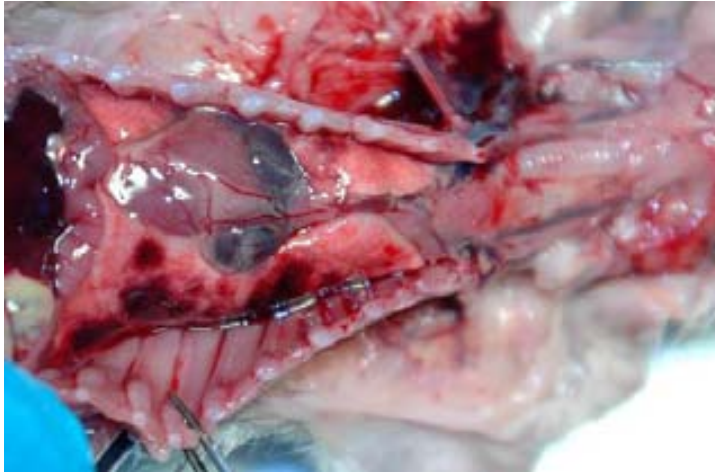


Fig. 4b. Post-mortem examination of the thoracic cavity of an Iberian lynx premature (61 days of gestation). Lung hemorrhage and generalized congestion. The animal received intensive medical care but died promptly. Septicemia by *Escherichia coli* was the final death reason.

### **Idiopathic chylothorax**

A naturally reared male died at eight weeks of age. The animal had been vaccinated two days earlier, and although its body condition was poor at the time of capture, the surveillance cameras showed that its behavior and activity were normal. Necropsy revealed abundant lymphatic, reddish liquid in the thoracic cavity (Figure 5); diffuse interstitial pneumonia, enteritis with crypt necrosis, generalized lymphatic congestion and distention, and enterobacterial septicemia was detected. FPV was identified by means of PCR, but it was probably the inactivated vaccine virus. An analysis of vaccines of the same lot did not reveal any viral replication or bacterial growth. An idiopathic chylothorax was diagnosed due to the impossibility to determine the cause of the observed signs. The chylothorax may have been caused by trauma, because the primiparous mother had been hand-raised, so never been correctly socialized. Although her maternal instinct was good, she played roughly with her cub. The most plausible hypothesis regarding this specific case is that trauma might have caused a lesion of a lymphatic vessel, which could then have led to the chylothorax.



Fig. 5 Post-mortem examination of the thoracic cavity of an Iberian lynx with chylothorax.

### **Clostridiosis**

Several adult animals presented gastrointestinal signs in the spring of 2006. Some animals vomited food or only bile. In most affected animals, vomiting was sporadic, while they maintained their appetite and showed normal behavior. One female presented bouts of vomiting, colitis and slight depression for a day. Another female vomited once to three times per week during 11 weeks, sometimes with diarrhea. She had loss of appetite, slight weight loss and a scruffy appearance of her fur. The female was rearing two offspring during this period, but the young did not show any signs of disease. Chemical immobilization for full exam and sampling was not performed in the most severely affected females because they were still rearing their offspring, and because their general status allowed a conservative approach to continue excluding possible etiologies. The cubs did not present the signs described for the mothers. Finally, it was determined that the signs had been caused by rabbit meat contaminated with enterotoxins, and *Clostridium* was isolated in microbiological cultures. It is possible that a delayed evisceration of the rabbit carcasses led to contamination of the flesh with intestinal contents. Alternatively, the carcasses may not have been correctly refrigerated. In addition to changing the food source (individually packed rabbit meat for human consumption is currently used), all animals were treated with omeprazol and amoxicillin (Clamoxyl®, Pfizer) or amoxicillin with clavulamic acid (Synulox®, Pfizer).

## **Dermatitis**

An adult male that was periodically anesthetized (Fig. 2a) to treat a digit abscess developed an acute alopecic, erythematous, bilateral lesion of the neck that seemed to be self-inflicted due to licking or continuous scraping. The etiology could not be determined, but the case was resolved by administering prednisone (Dacortin®, Merck) and marbofloxacin (Marbocyl®, Véroquinol). A psychogenic dermatitis related to stress caused by repeated capture and immobilization was suspected.

## **Tooth abscess**

Inflammation was observed on the left side of the snout of a male aged four months; the animal did not present any other signs. During chemical immobilization, the inflammation was attributed to the persistence of a deciduous canine, and an associated abscess from which *Proteus mirabilis* was isolated. The problem was resolved without complications by extraction of the canine, wound cleaning, and administration of spiramycin and metronidazole (Rhodogil®, Aventis Pharma®).

## **Dermatomycosis**

An alopecic area was observed on the neck of a captive-born, 5-month-old female that shared an enclosure with two female littermates and the mother. The animal was examined under anesthesia, and additional alopecic and erythematous areas were found on face and extremities. It was assumed that the littermates were also affected, although no lesions were observed by means of the surveillance cameras, and the animals were not immobilized for examination. The mother did not seem to be affected. Cultures and biopsies revealed that the cause of alopecia was an infection with *Tricophyton mentagrophytes*. The fungi had probably been transmitted to the lynx from the live rabbits used as food items, but no cause-effect relationship could be proved. All the family unit –who was sharing the same enclosure– was treated with itraconazole (Itrafungol®, Esteve) administered in the food. Griseofulvin was not used because toxic effects have been described in other felids (Wack et al. 1992). The animals recovered without complications. Another hand-reared offspring of the 2008 breeding season, and two naturally-raised offspring, were affected by a dermatomycosis also caused by *T. mentagrophytes*. No systemic treatment was administered, and the animals recovered without complications. It is possible that these infections are self-limiting, as it occurs in the domestic cat.

## Chlamydiosis

One free-ranging, apparently healthy adult male was captured for its incorporation to the Captive Breeding Program. Conjunctivitis and a small corneal ulceration, without additional signs, were observed during a quarantine examination. *Chlamydiophila felis* was identified by PCR in conjunctiva swabs, while additional tests did not reveal any other pathology. Oral treatment with doxycycline (Ronaxan®, Merial) eliminated the signs. A second PCR was negative for *Chlamydiophila*, and for other agents that may cause oculo-respiratory syndromes in felids.

## Enteritis with fecal retention

Two adult lynx kept in different breeding centers presented unspecific signs, including depression and gastrointestinal signs: vomiting in one and constipation in the other. One of the animals was anesthetized and underwent a complete examination with sample collection, radiographs and endoscopy of the stomach (Figure 2c). No noteworthy anomalies were identified in the laboratory analyses or biopsies (except for slight multifocal gastritis), while the radiographs revealed enteritis of the large intestine with fecal retention (Fig. 6). The animal recovered without complications after administration of an enema, passing of feces from the intestine, administration of meropitant (Cerenia®, Pfizer), and fluid therapy.



Fig. 6 Abdominal radiograph of an Iberian Lynx with enteritis and fecal retention.

The other animal was also anesthetized for examination and sample collection, but no anomalies were found during the exam. The radiographs revealed enteritis of the large intestine similar to the previous case. The animal was also treated with an enema and fluid therapy. It recovered without complications.

The origin of these unspecific symptoms of enteritis and fecal retention are not known. They do not seem to be associated with the diet, but rather with the reduced physical activity of some captive individuals. They may also be associated with the temporary holding of the animals in enclosures devoid of plants and weeds (e.g., quarantine facilities) which the lynx ingest sporadically.

### **Umbilical hernia**

Three hand-reared and one naturally reared offspring of the 2008 breeding season presented an abdominal hernia caused by a persistent umbilical ring. Two of the animals required surgical intervention. It is possible that the way hand-reared animals were handled, specifically during stimulation for urination and defecation, could have forced them in such a way that it interfered with normal scarring of the umbilical ring. The mother-raised cub was also handled after a cub fight (Antonevich et al., 2009) to help it with the transition to solid food, and this handling might have caused the inadequate closing of the umbilical ring.

### **Perianal gland inflammation**

Two hand-reared offspring of the 2008 breeding season presented inflammation/infection of the perianal glands. Accumulated purulent material (*Staphylococcus* sp. isolated) was removed from one animal. Both cubs were treated with topical application an ointment containing antibiotics and corticoids (Panolog®), and oral administration of cephalexine (Cefacure®), and both recovered without further complications.

### **Epilepsy in cubs**

Three of the six hand-reared offspring born in the 2008 breeding season presented seizures starting at 71, 75 and 116 days of age, respectively. Two of them shared the same father whereas the other was unrelated to them. The cause of these signs remains unknown, in spite of a wide range of tests and studies (PCRs for infectious agents, toxicological studies, hematology, biochemistry, urinalysis, magnetic resonance (MR) in one cub and cerebrospinal fluid (CSF) analyses in two of

the cubs). Physical exam, complementary tests and laboratory results did not shown abnormalities, so idiopathic epilepsy was therefore diagnosed. We postulated that the etiology was probably associated with hand-rearing (e.g., infant formula, oxygen therapy, vitamin or mineral supplements, etc.), which has led to some changes in the hand-rearing procedures to try to avoid potential future cases. Anticonvulsant therapy (phenobarbital) was effectively used from the beginning and, after 6 months of therapy, a half-dosage treatment was given. To date, no additional episodes have been observed in any of the three animals.

## **5. Conclusions**

The Iberian lynx *Ex situ* Conservation Program has grown from four individuals in December 2003 to 60 in December 2008, of which 24 have been born and raised in captivity (Vargas et al., 2009). During the last five years, and based on the nature of the observed clinical cases, necropsy results and screening for infectious agents, we consider that the overall captive population can be regarded as healthy and that our preventive medicine plan has been effective. Except for a few isolated cases, most clinical manifestations have been controlled and have never represented a significant threat to the *ex situ* population as a whole. A strict adherence to the preventive medicine protocols and management-targeted research can assist in continue to maintain the captive population in good health and then optimal for reintroduction.

Regarding the free-ranging population, one of the main priorities for its conservation is the implementation of an epidemiological surveillance program for the Iberian lynx and associated species in its current range and in potential reintroduction sites. This plan should be coordinated with the relevant administrations, and should be granted long-term financial and institutional support. A fluid and rapid communication between the responsible technical staff, together with the systematic collection of the biomedical information generated during procedures and analyses, should complement the surveillance plan. In addition, the acquired scientific knowledge is applied to the management and conservation of the highly endangered Iberian lynx.

## **5. 2. CAPITULO 2**

### **MORBIDITY AND MORTALITY OF CAPTIVE IBERIAN LYNX (*Lynx pardinus*) IN THE *EX SITU* CONSERVATION PROGRAMME**

Based on: Martínez, F., Manteca., X., Pastor., J., (*in press*). Retrospective study of morbidity and mortality of captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the *ex situ* conservation programme (2004-June 2010). Journal of Zoo and Wildlife Medicine.





MORBIDITY AND MORTALITY OF CAPTIVE IBERIAN LYNX (*Lynx pardinus*) IN THE *EX SITU* CONSERVATION PROGRAMME

Fernando Martínez, D.V.M., M.Sc., Xavier Manteca, D.V.M., Ph.D., and Josep Pastor, D.V.M., Ph.D., Dipl. E.C.V.C.P.

From the Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Autonomous University, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN (Martínez, Pastor)

From the Department of Animal Science and Food, Veterinary Faculty, Autonomous University, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN (Manteca)

**Abstract:** Medical records of 120 Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from the captive breeding population (CBP), 96 of which were older than 1-wk-old, were studied from 2004 to June 2010. From a total of 413 clinical signs recorded it was possible to obtain a diagnosis in 258 (62.5%). Inappetence, skin wound, and vomiting had the highest incidence. Adult (2- to 6-yr-old) and young (1 wk to 1-yr-old) animals accounted for most of the clinical signs. Vitamin D toxicosis and intraspecific trauma accounted for 55.4% and 15.1% of the clinical signs, respectively. Toxicosis due to the administration of supplements with an excess of vitamin D broke out in 2009 as a renal failure and affected a total of 39 individuals. Intraspecific trauma cases were predominantly observed from sibling aggressions. Diet-related conditions consisted of sporadic cases of fatal salmonellosis, dermatophytosis, and probably some gastrointestinal episodes. Suspected idiopathic epilepsy and femoral neck metaphyseal osteopathy were also observed. A total of 15 animals older than 1-wk-old died, including five vitamin D toxicosis cases and three young due to intraspecific trauma. *Mycobacterium bovis* was found as a secondary infection in two of vitamin D toxicosis deceased animals. Abortions, premature births, and stillbirths accounted for 12 mortalities, and 13 neonatal deaths due to maternal neglect or bacterial sepsis were observed.

Data show that improvement of diet-related conditions are key factors in preserving the health of animals in the CBP. Thus, the control of food and supplement composition, rabbit farm suppliers, and hygiene should be standardized and improved. Furthermore data recording and diagnostic protocols should be standardized.

**Key words:** Captive breeding, clinical signs, diseases, Iberian lynx, *Lynx pardinus*, morbidity, mortality.

## **INTRODUCTION**

The Iberian lynx (*Lynx pardinus*) is the only felid species classified as critically endangered (IUCN 2011). Currently, two isolated populations survive, two located in the region of Andalucía - Doñana and Sierra Morena – (Guzmán et al., 2004) and probably a recently discovered new population in Castilla- la Mancha (Alda et al., 2008). Great efforts are currently being made by several government agencies to conserve the species (Simón et al., 2009) including development of an *ex situ* captive breeding program (Vargas et al., 2009). The Iberian lynx captive breeding population (CBP) was established in 2004 and consisted of 41 males and 37 females in June 2010.

Typically retrospective studies on morbidity and mortality may reveal patterns of disease within a population and inform preventive management practices (Munson & Cook 1993; Hope & Deem 2006). Morbidity studies investigate diseases with diagnoses made by integrating detectable clinical signs and/or ancillary diagnostic testing. However, in non-domestic species in captivity it is common to detect clinical signs that cannot be linked to a clear diagnosis. Clinical signs usually receive little attention in retrospective studies, although they may also reflect the health status of a population.

The objectives of this study were: (1) to identify clinical signs and make a comparative analysis of how they affected different age groups within set periods of time; (2) to identify the health conditions and causes of mortality within the CBP; and (3) to make recommendations on preventive medicine protocols and future areas in need of research.

## **MATERIALS AND METHODS**

A total of 41 animals were incorporated into the CBP from the free ranging populations (seven from Doñana and 34 from Sierra Morena) after undergoing quarantine. During the 1 to 3 months quarantine period, each animal received two health evaluations with physical examinations, sampling, radiographs and microchip implantation. Collected samples were used for testing for infectious diseases, research projects, genotyping and storage for the Iberian lynx biological resource banks. Another 79 animals were born in captivity since the first litter in 2005 (Vargas et al., 2004). From these 120 individuals (41 captured from the wild and 79 born in captivity) a total of 41 animals were lost, including one accidental escape and 40 deaths. The number of animals in the CBP are presented in Table 1.

Table 1. Acquisitions, mortality, and population changes of Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the *ex situ* conservation programme (2004-June 2010). Total population correspond to the individuals at the end of the year.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Jan.- June 2010	Total
<b>Additions</b>								
Captured from the wild	13*	3	10	2	8	3	2	41
Captive-born	0	3	6	12	16	28	14	79
<b>Losses from the population</b>								
Perinatal mortality (<1 wk-old)	0	0	2	5	3	10	5	25
Non perinatal mortality	0	2	1	1	1	4	6	15
<b>Total population</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>30</b>	<b>38</b>	<b>57 **</b>	<b>72 ***</b>	<b>77</b>	<b>N/A</b>

\*The initial captive population consisted of 7 animals captured from the wild before 2004. Six more animals were added in 2004.

\*\*One individual escaped. \*\*\* Two individuals were soft released. N/A=Not applicable

Prematures, abortions and stillbirths were those individuals delivered  $\leq 61$  days of gestation. Neonates were considered those individuals from the time of birth at mean gestation time (62-65 days) to one week of age. Animals older than week old (non-neonates) were categorized into four age groups: 1 week to 1-yr-old (young), 1- to 2-yr-old (subadult), 2- to 6-yr-old (adult), and over 6-yr-old (advanced adult).

Animals in the CBP underwent periodic health evaluations, usually yearly, including a physical exam, sampling, radiographs and reproductive evaluation (electroejaculation and ultrasonography). Individuals were vaccinated against feline herpesvirus (FHV), feline calicivirus (FCV) and feline parvovirus (FPV) (Fevaxyn, i-CHP, Fort Dodge Animal Health, Southampton SO30 4QH, United Kingdom), and feline leukemia virus (FeLV) (Purevax, FeLV, Merial, F-69007 Lyon, France). Quarterly coproparasitologic and biannual copromicrobiologic tests were performed.

The majority of the CBP was located in three breeding centers, while a few individuals were housed in an off-exhibit area in a zoo. Animals in the breeding centers were kept in open enclosures with natural substrate and vegetation, and with visual, auditory and olfactory contact. The lynx were remotely monitored by a continuous video surveillance system. The lynx' diet consisted of farm-bred live rabbits or carcasses for human consumption (5x/wk), live quails or raw beef meat (1x/wk), and supplements.

## **Morbidity**

Medical records of 120 individuals from 2004 to June 2010 were reviewed. Records included clinical signs observed by veterinarians, keepers, or via video surveillance. All clinical signs were initially tallied. From the total of clinical signs, only those that received a diagnosis by a veterinarian and were related to a health condition were included for further study. Clinical signs and diseases during the quarantine period were not taken into account, as they were likely due to previous free ranging conditions, rather than current conditions in the CBP. Clinical signs were studied only in individuals older than one wk (non-neonates, n=96) as it was difficult to observe signs in the neonates. Clinical signs were classified according to the age of the animal.

In order to standardize recording of clinical signs, the following definitions were used: 1) “Abnormal gait” included weakness and ataxia; 2) “depression” referred to when an animal was less active than normal; and 3) “pica” was recorded when direct observation of sand ingestion occurred, or when sand was detected in considerable amount within feces. Occasional ingestion of plant materials is considered a normal behavior in the CBP and therefore not counted.

Renal failure was determined by using normal reference values for Iberian lynx serum chemistry results (García-Bocanegra et al., 2009) and the inability to concentrate the urine. The stage of renal failure was based on a cut-off value of 2.5 mg/dl of fasting serum creatinine and the presence of some other markers of kidney damage as elevated blood urea nitrogen (BUN > 63.6 mg/dl), low urine specific gravity (USG < 1.030), abnormal kidney images on radiographic or ultrasonographic examinations, elevated serum calcium (Ca > 12.8 mg/dl), and elevated serum phosphorus (P > 9.6 mg/dl). Blood pressure and urine protein to creatinine ratio (UP/C) were not determined in all of the animals. Thus, affected lynx were divided into three categories : stage I was defined by a serum creatinine lower than 2.5 mg/dl and low urine specific gravity; stage II was defined by presence of markers of kidney damage and creatinine values from 2.5 to 5 mg/dl; and stage III by creatinine values higher than 5 mg/dl. Renal failure was due to vitamin D toxicosis. Retrospective analysis of two mineral and vitamin supplement batches, from the same supplement, being administered in 2008 revealed a large amount of vitamin D3 (4562 IU/g and 5460 IU/g respectively). These values were about thirty times as much as that of the vitamin D3 content indicated in the supplement label (160 IU/g).

## **Mortality**

A total of 40 animals died, including aborted fetuses and neonates. Full postmortem exam was performed in 37 of them at one central laboratory. Tissues were examined histologically by one or two pathologists. Additional ancillary analysis, including diagnostic tests for infectious agents and toxicology, were performed as necessary. Gonads and other tissues were also collected for biological resource banks.

## **RESULTS**

### **Morbidity**

A total of 413 clinical signs were recorded. From this total, 37.5% (155/413) could not be related to any disease. All other clinical signs, 62.5% (258/413) received a diagnosis. Most of the clinical signs, 42.2% (109/258) and 29.1% (75/258) were observed in adult and young animals respectively. The most frequent clinical signs in the CBP were inappetence (19.0%), skin wound (18.2%), vomiting (14.0%), depression (9.7%), and pica (9.7%). Of these, pica was only recorded in one breeding center. In young animals skin wounds had the highest incidence (12.8%). In subadult animals the clinical sign with the highest incidence was inappetence (3.9%). In adults inappetence (9.3%), vomiting (8.9%) and pica (6.2%) were most common. In advanced adult animals the most common clinical sign was inappetence (5.8%).

Recorded health conditions that correspond to clinical signs are presented in Table 2. Over the course of the study, a renal failure due to vitamin D toxicosis was diagnosed in 39 of the 96 animals older than 1- wk-old. The study showed that 55.4% (143/258) of the clinical signs were associated with vitamin D toxicosis. Of the clinical signs associated with vitamin D toxicosis, 30.8% (44/143) were inappetance, 21.7% (31/143) were vomiting, and 17.5% (25/143) were pica. In 2009, vitamin D toxicosis was diagnosed in 28 animals (one young, six subadults and 21 adults) of the 46 animals examined (from a total of 73 live animals). At the end of the period of study, vitamin D toxicosis has been diagnosed in 31 animals (all adults) of the 66 animals examined (from a total of 78 live individuals). These 31 animals were staged as follows: 13 in stage I (41.9%), 8 in stage II (25.8%), and 10 in stage III (32.2%). Data showed that 67.6% (94/139) of clinical signs in 2009 and 72.8% (48/66) in 2010 were associated with vitamin D toxicosis.

Table 2. Health conditions in 96 Iberian lynx (*Lynx pardinus*) older than 1 week old in the *ex situ* conservation programme (2004-June 2010). Percentages are referred to the total diagnosed clinical signs (n=258).

Health conditions	Animals affected	Mortality	Number of clinical signs (%)
Vitamin D toxicosis	39	5	143 (55.4%)
Intraspecific trauma	36	3	39 (15.1%)
Gastrointestinal disease	6	.	9 (3.5%)
Dermatophytosis	5	.	9 (3.5%)
Suspected idiopathic epilepsy	4	.	7 (2.7%)
Minor trauma	3	.	7 (2.7%)
Insects bite	3	.	6 (2.3%)
Salmonellosis	1	1	4 (1.6%)
Bronchopneumonia	2	.	4 (1.6%)
Multiple pathologies	1	1	3 (1.2%)
Idiopathic enteritis and constipation	2	.	3 (1.2%)
Anal sac infection	3	.	3 (1.2%)
Acute renal disease	1	.	2 (0.8%)
Abscess caused by digit osteomyelitis	1	.	2 (0.8%)
Snake bite	1	.	2 (0.8%)
Fractures	2	.	2 (0.8%)
Umbilical hernia	4	.	2 (0.8%)
Diaphragmatic hernia	1	.	2 (0.8%)
Feline calivirus infection	1	1	2 (0.8%)
Spinal trauma	1	.	1 (0.4%)
Dental abscess	1	.	1 (0.4%)
Giardiasis	1	.	1 (0.4%)
Idiopathic chylothorax	1	1	1 (0.4%)
Mammary carcinoma	1	.	1 (0.4%)
Femoral neck metaphyseal osteopathy	1	.	1 (0.4%)
Umbilical abscess	1	.	1 (0.4%)

Intraspecific trauma affected 36 individuals and it was the health condition with the second highest number of associated clinical signs (14.7%; 39/265). The majority of these signs, 94.9% (37/39), were skin wounds. A total of 75.6% (31/41) of the aggressions were between siblings. This type of aggressions produced bone fractures in three youngs.

*Trichophyton mentagrophytes* was isolated from skin lesions in five youngs from three litters in one breeding center during different years. *T. mentagrophytes* was also isolated from the live rabbits that were fed to the animals at the affected breeding center. An additional case of dermatophytosis due to *Microsporum canis* was seen in an adult female with focal dermatitis. A course of vomiting and depression was observed in six animals in one breeding center in 2006. Animals were mildly affected and did not receive further evaluation. Generalized seizures were observed in three hand-reared youngs in 2008 and one dam-raised young in 2010. Diagnostic tests performed in two of the hand-reared youngs, including cerebrospinal fluid analysis, magnetic resonance imaging, complete blood count, serum chemistry panel, toxin and infectious disease testing, did not reveal an etiology. These seizures were diagnosed as suspected idiopathic epilepsy. Another episode of seizures in one dam-raised young in 2009, that ultimately died, was caused by acute toxic encephalopathy resulting from *Salmonella enterica* infection. The only other *Salmonella* isolation in the CBP was *S. arizonae* from rectal swabs in a healthy lynx female and her three youngs during a routine health evaluation.

Umbilical hernias were found in four captive born youngs in the CBP that presented with abdominal swellings. Other occasional but otherwise significant diseases presented were a femoral neck metaphyseal osteopathy in a young individual and a mammary carcinoma in a 9 yr old female.

## **Mortality**

Mortality results are presented in Table 3. A total of 25 individuals were less than 1-wk-old, including a group of 12 aborted, premature, and stillborn animals. Ten of the neonates died due to maternal neglect, despite eight being hand-reared and receiving medical attention. *Escherichia coli* septicemia affected three of these neonates and a bronchiolointerstitial pneumonia was diagnosed in another. Two dam-raised neonates died due to primary bacterial infections: *E. coli*



septicemia with peritonitis, and a *Corynebacterium spp.* septicemia. Finally, one neonate died due to traumatic lesions from the dam.

**Table 3. Causes of mortality in neonatal and non-neonatal Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the *ex situ* conservation programme (2004-June 2010).**

	< 1-wk-old n=25; 62.5%	> 1-wk-old n=15; 37.5%
Abortus/premature birth/stillbirth	12	
Maternal neglect	10	
Septicemia	2	1
Feline calicivirus infection		1
Intraspecific trauma	1	3
Idiopathic chylothorax		1
Accidental electrocution		1
Vitamin D toxicosis		5
Anesthetic complications		1
Multiple pathologies		1
Flea infestation		1

The other 15 deaths were noted in non-neonates. Five animals in the terminal stage of renal failure due to vitamin D toxicosis were euthanized for humane reasons. The most significant and common histologic lesions were metastatic mineralization of varying degrees in several organs, with renal tubular mineralization and interstitial fibrosis. After the first renal failure cases in the CBP were identified in 2009, use of the supplements was discontinued. No new cases of renal failure have been identified since discontinuing these supplements. *Mycobacterium bovis* was isolated in two of the deceased vitamin D toxicosis animals. One animal had granulomatous lesions in the lungs and kidneys only, and the other had disseminated disease.

Six youngs died for different reasons. One young died of direct sibling-induced trauma, and two others, from different litters, were killed by their own dam during a sibling-aggression event. One hand-reared young that was introduced into the litter of a domestic cat for socialization died from a FCV infection not detected in the dam. Another young died after an acute period of depression

due to idiopathic chylothorax. One young died of encephalopathy. *S. enterica* was isolated from the intestine and lungs of this animal, and meningitis and hemorrhagic pneumonia were the most remarkable histologic findings.

A 21-yr-old female was euthanized due to a progressive decrease in body condition. Postmortem exam revealed multiple pathologies including a *Pseudomonas* peritonitis secondary to pyloric perforation, glomerulosclerosis, esophageal squamous cell carcinoma, and leiomyoma in one anal gland. Additional deaths included one animal that died due to an accidental electrocution from biting an electric cord, the anesthetic death of a healthy individual, and a massive flea infestation case.

## **DISCUSSION**

This work offers valuable information regarding clinical signs, health conditions, and mortality about the CBP. However, as a retrospective study there are inherent limitations associated with some variations in living conditions and husbandry in each breeding center, record keeping, available data, terminology used, and differences of opinion in medical and pathologic diagnoses.

The study shows that a clinical signs analysis for this captive population is not useful in making management decisions because as state above a considerable proportion of clinical signs remained undiagnosed and were self-limiting. Thus, more emphasis should be placed on getting diagnosis.

Vitamin D toxicosis causing a renal failure, was the most significant health problem in the CBP during the study period, and was associated with a large proportion (37.5%) of the diagnosed clinical signs. It is necessary to take into consideration that non-specific clinical signs, such as inappetence and vomiting, could be caused by other diseases, concomitant or not related to vitamin D toxicosis. Pica related to vitamin D toxicosis has not been found in the literature. The reason for the observed association between this toxicosis and pica at one breeding center is unclear. Vitamin D toxicosis has been reported in domestic cats fed diets with high cholecalciferol content (Morita et al., 1995), however this is the first published outbreak of vitamin D toxicosis in non-domestic felids.

The sibling aggression observed in the CBP probably also occurs in the wild (Palomares et al., 2005) and has been observed in captive Eurasian lynx (*Lynx lynx*) (Sokolov et al., 1994). Aggressive youngs in the CBP were often temporally separated from the others, in order to prevent the risk of severe injuries or death of the attacked young. However, despite the potential consequences, allowing this behavior to some degree has merit in order to reintroduce

behaviorally normal individuals. Furthermore, as the number of animals in the CBP is increasing the rate of intervention can be reduced or eliminated completely.

One of the main concerns of any captive breeding program is the introduction or development of infectious transmissible diseases, that could represent a health risk for the free ranging populations if infected animals were reintroduced (Lutz et al., 1996; Kennedy et al., 2002). However, transmissible diseases do not appear to be a significant problem for this CBP. The fatal FCV infected lynx was kept in an isolated enclosure outside the breeding center and no other cases were detected. Other cases of tuberculosis have been reported in both free ranging and captive Iberian lynx (Briones et al., 2000). Feeding on infected wild ungulate carcasses is considered to be the primary source of infection (Gortázar et al., 2008) therefore Iberian lynx had been infected in the wild, prior to entry into the CBP. It is likely that the *M. bovis* infection remained latent until the renal failure acted as a debilitating factor. These tuberculosis cases highlight the need to develop a diagnostic panel to screen for mycobacterial infections in the CBP that should include radiographs, a tracheal wash and the development of a specific serologic test. Routine coproparasitological testing performed showed low levels or lack of pathogenic gastrointestinal parasites. Thus, CBP quarantine and extensive infectious disease testing have proven effective, and consequently should be maintained and reviewed periodically.

Salmonellosis and dermatophytosis are diet-related diseases detected occasionally in the CBP. *Salmonella* isolation in fecal samples is common in healthy captive felids, and is often related to feeding raw meat diets, particularly horse and chicken (Clyde et al., 1997; Lewis et al., 2002). *Salmonella* spp. were infrequently isolated in the CBP, probably due to the use of a different diet. The isolation of *S. arizonae* from healthy individuals in the CBP probably was related to the sporadic contact with reptiles present in the enclosures (Cambre et al., 1980). In contrast, *S. arizonae* caused a fatal septicemia in a young Eurasian lynx (Macri et al., 1997). Only one case of fatal infection with *S. enterica* case was detected in the CBP, and it was probably from a contaminated source, however bacterial culture of food source was not possible.

The origin of dermatophytosis cases was likely from the infected live rabbits used as a food source. Consequently good husbandry and hygiene practices in rabbit farms contracted as food suppliers should also be required. Dermatophytosis has been documented in other non-domestic felids (Rotstein et al., 1999; Wack et al., 1992), but no relation to prey food has been established.

Nutrition is a key factor in preserving the health of animals in the CBP. Routine control of food sources and hygiene are performed, but they need to be standardized in all the breeding centers.

Moreover, regular analysis of food components and supplements, as well as hazard analysis of critical control points should be performed.

The suspected idiopathic epilepsy cases in the CBP could be congenital but non-identified factors in the hand-rearing process could not be ruled out. Generalized seizures in domestic cats and other felids can have multiple etiologies (e.g. viral infections, forebrain tumors, intoxications) but a large proportion remain undiagnosed (Schriefl et al., 2008).

A more complete diagnostic work-up should be implemented in seizures cases in the CBP. In addition, the exclusion of the individuals with idiopathic epilepsy as breeders should be evaluated.

Femoral neck metaphyseal osteopathy has not been previously reported in non-domestic felids, and just a few similar descriptions in other zoo species are available (Delclaux et al., 2002). The condition observed in the individual in this study is similar to a condition seen in domestic cats and to the Legg-Calvé-Perthes disease in the domestic dog (Queen et al., 1998; Schulz 2006). As in the dog, a congenital origin should be considered, and consequently the exclusion of these animals as breeders should also be instituted.

Our data analysis suggests that it is necessary to create a more detailed, standardized protocol for the recording of clinical signs and diseases for future comparative morbidity and mortality studies. Several times data recorded was incomplete or there were misinterpretations. Moreover biomedical information should be recorded in one single database within the program and the diagnostic centers in order to share information.

Research to investigate congenital diseases should also be considered. Additionally, studies of stress in captive lynx should also be considered due to its potential implications in some diseases and in order to improve husbandry. Finally, a regular external and impartial quality control of health aspects and biomedical recordings at the Iberian lynx *ex situ* conservation program should be implemented in order to maintain high quality standards.

### **5. 3. CAPITULO 3.**

#### REPRODUCTIVE PARAMETERS OF CAPTIVE IBERIAN LYNX

Based on: Martínez, F., Pastor, J., Temple, D., Manteca, X. Reproductive parameters of captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*). (submitted to Theriogenology).



REPRODUCTIVE PARAMETERS OF CAPTIVE IBERIAN LYNX (*LYNX PARDINUS*)

Fernando Martínez, D.V.M., M.Sc., Josep Pastor, D.V.M., Ph.D., Dipl. E.C.V.C.P., Déborah Temple, D.V.M., Ph.D., Xavier Manteca, D.V.M., Ph.D.,

From the Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Autonomous University, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN (Martínez, Pastor)

From the Department of Animal Science and Food, Veterinary Faculty, Autonomous University, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN (Manteca, Temple)

**Abstract:** We analyzed eight years of data from the captive population of the highly endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in order to determine several reproductive parameters and study if they were affected by age, condition (wild-born or captive-born), or origin of the breeders (Sierra Morena or Doñana areas). The founder population was composed of 33 females and 34 males. 74,3% of the total pairings mated. The mating period (the time during which the animals copulate) lasted a mean of 3.1 days, during which the animals copulated an average of 23 times. Captive-born males had a lower mating frequency than wild-born ones (18 vs. 24 times;  $p=0.018$ ). The breeding proportion (number of births out of number of pairings) was 47.7%. Mating success of females (percentage that gave birth from those paired) was greater in older animals and it was not affected by their condition or origin. After a mean gestation of 64.4 days, the average litter size was 2.4 cubs with a mean sex ratio of 1.15 (males out of females). Sex ratio was significantly male-biased in the litters of females from Doñana in comparison with that of females from Sierra Morena (1.9 vs. 1.0.;  $p=0.029$ ). Almost half of the litters were twins and one third triplets. As the mating frequency increased the probability of having triplets over twins increased. Litter size was not affected by the age, condition or origin of the female, however, within the wild-born females from Sierra Morena there was a tendency for bigger litters. First pregnancies registered a high perinatal mortality. Cub survival at weaning was 61.3% and in a hypothetical scenario, without assistance for cubs at risk, cub survival would have been 51.6%. Reproductive output of females (mean number of alive cubs at weaning out of females that gave birth) was significantly higher with assistance than it would have been had assistance not been applied (1.5 vs. 1.2 cubs per female;  $p=0.015$ ) and it was not affected by condition or origin of the female. However there was a tendency for the reproductive output to be higher in older females where assistance was applied. The results obtained made it possible to establish comparisons with data from free-ranging populations of this species and from the Eurasian lynx (*L. lynx*).

**Key words:** *Lynx pardinus*, captivity, breeding, sex ratio, litter size, cub survival, reproductive output



## 1. Introduction

The Iberian lynx (*Lynx pardinus*) is endemic of the Iberian Peninsula (Ferrer and Negro 2004), where it was moderately abundant and widely distributed until the 18<sup>th</sup> century (Graells 1897). The species has suffered a drastic decline in most of its original distribution area due to anthropogenic reasons (Cabrera 1912; Valverde 1963; Rodríguez & Delibes 1992), and thus, in the early 21<sup>st</sup> century, Guzmán et al. (2004) found that only two isolated populations survived in southern Spain: Doñana and eastern Sierra Morena. The decline in Iberian lynx numbers has had a dramatic effect on the genetic variation of the species. Lynx genetic diversity is low in Sierra Morena and extremely low in Doñana (Johnson et al., 2006; J. A. Godoy, personal communication).

Besides actions for the conservation of the free ranging populations (Simón et al., 2008) an *ex situ* conservation program was initiated in 2003 with the main aim of maintaining 85% of the lynx's genetic variability over a 30 year period, and generating new free ranging populations through reintroduction (Simón et al., 2012). The program was expected to have at least 60 adult captive lynx (30 males and 30 females) in 2009 (Vargas et al., 2009). The Iberian lynx captive breeding population (CBP) has increased year after year through the incorporation of animals captured from the wild and individuals born in captivity.

In this paper, several reproductive parameters of the CBP were studied and some of them were related with age, condition (wild-captured or captive-born), and origin (Doñana or Sierra Morena areas). The knowledge of reproductive parameters and how they vary with different factors is relevant for the implementation of both *in situ* and *ex situ* conservation strategies for endangered species (Wielebnowski 1998). Thus, the knowledge of the Iberian lynx reproduction parameters will make it possible to evaluate the management of the CBP and consequently guide future management recommendations for the specie.

Several reproductive parameters of Iberian lynx free-ranging population in Doñana area are known and they have been studied in relation to prey availability, time frame and genetic diversity (Palomares et al., 2005; Palomares et al., 2012). However, the existence of a captive lynx population that is closely monitored allows other reproductive aspects that are much more difficult to study in the wild to be observed.

In general, in free-ranging populations it is expected to find a strong relationship between the availability of resources for reproducing females and their reproductive parameters (Stearns 1992).

Thus, due to the absence of resource constraints, we expected that captive Iberian lynx females had lower age at maturity and higher reproductive output than free-ranging lynx (Henriksen et al., 2005). Furthermore, some studies have documented that there is a strong male-biased sex ratio in litters born from free ranging animals that received supplemental feeding (Robertson et al., 2006), a condition that would be similar to a captive population. Consequently, we also expected in the CBP a male-biased sex ratio.

With relation to the breeding age of the females, data from other species show that there is a lower proportion of young females producing offspring compared with old females, and that the litter sizes of young females are smaller than those of old females (Pianka & Parker 1975; Clutton-Brock 1991).

Another factor is inbreeding, which has deleterious consequences on all aspects of reproduction and survival, including mating ability, female fecundity, cub survival, and mothering (Frankham 2005). Thus, it was expected that the more inbred animals from Doñana origin would have worse reproductive parameters than the animals from the Sierra Morena origin.

Finally, free ranging animals brought to captivity could suffer more stress than those raised in captivity. Therefore, because stress can affect reproduction (Liptrap 1999), in general it was expected that captive-born Iberian lynx would have better reproductive parameters than those wild-born. The possibility to compare reproductive parameters of captive-born animals with wild-captured animals in captive conditions is uncommon in zoo collections and other breeding programs, where most of the individuals are captive born (Henriksen et al., 2005; Marker 2011). This comparison in the CBP will not be possible in the coming years as the population will consist almost entirely of captive-born individuals.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

The age of the animals was rounded up, for the sake of simplicity, taking into account that most copulations and births took place in January-February and March-April respectively. Thus, for example animals that conceived at the age of approximately 22 months were referred to as 2-year olds. Adult animals were considered those with two or more years of age, and they were categorized into four age groups: 2-yr-old, 3- to 4-yr-old, 5- to 6-yr-old, and over 6-yr-old.

Neonates were considered those individuals from the time of birth to one week of age, and cubs those from one week to three months of age. Stillbirths and prematures were those individuals delivered before the estimated time of birth. Litter sex ratio was calculated as the proportion of males out of females at the time of birth.

Animals were divided into two categories, according to their condition: captive-born or wild-born. Moreover, they were also divided according to their population of origin: Sierra Morena, Doñana or crossbred between Sierra Morena and Doñana.

The reproduction parameters of 33 females (19 wild-born, 14 captive-born, where five were from Doñana population, 21 from Sierra Morena and 9 were crossbred between Doñana and Sierra Morena) and 34 adult males (18 wild-born, 16 captive-born, where one was from Doñana, 24 from Sierra Morena and 9 were crossbred between Doñana and Sierra Morena) were studied from 2004 to 2011.

## **2.2 Breeding facilities and general husbandry**

CBP was distributed among the captive breeding centers of “La Olivilla” (Jaén, Spain), “Centro Nacional” (Silves, Portugal), “El Acebuche” (Huelva, Spain), “Granadilla” (Cáceres, Spain), and in an off-exhibit area in “Zoobotánico de Jerez” (Cádiz, Spain). Animals were kept in outside enclosures that ranged from 550 m<sup>2</sup> to 1,200 m<sup>2</sup> with natural substrate and vegetation, and with visual, auditory and olfactory contact. The enclosures were adjacent to each other and there was a system of corridors and doors that facilitated animal movements and introductions for breeding purposes without the need of capturing the animals each time. In each enclosure there were one or two dens, some constructed out of concrete, and others made of natural materials, for the animals to breed.

Indirect animal monitoring was performed by 24 hour surveillance with fixed and mobile remote cameras and infrared lighting. Reproductive events were recorded by the keepers and video surveillances in a computer database.

The keepers and other staff managed the lynx by going into the enclosure to feed, clean, and do enclosure maintenance while the animals had been moved to a closed pen area.

Lynx were fed a controlled and weighed diet of farm-bred live rabbits and rabbit carcasses (five days a week), quail or beef (one day a week), and vitamin supplements.

### **2.3 Reproductive management**

A genetically based selection of potential pairs was performed before the reproductive season (Godoy et al., 2009). Animals could be transferred between breeding centers to perform the selected pairings. Compatibility of the selected male and female was first determined when they were placed in contiguous enclosures separated by a fence. If female and male behaved in a manner indicating no aggressive behavior the male was moved into the female's enclosure. Females were considered to be in prooestrus-oestrus state when they showed marked behavioral changes as an increase in urine spraying, vocalization, tail lifting, and rolling. At the end of the mating period the male was usually removed from the female's enclosure and in some cases, moved in with another female in prooestrus-oestrus state.

### **2.4 Reproductive events**

Pairing was considered when a potentially breeder adult male and adult female were placed in the same enclosure for breeding purpose. The total number of times the animals mated was registered in most of the successful pairings.

First reproduction was considered in those females that reached two years old within the program and were paired at this age. Consequently, females that were incorporated into the program or paired at 3 years old or more, were not included in the calculation of first reproduction. Breeding proportion was defined as the percentage of females giving birth from the total paired. Mating success of females was defined as the proportion of females that gave birth from those that mated. In order to study if there was any reproductive pattern, those females that were paired consecutively from the age of 2 years were selected.

Length of gestation was calculated from the first copulation to birth. Delivery of stillbirths, prematures, or neonates was the final indication of pregnancy, and litter size was considered as the total number of cubs that were delivered (viable or not) at birth. Mean litter size was the number of cubs born out of the total number of females that gave birth. Three months of age was adopted as criterion for successful survival of cubs because this is the weaning age of cubs in free-ranging populations (Fernández et al., 2002). Cub survival and reproductive output were studied at weaning. Reproductive output was defined as the number of live cubs at weaning from the total number of females that gave birth.

During the study period litters were assisted in the case of prematures, neonates, or cubs in a life threatening condition. Assistance measures included hand-rearing and/or medical treatment. In

order to compare those assisted with the free ranging population and the efficacy of litter management, we used the term *natural* for cub survival and reproductive output where there had not been any human intervention. Thus in a *natural* scenario we assumed that all those individuals at risk would have died.

Sibling aggression was common within the CBP (Antonevich et al., 2009), and human intervention was done in some cases of sibling aggression.

## **2.5 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by means of the Statistical Analysis System (SAS® 9.2; software SAS Institute Inc., Cary, NC; 2002-2008). The response variables: matings, mating success of females, litter size and reproductive output at weaning were analyzed using a GENMOD procedure taking the female lynx as a repeated measure. The model of matings examined the effect of the condition, population of origin and age of the male as well as the effect of the litter size. The models of mating success of females, litter size and reproductive output at weaning accounted for the effect of the age, the condition and the population of origin of the females as well as their interactions. The year of observation was tested as a fixed effect in each model. A binomial distribution was used for mating success of females whereas count data such as litter size, reproductive output at weaning and number of matings were examined using a Poisson distribution according to the value of the deviance (Cameron and Trivedi 1998). The residual maximum likelihood was used as a method of estimation and the least square means of fixed effects (LSMEANS) were used when analysis of variance indicated differences ( $p < 0.05$ ).

A Wilcoxon signed rank test for paired variables was used to investigate whether significant differences existed between the reproductive output at weaning with and without assistance. Spearman's correlation coefficients between litter size at birth and reproduction outputs (with and without assistance) at weaning were calculated.

A Mann-Whitney Wilcoxon test was used to investigate whether significant differences existed between the age of first reproduction of captive-born and wild-born females.

The effects of the female condition and population of origin on the sex ratio were studied by means of a GENMOD procedure and using a binomial distribution.

Values are presented as mean $\pm$  SE (standard error).

### **3. Results**

#### **3.1 Pairings and matings**

A total of 109 pairings were established in the CBP. Seventeen out of the 33 potentially reproductive females (51.5%) were paired for the first time at two years of age, and fourteen females (42.4%) at three years of age. Twenty-nine out of the total number of females (87.9%) mated at least once.

From the total of number pairings, 81 mating events were registered (74.3%). The mean date for the start of matings was the 2<sup>nd</sup> of February (the 32.4 day of the year $\pm$ 2.45, n=73, range=1-120), the mating period lasted a mean of 3.1 $\pm$ 0.26 days (n=24, range=1-5), and there were a mean of 23.0 $\pm$ 1.14 copulations per pair (n=74, range=5-65). Two mating periods were registered on the 2<sup>nd</sup> of July, but one was in a second oestrous. Most of the paired individuals mated (87.9% of the males and 94.1% of the females). Wild-born males copulated more times than those captive-born (24.2 $\pm$ 1.4, n=17 vs. 18.2 $\pm$ 1.5, n=15; p=0.018). The number of copulations was not significantly affected by the study year (p=0.59), the male's age (p=0.22) or the population of origin of the male (p=0.31).

A breeding pattern was observed in a subgroup of six females that were paired four or more consecutive years from two years of age on (two females in six consecutive years, three in five years, and one in four years). There was not a constant breeding pattern in these females, but we could observe some tendencies: usually they did not reproduce at two years of age (5/6 females), the first reproduction usually presented with neonate losses or non attended neonates (5/6), and once they started to reproduce, they usually continued to do so in consecutive years (4/6), with the exception of 2010 where only one of those six females bred. The absence of a clear reproductive pattern was more evident when we considered all the females paired four or more consecutive years (n=11) regardless of the age they first reproduced.

#### **3.2 Births, litter size and sex ratio**

A total of 52 gestations were registered giving a breeding proportion of 47.7%. The mean birth date was the 3<sup>rd</sup> of April (the 93.6 day of the year $\pm$  3.15 SE). The mean gestation time was 64.4 $\pm$ 0.157 days (n=43, range=62-67). A total of 7 gestations (13.5%) lasted less than 61 days and those litters were considered stillbirths or premature. Only one premature, of 59 days of gestation, survived due to an intensive treatment.

Twenty-two out of the total number of females (66.7%) gave birth at least once. The condition and the population of origin had no significant effect on the mating success of females ( $p=0.63$  and  $p=0.34$  respectively). Mating success of females was not affected by the year of study either ( $p=0.98$ ). However, the age of the female had a significant effect on the mating success (Fig.1). Females of 5-6 years of age that had previously mated were more likely to give birth than 2 year old females ( $p=0.04$ ).

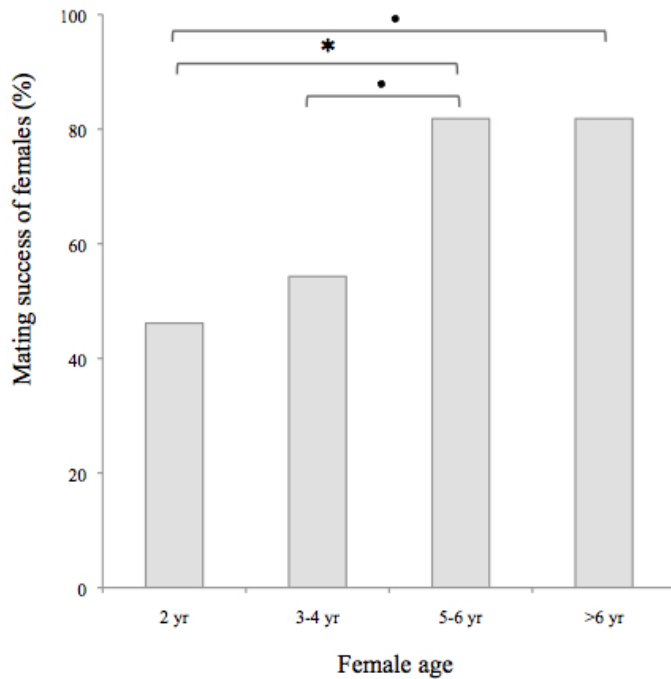


Fig. 1 Mating success of females (females that gave birth out of those that mated) in different age groups \*:  $p < 0.05$ ; • :  $p < 0.10$ .

On average, females reproduced at  $2.7 \pm 0.359$  years old ( $n=11$ , range=2-6). The mean age of first reproduction in captive-born females was not significantly lower than in wild-born females ( $2.3 \pm 0.864$ ,  $n=7$ , range=2-3 vs.  $3.5 \pm 0.866$ ,  $n=4$ , range=2-6; Wilcoxon Two-Sample Test,  $z=1.483$ ,  $p=0.169$ ). From the first 11 reproductions, perinatal mortality in form of stillbirths, premature, or non-attended cubs were registered in 9 occasions (81.8%). The older females that reproduced during the study period were two nine year-old individuals; two other females were paired with 10 and 11 years old respectively, but no mating was observed.

A total of 124 individuals were born. The mean litter size was  $2.4 \pm 0.091$  ( $n=52$ , range=1-4). The year of study ( $p=0.58$ ), age ( $p=0.96$ ), condition ( $p=0.70$ ) or population of origin ( $p=0.30$ ) of the females had no significant effect on the litter size. However, within wild-born females, those from

Sierra Morena had a tendency of producing bigger litters compared to those from the Doñana population ( $2.5 \pm 0.10$  cubs vs.  $2.1 \pm 0.21$ ;  $p=0.072$ ). More than half of the litters (53.8%) were of two cubs, and over one third of three cubs (36.5%). Litters of one and four cubs were occasional (5.8% and 3.8% respectively). Litters of 3 cubs were more likely to be related to more matings than litters of 2 ( $28.1 \pm 3.149$  matings,  $n=19$  vs.  $21.3 \pm 1.407$  matings,  $n=28$ ;  $p=0.0334$ ). The low number of litters of one and four cubs precludes the possibility of including those in the analysis of the number of matings and litter size. In the 42 litters in which it was possible to determine the sex of all the cubs, the sex ratio was 1.15 (53 males out of 46 females). Sex ratio was significantly male-biased in the litters of females from Doñana in comparison with that of females from Sierra Morena (1.9 vs. 1.0;  $p=0.029$ ). The condition of the female had no significant effect in the sex ratio of the litters ( $p=0.66$ ).

### **3.3 Cub survival and reproductive output of females at weaning**

From the total 124 individuals born, 13 (10.5%) were stillbirths and 17 (13.7%) neonates that died before reaching one week of age. 26 neonates (21%) non-attended by the dam were hand reared or treated, from which 11 finally survived. Only four cubs were lost after one week. Cub survival at weaning (3 months of age of the litter) was 61.3% ( $n=76$ ). The *natural* cub survival would have been 51.6% ( $n=64$ ) had assistance not been applied. In this *natural* scenario the majority of the deaths in the first 3 months would have been registered within one week after birth, a total of 56 neonates (45.2% of the individuals born). Moreover, when we compared the mean reproductive output at weaning ( $1.5 \pm 0.159$  cubs) with the *natural* reproductive output ( $1.2 \pm 0.168$  cubs), there was a significant difference ( $S=14$ ,  $p=0.015$ ). Reproductive output was not significantly affected by the year of study ( $p=0.68$ ), the population of origin ( $p=0.30$ ) or the condition of the female ( $p=0.70$ ). When assistance of litters was performed, females more than 5 years old (5-6 yrs,  $p=0.081$ ; >6 yrs,  $p=0.089$ ) tended to present a higher reproductive output than the 2 year-old females (Fig. 2). The reproductive output without assistance was highly correlated to the mean reproductive output with treatment (Spearman correlation  $r_s = 0.85$ ,  $p < 0.0001$ ).

## **4. Discussion**

This work offers valuable and detailed information on reproductive parameters in an intensively monitored captive population of a critically endangered felid. Some of these parameters are almost impossible to observe in the wild. Some of our results can be compared with reproductive data



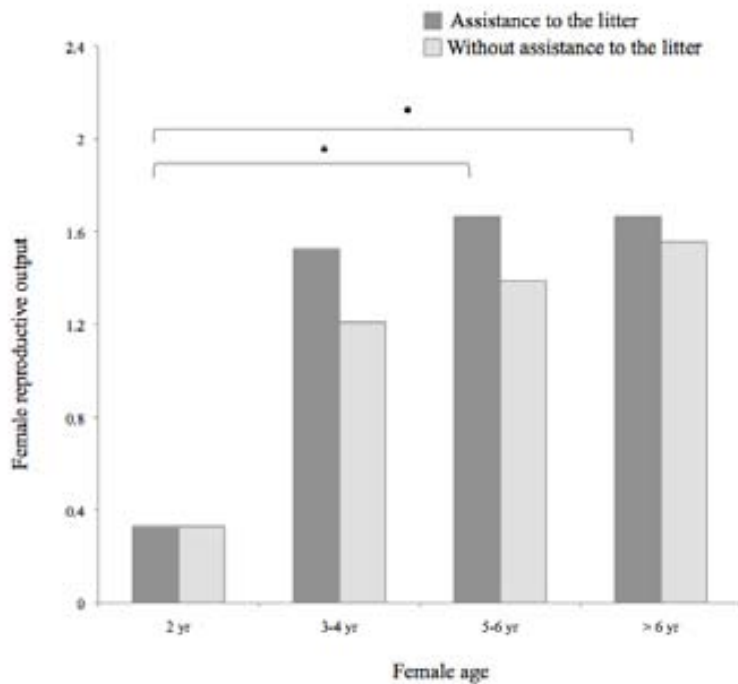


Fig. 2. Reproductive output at weaning of females at different age intervals with litter assistance (treatment and/or hand rearing) or in a hypothetical *natural* scenario without assistance of the litter , • :  $p= 0.05-0.10$ .

from free ranging Iberian lynx, but taking into consideration that free ranging data came from a reduced number of individuals of a subpopulation in the Doñana area (Palomares et al., 2005; López-Bao et al., 2010; Palomares et al., 2012), whereas the CBP was composed mainly of individuals from Sierra Morena area. Those remaining populations have been separated more than 50 years (Rodríguez & Delibes 1992), and if low genetic variability had affected reproductive traits this effect is likely to have been more pronounced in individuals from the Doñana population than those from Sierra Morena. Unfortunately there are not published data on reproductive parameters from the free ranging Sierra Morena population in order to establish a more reliable comparison between captive and free ranging reproductive parameters.

The reason why within the CBP captive-born males mated less than wild-born males is unclear. Both were under the same captive conditions, regarding diet and management, and if there had been some negative impact of stress on reproduction (Liptrap 1993) it should have been expected to affect those wild-born males brought to captivity and not those born in captivity. One hypothesis for this reproductive fitness decline was that there was an environmental effect of captive rearing. In the Iberian lynx, the mating frequency was related among other factors, to the number of spermatozoa, and there were no major differences in sperm characteristics between

captive and free ranging lynx (Gañán et al., 2010), as it has been seen in other felid species (Crosier et al., 2007). All the captive animals described by Gañán et al. (2010), except for one, were wild-born. Thus, for the Iberian lynx, the captive condition of the wild-born animals does not affect the number of spermatozoa, and with our results it would be expected that captive-born males, due to a lower mating frequency, had a reduction of the number of spermatozoa. Studies in sperm characteristics focused in captive-born males should be performed in order to confirm this hypothesis.

The breeding proportion in the CBP (47.7%) was considerably lower than in the free ranging populations of Iberian lynx, and *L. lynx* both in captivity and in the wild (Table 1). An increased probability to give birth has been observed in other species where individuals were allowed to pair with preferred partners (Martin et al., 2012). Pairings in captive breeding programs are usually determined by genetic criteria, and therefore partner preferences are not considered. Consequently, a lower breeding proportion should be observed. However in *L. lynx* there are no major differences in the breeding proportion between captive (Henriksen et al., 2005) and free ranging populations (Andersen et al., 2003; Breitenmoser-Würsten et al., 2007). Supplemental feeding of

Table 1. Reproductive parameters in captive (this study) and free ranging *L. pardina*, and *L. lynx*

Breeding proportion (total pairings)	Breeding proportion of 2 yrs old females (pairings of 2 yrs old females)	Mean gestation days (number of litters)	Mean litter size (number of litters)	Sex ratio's litter (number of cubs)	Cub survival at 3 m (number of cubs)	Natural cub survival at 3 m (number of cubs)	References
47.7% (109)	33.3% (18)	64.1±1.5 (52)	2.4±0.09 (52)	1.15 (99)	61.3% (124)	51.6% (124)	This study (2004-2011)
83% (29)	0%		3.1±0.19 (17)	0.96 (59)	N/A	75% (63)	Free ranging <i>L. pardina</i> (1993-2001) Palomares et al., 2005
	0%		2.27±0.12 (11)			61% (18)	Free ranging <i>L. pardina</i> (2002- 2008) Palomares et al., 2012
66%			2.4±0.9 (9)				Free ranging supplemented <i>L. pardina</i> López-Bao, 2010
85% (177)	67% (3)		1.95±0.79 (150)	0.98 (186)		N/A	Captive <i>L. lynx</i> (1968-2002) Henriksen et al., 2005
			2.08 (141)	0.91	N/A	N/A	Captive <i>L. lynx</i> Kaczensky 1991)
73%			2.07±0.73 (124)		N/A		Free ranging <i>L. lynx</i> Andersen et al., 2003
87%			2.10±0.87 (22)	0.95	N/A		Free ranging <i>L. lynx</i> Breitenmoser-Würsten et al., 2001
81.2% (32)		67-72	2.00±0.75 (26)	0.6 (32)	N/A		Free ranging <i>L. lynx</i> Breitenmoser-Würsten et al., 2007

Doñana's free ranging population, a diet regimen that could be considered similar to a captive situation, did not lead to an increase in the breeding proportion (66%) or litter size (mean=2.4±0.9 cubs per female), which suggests that productivity was not only limited by food (López-Bao et al., 2010). In fact, breeding proportion and litter size tended to be lower when supplemental food was

offered than in previous studies of free ranging populations from 1993-2001, perhaps reflecting a cumulative deterioration of reproductive performance in the Doñana lynx population after several decades of isolation (López-Bao et al., 2010). Within the CBP, breeding proportion of females from Sierra Morena and Doñana origin was similar, suggesting that if low genetic variability was the factor that had reduced breeding proportion and litter size, it was affecting both Doñana and Sierra Morena population.

Iberian lynx females clearly exhibited different breeding patterns. Breeding pattern irregularity was also observed in free ranging Iberian lynx population, and like breeding proportion, it was not related to European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) abundance, the main prey of the Iberian lynx (Delibes 1980), nor to other ecological factors (Palomares et al., 2005). Thus, in the Iberian lynx free ranging populations it was suggested that breeding patterns were probably related to characteristics of the females, and this is probably what also happened in the CBP. It should be noted that the very low breeding proportion in 2010 was related to the vitamin D toxicosis that affected a high percentage of the breeders in the CBP (Martínez et al., *in press*), whereas the mating success of females was not affected.

Almost half of the first pairings of females were of individuals of 3 years of age, although females of 2 years were capable of reproducing. While it would appear advisable that the first pairings should be made when females are two years old, due to the low breeding proportion and the high perinatal mortality at this age, it is preferable to begin pairings when females are 3 years old. In free ranging Iberian lynx it was not observed reproduction in two year old females (Palomares et al., 2005), despite the fact that it had been described in other lynx species (Kvam 1991; Mowat et al., 1996; Stehlik 2000), but with a lower breeding proportion in younger females (Henriksen et al., 2005) as in the CBP.

Five females captured at the age of 6-7 months and incorporated into the CBP, weighed  $9.0 \pm 0.447$  kg when they reached 20-32 months of age, almost the same weight as their free ranging counterparts (Beltrán & Delibes 1993); however, a group of four captive-born females weighed  $12.0 \pm 0.216$  kg at that same age (unpublished data). Probably a more abundant diet, lacking quantitative and qualitative fluctuations, and the vitamin and mineral supplementation produce bigger cubs (O'Regan & Kitchener 2005). Moreover, the CBP presented a lower burden of gastrointestinal parasites (Martínez et al., *in press*) than free ranging populations (Vicente et al., 2004; Acosta et al., 2011), which could have made that the digestive efficiency and then the cubs

growth had not been as affected as in the wild. Also in captivity animals had reduced energetic expenses.

It has been observed in several species that females that mature earlier are generally heavier than those with delayed maturation (Nilsen et al., 2010). Despite the fact that our study showed that heavier captive-born females started to reproduce earlier than wild-born ones, those differences were not significant, probably due to a low sample size. Hormonal studies in captive-born and wild-born females should be performed to study the age of maturity in order to clarify these findings.

Some females in the CBP, either captive-born or wild-born, could reproduce at two years of age. However, reproduction of free ranging females at two years of age have not been described (Palomares et al., 2005, 2012). In contrast to free ranging conditions, animals in captivity don't need to find, maintain and defend a suitable territory against older and experienced females (Ferrerias et al., 1997), which could explain why they can reproduce at two years of age.

In the wild, the Iberian lynx bred for the last time at 9 years old, but in free ranging populations females seldom reach the stage of senescence (Palomares et al., 2005). Our data is insufficient to establish the last reproduction age of captive Iberian lynx, but it is expected to be similar to the *L. lynx* where females can reproduce at 15 years old (Stehlik 2000; Henriksen et al., 2005).

Our results showed that the increase of matings, and consequently the number of spermatozoa (Gañán et al., 2010), increased the possibility of triplet births over twins. Iberian lynx are induced ovulators (Göritz et al., 2009). As in the Iberian lynx, frequent matings in *L. lynx* also increased the number of ovulations and then the litter size (Naidenko et al. 2007). Our initial expectations that in captivity litter size would be bigger than in free ranging populations due to the absence of resource constraints have failed, and litter size in captivity and in the wild (Palomares et al., 2012) were similar for almost the same period of study. Our results were similar to those observed in *L. lynx* in captivity (Kaczensky 1991; Henriksen et al., 2005) and in the wild (Andersen et al., 2003; Breitenmoser-Würsten et al., 2007). Fluctuations of rabbit abundance in free ranging population areas, above a minimum rabbit density that allowed the reproduction of the species, did not have an effect on the litter size nor the breeding proportion (Palomares et al., 2005), and could explain that despite a regular abundant food provision in the CBP the litter size did not increase and was similar to the free ranging populations. Thus, the Iberian lynx appears to have little sensibility to changes in prey abundance in contrast to other lynx species as in the Canadian lynx (*L. canadensis*), where fluctuations in snowshoe hare (*Lepus americanus*) populations had a great

impact in its reproduction (Brand & Keith 1979; Mowat et al., 1996). However, our data collected from 2004 to 2011, also showed that the litter size in the CBP was lower than the one in the free ranging populations between 1993 and 2001. Moreover, it had been observed a reduction in the litter size in Doñana's free ranging lynx from two periods of time that might be related to the increase of inbreeding for this population (Palomares et al., 2012). This hypothesis could be confirmed by our finding in the CBP that wild-born females from the Doñana population showed a tendency of lower litter size than wild-born females from Sierra Morena. Once more, the absence of data of reproductive parameters from the free ranging population of Sierra Morena makes a more accurate interpretation difficult. Finally, females of Iberian lynx in captivity did not show differences in mean litter size in relation to their age. Probably, as females will be older than 9 years a reduction in mean litter size will be observed (Henriksen et al., 2005).

The nearly balanced sex ratio at the moment of birth found in the CBP was in accordance with the observations in the free ranging population (Palomares et al., 2005), and captive and free ranging populations of *L. lynx* (Henriksen et al., 2005; Breitenmoser-Würsten et al., 2001, 2007). As in the litter size, diet did not seem to have an impact on the sex ratio of the litters. However, in certain free ranging and captive species a male biased sex ratio progeny has been related to a more caloric diet and better female body condition (non-domestic ungulates Kruuk et al., 1999 and Wauters et al., 1995; rodents and primates, Rosenfeld & Roberts 2004). We have not found an explanation for the male biased sex ratio in litters from captive females of Doñana origin, while the sex ratio was balanced in litters from captive females of Sierra Morena origin and in litters from free-ranging females of Doñana.

The close monitoring of a captive population as in the CBP allowed us to detect all the cub losses and infant mortality (Martínez et al., *in press*). The comparison of the mean litter size at the moment of birth with the reproductive output at weaning showed that usually one of the cubs born was lost before the weaning period as in free ranging populations (Palomares et al., 2005). Most litter deaths occurred within the first week after birth as stillbirths, premature and non-attended cubs. Most of these dead cubs, as it had been observed in captivity, would probably have been eliminated by the dam in free ranging conditions, thus, being undetectable if dens are inspected days after birth; then cub survival in free ranging populations probably was overestimated from the real cub survival. This could explain why cub survival in the free ranging populations of Iberian lynx was 75% compared to 51.6% *natural* cub survival in the CBP. Therefore the mean litter size in the wild could also be higher than what it had been observed (Palomares et al., 2005). Another possible interpretation is that captive factors lead to lower litter size and/or more infant

mortality. In the African lion (*Panthera leo*), for instance, 30% of wild-born cubs die before the age of 6 months, starvation and predation being among the main causes (Schaller 1972). This data strongly suggest that in captive conditions lion cub mortality in the first 30 days should thus be well under 30%, whereas the zoo mean is 42.2%. One captive factor that can explain higher cub mortality is chronic stress due to the reduced size of the enclosures. It has been demonstrated that for 33 terrestrial carnivore species, their natural minimum home-range size predicted captive-infant mortality, whereas the infant mortality in the wild was unrelated to range size (Clubb & Mason 2007). However, it remains unclear why in the Iberian lynx where average home ranges are about 6-10 Km<sup>2</sup> (Ferrerias et al., 1997) presented much more *natural* cub mortality in the first 30 days (45.2%) than other felid species with similar home ranges (% captive infant mortality, km<sup>2</sup> home range size, species: 28.6%, 4.4 km<sup>2</sup>, *Leopardus pardalis*; 33.3%, 6.4 km<sup>2</sup>, *Oncifelis geoffroyi*; 41%, 9.7 km<sup>2</sup>, *Leptailurus serval*) (Clubb & Mason 2007).

Our initial expectations that wild-born lynx would be more stressed than captive-born and therefore they would have worse reproductive parameters failed. Thus in captive jaguars (*Panthera onca*) there were not any differences in the fecal corticoid metabolite (FCM) concentration, one parameter to measure stress, between wild-born and captive born-animals (Conforti et al., 2011). FCM analysis should be performed in the CBP to study if wild-born animals after acclimation to captivity also present similar values than captive-born.

Sibling aggression was common in the litters in captivity of *L. lynx* (Sokolov et al., 1994) and Iberian lynx (Antonevich et al., 2009) causing the death of three cubs. One cub died of direct sibling-induced trauma, and the other two, from different litters, were killed by their own dam during a sibling-aggression event. Human intervention was done in some cases of sibling aggression, but it is difficult to predict if it was determinant in cub survival, and therefore it was not considered in this study.

The hand-rearing and treatment of neonates at risk proved to be effective in significantly increasing the reproductive output at weaning. The tendency of a higher reproductive output with assistance in older females compared to 2 year old females was consistent with the high mortality of neonates at this early age, and probably also indicated that the possibility of survival of neonates from the youngest females was lower than in older females despite assistance. However, the assistance of some of those neonates could led to the survival of individuals with lower fitness and enhance the likelihood of accumulation of deleterious alleles. Three neonates that were hand reared developed idiopathic epilepsy (Martínez et al., *in press*), and as a precaution those

individuals were not employed as breeders. Furthermore, usually hand-reared cub developed into adult individuals with an incorrect natural socialization and potential difficulties as breeders. Thus, a female that was hand-reared from birth and was paired for three consecutive years showed an abnormal sexual behavior during the oestrous and didn't mate with a proven breeder males. The CBP's goal is generating healthy individuals from the physical, genetic and behavioral point of view, and that implies the selection of the appropriate captive-born animals to be the breeders.





## **6 DISCUSIÓN GENERAL**



## 6. DISCUSIÓN GENERAL

El programa de conservación ex situ del lince ibérico (*Lynx pardinus*) -en adelante PCEL- es un complejo engranaje de distintas acciones diseñadas y desarrolladas por equipos multidisciplinares que tienen como objetivos generales crear una población cautiva reproductora que mantenga la máxima variabilidad genética de la especie en la naturaleza, y que proporcione individuos óptimos para la reintroducción (Vargas et al., 2009).

Uno de estos engranajes ha sido la implementación de un programa sanitario similar a los que se realizan con otros felinos silvestres en cautividad (Meltzer et al., 1999). El programa sanitario del lince ibérico tiene la particularidad que si bien surgió desde el PCEL se aplicó para la especie tanto en cautividad como en vida libre. El programa sanitario se vertebró a través de un grupo asesor de aspectos sanitarios, al modo de los *Veterinary Advisory Groups* de los *Species Survival Plans* de los zoos norteamericanos. El objetivo principal del programa sanitario era mantener una población cautiva sana, y que los animales criados en cautividad y reintroducidos no pudieran suponer un riesgo sanitario para las poblaciones silvestres (Lutz et al., 1996). El programa sanitario ha permitido aumentar los conocimientos sobre aspectos biomédicos de la especie y ha colaborado con diferentes proyectos de investigación.

Salvo siete animales que ya se encontraban en cautividad al inicio del PCEL y cuyo estado sanitario ya había sido evaluado, 41 ejemplares fueron capturados de las poblaciones silvestre, y tras la cuarentena y excluir la presencia de enfermedades infecciosas, fueron incorporados a la población cautiva. A pesar de la cuarentena y de no haberse detectado signos de infección durante años, se encontraron lesiones causadas por *Mycobacterium bovis* en dos animales que habían muerto por otra causa. Los lincees en la naturaleza consumen ocasionalmente ungulados silvestres, y por tanto pueden infectarse al consumir animales infectados por *M. bovis* (Aranaz et al., 2004). Se hace así recomendable establecer un protocolo diagnóstico ante *Mycobacterium bovis* tanto en los animales que ya se encuentran en la población cautiva reproductora (PCR) como en otros que puedan ir incorporándose de las poblaciones silvestres. El protocolo debería incluir además del examen y pruebas rutinarias, radiografías de tórax, lavado bronquial, y serología para *M. bovis*.

En las poblaciones silvestres de lince ibérico se han detectado casos de muerte por la infección por FeLV y CDV (Meli et al., 2009; Meli et al., 2010; López et al., 2009) probablemente a partir del contacto con carnívoros domésticos infectados que acceden a los hábitats del lince. Casos similares se han descrito en otras especies de felinos (CDV en leones africanos *Panthera leo* - Roelke et al., 1996; FeLV en panteras de Florida *Felis concolor coryi* - Cunningham et al., 2008).

Las cuarentenas, así como el emplazamiento de los centros de cría alejados de núcleos de población de donde pudieran llegar animales domésticos no controlados, y el diseño de las instalaciones con un perímetro exterior, han disminuido el riesgo de entrada de enfermedades infecciosas en la PCR. Sin embargo en muchos centros zoológicos, al alojarse numerosas especies de carnívoros silvestres que pueden estar infectados, y donde además es habitual el acceso y la presencia de gatos domésticos incontrolados, es mucho mayor el riesgo de infección con agentes patógenos compartidos (Duarte et al., 2009).

Salvo un caso aislado de Giardiasis en un cachorro no se han detectado otras patologías parasitarias en la PCR, y los exámenes coproparasitológicos periódicos en la PCR han detectado bajas cargas parasitarias, por lo que no se han administrado antihelmínticos de forma rutinaria. Aunque no existan evidencias científicas que lo respalden, algunos autores abogan por mantener los microorganismos y fauna parasitaria propia de la especie (Kock et al., 2007). Así por ejemplo mantener en cautividad animales “limpios”, que reciben habitualmente antiparasitarios, podría suponer que tras su reintroducción se vieran afectados por parásitos del medio contra los que ya han perdido su inmunidad natural. Así para la CPB, el procurar evitar la administración de antiparasitarios de forma no dirigida, y el alojamiento en condiciones naturales en las mismas áreas donde se van a reintroducir los animales, podría tener un efecto beneficioso de cara a su reintroducción.

Probablemente la causa más frecuente de desarrollo de enfermedades en programas de cría, tal como hemos observado en el PCEL, es a partir de la alimentación. Numerosos agentes infecciosos e intoxicaciones pueden entrar o desarrollarse en una población cautiva a partir de la comida que reciben los animales. La única patología relevante en la PCR ha sido la intoxicación de vitamina D en el 2010 a partir del uso de suplementos vitamínicos que contenían un exceso de vitamina D. La intoxicación afectó a 39 de 96 animales de PCR causando la muerte de cinco, y disminuyó considerablemente la proporción de cría en la temporada reproductora 2010. Aunque descrita la intoxicación por vitamina D en gato doméstico por la administración de piensos con un exceso de vitamina (Morita et al., 1995), no hay casos publicados en otros felinos no domésticos. Hay que resaltar que en el año 2012 han aparecido en foros veterinarios otros casos de intoxicación por vitamina D en animales de zoológico por la administración de piensos y suplementos vitamínicos con un exceso de vitamina, y la propia casa comercial que los producía admitió su error y retiró del mercado estos productos (foro LatinVets). Estos casos alertan de que se pueden producir fallos en la formulación de los suplementos y plantea la necesidad de analizar la composición de los mismos, principalmente las concentraciones de vitaminas liposolubles, en cada uno de los lotes

que se vayan utilizando en la PCR. Otra recomendación es analizar la composición de los conejos que se ofrecen a la PCR, como mínimo principios inmediatos, vitaminas liposolubles, y minerales, tal como ya fue recomendado al inicio del PCEL (Marquès 2004) y que permitiría formular una dieta adaptada a la PCR. El análisis sería tanto de la parte que los animales consumen cuando se suministra presa viva como de la canal cuando se ofrece presa muerta. Además sería también interesante determinar en el lince ibérico los valores de referencia para los metabolitos de la vitamina D, de la vitamina A, ésteres de retinilo, tocoferoles y determinados carotenoides, que pueden ofrecer información del estado nutricional de los animales y alertar de ciertas patologías (Crissey et al., 2003).

Otras enfermedades originadas a partir de la alimentación detectadas en la PCR, si bien como casos esporádicos, han sido dermatofitosis y salmonelosis, así como probablemente otros cuadros gastrointestinales. Además existe la sospecha de que un cuadro gastrointestinal que afectó a un grupo de al menos seis animales en un centro de cría fuera una enterotoxemia por *Clostridium perfringens*, aunque no se pudo determinar la presencia de la toxina en los conejos muertos que se administraron. Es probable que las canales estuvieran contaminadas debido a una evisceración incorrecta y a una deficiente refrigeración. La salmonelosis que causó la muerte de un joven probablemente también se debió al consumo de una canal en mal estado, aunque la ausencia de otros casos paralelos en animales que recibieron la misma dieta en ese momento no descarta una mayor susceptibilidad individual en ese ejemplar. Los casos de dermatofitosis por *Trichophyton mentagrophytes* sólo se detectaron en cachorros de distintas camadas de un centro de cría por el contacto con conejos vivos infectados que fueron ofrecidos como presa viva. Otros casos descritos de dermatofitosis, pero por *Microsporum canis*, en felinos no domésticos no estaban relacionados con la dieta (Sykes & Ramsay 1994). La presentación de dermatofitosis exclusivamente en cachorros indica una mayor predisposición a la infección en animales jóvenes. La ausencia de casos de dermatofitosis en otros centros de cría indica un problema concreto de infestación de las presas y por tanto de mala gestión sanitaria en una de las granjas que suministran conejos como presa viva. La supervisión del control sanitario en las granjas debe seguir constituyendo otra prioridad del PCEL.

La alimentación de la PCR, ausente de fluctuaciones y en mayor cantidad que en condiciones silvestres, no se ha traducido en un mayor tamaño de camada. De la misma forma, en las poblaciones silvestres de lince ibérico, incluso aunque reciban alimentación suplementaria, tampoco se ha observado un aumento del tamaño de camada (López-Bao et al., 2010). Parece por tanto que el tamaño de camada del lince ibérico es poco sensible a la cantidad de alimento

disponible. Sin embargo en otras especies, como en lince canadiense (*Lynx canadensis*), el tamaño de camada está relacionado con la disponibilidad de la liebre americana (*Lepus americanus*) (Brand et al., 1979; Mowat et al., 1996), la cual constituye una parte substancial de su dieta. De la misma forma, una mejor dieta en la PCR comparada con las poblaciones silvestres, tampoco se ha traducido en una desviación hacia machos en el sex ratio de las camadas, hecho que sí que se ha observado en distintas especies de roedores, primates y ungulados al consumir dietas más calóricas (Rosenfald et al., 2004).

Es interesante destacar que las hembras nacidas en cautividad, a igual edad y similar condición corporal, tienen mayor peso que sus congéneres en libertad, probablemente por una mejor alimentación y un menor gasto energético de las madres. En otras especies se ha observado esa misma diferencia (O'Regan & Kitchener 2005). También se ha observado en el lince eurasiático (*Lynx lynx*) que las hembras que alcanzan antes la madurez sexual son generalmente más pesadas que las que la alcanzan más tarde (Nilsen et al., 2010). Sin embargo, aunque en nuestro trabajo las hembras nacidas en cautividad, con mayor peso, se reproducen antes que las que provienen de la naturaleza, estas diferencias no son significativas. Por otro lado, la edad de las hembras sí que se relaciona tanto con la eficacia de las cópulas (hembras que paren sobre hembras que copulan) como con su resultado reproductor (media de cachorros que sobreviven por hembra respecto al total de hembras que parieron), mostrando que en general las hembras de 2 años son *peores* reproductoras que hembras de más edad. En la naturaleza no se ha detectado reproducción en hembras de lince ibérico a los 2 años de edad (Palomares et al., 2005). En cautividad, probablemente por la ausencia de limitantes ecológicos tales como disponer de un territorio con una densidad suficiente de conejos, las hembras de 2 años se pueden reproducir. Sin embargo la menor supervivencia de cachorros en estas hembras probablemente se deba a su falta de experiencia reproductora. Por otro lado, el tamaño de camada en las hembras de la PCR es independiente de la edad hembra, al menos durante nuestro periodo de estudio. Sin embargo, es de esperar que a medida que aumente el número de hembras por encima de 9 años se observe una disminución del tamaño de camada en edades avanzadas como ocurre con el lince eurasiático (Henriksen et al., 2005).

Es inherente que en aquellas poblaciones con un bajo número de ejemplares haya una disminución de su variabilidad genética y que aumente por tanto el riesgo de que se produzca depresión por endogamia y la acumulación de mutaciones deletéreas (Bryant & Reed, 1999; Charpentier et al., 2005; Xu et al., 2007). La pérdida de variabilidad genética puede tener un impacto negativo, entre otros aspectos sobre la capacidad reproductora (XX ref) y el desarrollo de enfermedades (XX ref).

El lince ibérico es otro más de los ejemplos de especies amenazadas en la que se ha producido una drástica reducción de variabilidad genética, mucho más marcada en las poblaciones de Doñana que Sierra Morena, (Johnson et al., 2006) y algunos trabajos indican que hay efectos de depresión por endogamia. Así Palomares et al., 2012 muestra que la disminución en el tamaño de camada de las poblaciones silvestres entre dos periodos de tiempo cercanos está relacionada con el aumento de la endogamia. En nuestro trabajo con datos de entre el 2004 y el 2011, también detectamos un menor tamaño de camada que en las poblaciones silvestres en un periodo de tiempo de tan sólo unos pocos años antes (1993-2001), lo que respaldaría los resultados de los trabajos en la población silvestre. Otros trabajos en la especie indican que el menor peso relativo de los testículos pero especialmente el bajo porcentaje de espermatozoides normales y los bajos niveles de testosterona circulante, podrían estar relacionados con la baja variabilidad genética de la especie (Gañán et al., 2009). Estudios previos en otras especies de felinos muestran que altos niveles de teratospermia y la disminución de algunos parámetros reproductivos en los machos están también relacionados con una menor variabilidad genética (guepardo *-Acynonyx jubatus-* en Crosier et al., 2007, el león africano *-Panthera leo-* en Wildt et al., 1987, y la pantera de Florida *Felis concolor coryi* en Barone et al., 1994).

En nuestro trabajo no hemos encontrados diferencias en los parámetros reproductivos estudiados entre aquellos ejemplares cautivos con genética de Sierra Morena o de Doñana. Sin embargo, dentro de las hembras de la PCR nacidas en libertad, aquellas que provienen de Doñana presentan una tendencia a un menor tamaño de camada que las que provienen de Sierra Morena, lo que sugiere un efecto del mayor empobrecimiento genético de la población de Doñana sobre la reproducción. Por tanto, a falta de datos reproductivos de la población silvestre de Sierra Morena y en vista de nuestros resultados, es probable que existan diferencias al menos en algunos parámetros reproductivos entre las poblaciones silvestres de Doñana y Sierra Morena. Es necesario por tanto realizar estudios de parámetros reproductivos de la población silvestre de Sierra Morena, y más considerando que la mayoría de los ejemplares que constituyen la CBP proceden o tienen la genética de Sierra Morena.

La escasa variabilidad genética de la especie también parece afectar al desarrollo de ciertas patologías o una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Así el alto porcentaje de ejemplares de lince ibérico, tanto en vida libre como en cautividad, que presentan glomerulonefritis membranosa (Jiménez et al., 2008) y depleción linfoide (Peña et al., 2006) podría estar relacionada con esta disminución. De la misma forma la alta virulencia de la infección por FeLV en la población silvestre de Doñana parece estar relacionada con una menor respuesta

inmune debido a la pobre variabilidad genética (Meli et al., 2009). En la Pantera de Florida la baja variabilidad genética (O'Brien et al., 1990) parece ser la causa de la mayor susceptibilidad de la especie a la infección por el FeLV así como de la aparición de anomalías físicas y espermáticas (Roelke et al., 1993).

La necrosis de cabeza de fémur detectada en un ejemplar de la PCR es una patología similar a la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes del perro (Schulz 2006), y al igual que ésta podría tener un origen genético pero no podemos saber si está relacionada con la baja variabilidad genética de la especie. También se han detectado tres casos de epilepsia en cachorros que tuvieron crianza artificial; después de un panel de diagnóstico neurológico completo no se pudo determinar la causa, y por tanto se consideraron casos de epilepsia idiopática. Al igual que en animales domésticos podría tener una base genética (Schriefl et al., 2008) aunque no debemos descartar que el origen estuviera en algún factor durante el proceso de cría artificial.

Así por ejemplo, la baja variabilidad genética del guepardo ha sido durante tiempo considerada como la causa principal del bajo éxito reproductor de la especie en cautividad (O'Brien et al., 1985, 1986) cuando en realidad mejorando el manejo y las condiciones en cautividad la especie se reproduce con éxito (Bertschinger et al., 2008).

También en el guepardo, algunas de las enfermedades descritas en la especie se atribuían a su baja variabilidad genética cuando posteriormente se ha demostrado que su desarrollo estaba ligado a condiciones extrínsecas a la especie. Así la glomeruloesclerosis y la gastritis linfoplasmocitaria asociada a *Helicobacter* tienen mucha mayor prevalencia en guepardos mantenidos en cautividad que en las poblaciones silvestres, y parece estar relacionado con un estrés crónico en cautividad (Munson et al., 2005b).

Mientras que en los programas de cría en cautividad de especies amenazadas se pone mucho énfasis en retener la máxima variabilidad genética de la especie, comparativamente reciben menos atención los posibles métodos para reducir la adaptación genética a la cautividad. La adaptación genética a la cautividad se debe a la selección tanto natural como artificial de los individuos en condiciones de cautividad (Frankman & Loebel 1992; Arnol 1995). Sin embargo es importante considerarlo, ya que individuos bien adaptados a la cautividad pueden estar peor adaptados a las condiciones en la naturaleza y mostrar menor supervivencia y capacidad reproductiva al reintroducirse (Woodworth et al., 2002; Frankham, 2008; Williams & Hoffman, 2009). Las diferentes estrategias para reducir la adaptación a la cautividad incluyen minimizar la selección (mediante una cría dirigida y creando condiciones en cautividad similares a las naturales),



minimizar el número de generaciones en cautividad y la fragmentación de las poblaciones, siendo estos dos últimas las que se consideran más efectivas (Williams & Hoffman, 2009). El PCEL se ha diseñado para disminuir el riesgo que se produzca adaptación genética a la cautividad. Así por ejemplo la PCR se encuentra repartida en 5 centros de cría (datos 2013) y hay traslados de reproductores entre centros, las instalaciones procuran reproducir su hábitat natural, y el manejo procura mantener conductas naturales tales como la caza presa viva. Para minimizar las generaciones en cautividad el programa está diseñado a 30 años. Los primeros cachorros nacieron en el 2005 y en el 2011, el último año de nuestro estudio, ya habían animales F2 con capacidad reproductora, y así es de esperar que a lo largo del tiempo de desarrollo del programa se produzcan unas 10 generaciones. Desconocemos en qué medida habrá adaptación genética a la cautividad en la PCR. Aunque se consideraba que la adaptación genética a la cautividad se producía tras muchas generaciones, estudios recientes demuestran que sin embargo pueden ocurrir en pocas generaciones (Williamson et al., 2010), o incluso en una sola (Christie et al., 2012). Sería necesario por tanto establecer ciertos parámetros de los ejemplares de la PCR, tales como características físicas, fisiológicas, reproductivas y comportamentales, e ir monitorizándolas a lo largo de la vida del programa para ver si se producen cambios que pudieran comprometer la reintroducción de la especie.

Hasta la fecha no disponemos de estudios etológicos o de actividad adrenal que puedan ofrecernos información objetiva sobre los componentes de la respuesta de estrés de la PCR y si existen diferencias entre los animales nacidos en cautividad y aquellos incorporados de la naturaleza. Estudios de metabolitos de corticoides fecales (FCM) en jaguares (*Panthera onca*) indican que animales de vida libre que son capturados y puestos en cautividad, si bien al inicio presentan valores de FCM más elevados que los animales nacidos en cautividad, al cabo de un tiempo los niveles son similares entre ambos grupos, aunque entre los animales nacidos en libertad los machos presentan valores significativamente superiores a las hembras (Conforti et al., 2011). Otro estudio en carneros de las Rocosas (*Ovis canadensis canadensis*) muestra además que si bien animales nacidos en cautividad o provenientes de la naturaleza, tras haberse aclimatado, presentan respuestas similares de FCM a situaciones de estrés agudo (captura con una red), en cambio la respuesta del sistema nervioso autonómico es mayor en los animales nacidos en cautividad, lo que sugiere que ambos grupos perciben el estrés de forma distinta (Coburn et al., 2010).

El manejo de la PCR procura minimizar el número de situaciones, que en nuestra percepción como humanos, podríamos considerar de estrés tanto agudo como crónico para los animales. Así el manejo sanitario de la población cautiva ha procurado reducir el número de capturas para

exámenes o procedimientos diagnósticos. Reducir el número de capturas no sólo disminuye potencialmente las situaciones de estrés agudo sino también otros riesgos como traumatismos. Así siempre que ha sido posible se ha empleado la captura con jaula de captura-compresión para la inyección de la anestesia en vez de hacer servir dardos. Cuando había animales que presentaban ciertos signos clínicos se ha optado por un manejo conservador, evitando las capturas para su examen y diagnóstico, y esperando ver su evolución o respuesta a un tratamiento no invasivo, por ejemplo con medicaciones por vía oral. Eso explica porqué más de un tercio de los signos clínicos observados no llegaron a diagnosticarse.

En nuestro trabajo sobre parámetros reproductivos separamos los animales de la PCR en dos grupos: los que nacieron en cautividad y los que fueron incorporados de la población silvestre partiendo de la hipótesis que los nacidos en cautividad presentarían mejores parámetros reproductivos, ya fuera por una menor respuesta de estrés u otros aspectos asociados a la cautividad. Sin embargo no hemos encontrado diferencias entre animales nacidos en cautividad o en la naturaleza respecto al éxito de cópulas en la hembra (*female mating success*), el tamaño de camada, la supervivencia de cachorros, y el resultado reproductivo al destete (*reproductive output at weaning*). Parece por tanto que si existiera una respuesta de estrés afectaría por igual a ambos grupos de hembras en los parámetros estudiados y que ésta tendría poco efecto sobre la reproducción de la especie en cautividad. Por otro lado, comparando las poblaciones silvestres con la PCR encontramos que la proporción de cría (*breeding proportion*), la supervivencia de cachorros, y el resultado reproductivo al destete es menor que en las poblaciones silvestres. Estas diferencias podrían deberse o bien a que simplemente en cautividad se puede hacer un registro más detallado y completo, o bien a que esté asociada a un efecto negativo de la cautividad. La alta proporción de cachorros no atendidos por las madres, que en el caso de no recibir tratamiento hubieran muerto, junto con otros neonatos que mueren antes de una semana, arroja en conjunto una alta mortalidad perinatal en la PCR. Un estudio donde se analiza un amplio rango de especies de carnívoros no domésticos demuestra que la mortalidad perinatal en cautividad es mayor cuando las especies en libertad ocupan territorios más extensos (Clubb & Mason 2005). Sin embargo, no podemos explicar porqué otras especies de felinos que utilizan territorios de tamaño similar al del lince ibérico tienen menor mortalidad en cautividad y que los lince tengan mortalidades perinatales similares a las de felinos que utilizan extensos territorios.

Respecto a los machos, los nacidos en cautividad realizan menor número de cópulas que los provenientes de la naturaleza. Sabemos que en el lince ibérico el número de cópulas está relacionado, entre otros factores, con el número de espermatozoides (Gañán et al., 2009), y por

tanto, supuestamente, con la capacidad reproductora de los machos. De hecho, hemos encontrado que el aumento del número de cópulas aumenta las probabilidades que se produzcan camadas de 3 cachorros en vez de 2 (el número de camadas de 1 y de 4 cachorros era demasiado bajo para incluirlo en el análisis). Sería por tanto necesario estudiar las características espermáticas de los machos nacidos en cautividad, ya que los datos actuales de machos cautivos provienen en su mayoría de individuos nacidos en la naturaleza.

En la PCR se ha registrado un elevado número de peleas entre cachorros de la misma camada que han causado básicamente heridas cutáneas, aunque también daños musculoesqueléticos y la muerte de un cachorro. Este comportamiento también se ha descrito en el lince eurasiático (Sokolov et al., 1994). Otros dos cachorros murieron como consecuencia de las heridas causadas por su propia madre cuando ésta intervino durante la pelea de los cachorros. En los casos más graves se ha intervenido para evitar traumas severos o incluso la muerte de los cachorros. Como ya se ha comentado anteriormente otra de las situaciones en las que ha sido necesaria la intervención directa ha sido en el caso de neonatos no atendidos por la madre. La intervención en neonatos se ha reflejado en una supervivencia significativamente mayor de los cachorros, y por tanto ha aumentado el resultado reproductivo al destete. Ambas intervenciones, en peleas y en cachorros no atendidos, han permitido evitar la pérdida de individuos, y por tanto la pérdida de variabilidad genética. Sin embargo hay que considerar que involuntariamente se puede estar produciendo una selección artificial involuntaria, que es uno de los factores causantes de adaptación genética a la cautividad.

Hemos visto que la investigación en la especie ha sido y debería seguir siendo uno de los pilares para su manejo y conservación, y se han recomendado distintas líneas de investigación en aspectos biomédicos y reproductores. Una deficiencia de muchos programas de conservación *ex situ* es que no disponen ni de recursos ni de personal para desarrollar proyectos de investigación. Sería útil que en el diseño y dotación presupuestaria de programas de conservación *ex situ* se destinaran recursos para cubrir estas necesidades, ya que con frecuencia la investigación asociada depende de centros externos y de que estos consigan la aprobación de proyectos de investigación. La investigación promovida desde dentro de los propios programa podría solucionar la necesidad de responder a tiempo a preguntas que van surgiendo, y toda la investigación debería realizarse de forma conjunta con centros y universidades asociadas.



## **7. CONCLUSIONES**



## **7. CONCLUSIONES**

1. El programa sanitario del lince ibérico, integrado en un contexto multidisciplinar para su conservación, ha permitido establecer dinámicas de trabajo, obtener una base de información biomédica sólida, y apoyar la investigación de la especie.
2. La salud de la población cautiva de lince ibérico no se ve reflejada en los signos clínicos observados en los animales.
3. Se recomienda en la población cautiva de lince ibérico analizar la composición nutricional de la dieta, y en el caso que se considere necesario la utilización de suplementos vitamínicos, realizar análisis periódicos de la composición de los mismos.
4. La eficacia reproductiva de las hembras cautivas de lince ibérico aumenta con su edad en el rango estudiado de 2 a 9 años.
6. El origen (nacidos en cautividad o nacidos en la naturaleza) y la diferencia genética (procedentes de la población de Doñana o de Sierra Morena) de las hembras de lince ibérico en cautividad no tienen una influencia sobre los parámetros reproductivos estudiados. Sin embargo, el origen de los machos influye sobre su capacidad reproductora.
7. Se recomienda en la población cautiva de lince ibérico realizar estudios sobre la influencia de la baja variabilidad genética de la especie y del estrés sobre su estado de salud y reproducción.





## **8. BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L., León-Quinto, T., Bornay-Llinares, F. J., Simón, M. A., Esteban, J. G., 2011. Helminth parasites in faecal samples from the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Parasitology* 179, 175-179.
- Alda, F., Inogés, J., Alcaraz, L., Oria, J., Aranda, A., Doadrio, I., 2008. Looking for Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack?. *Animal Conservation* 11, 297-305.
- Alexander, K.A., Appel, M.J., 1994. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. *Journal of Wildlife Diseases* 30, 481-485.
- Andersen, R., Linnell, J.D.C., Odden, J., Andre'n H., Sæther, B-E., Moa, P., Herfindal, I., Kvam, T., Brøseth, H., 2003. Utredninger i forbindelse med ny rovviltmelding. Gaupe—Bestandsdynamikk, bestandsutvikling og høstingstrategier. Reports fo the large Predator Policy Statement. Lynx—population dynamics, population development and harvesting strategies. NINA-Fagrappport 59.
- Antonevich, A.L., 2009. A comparative analysis of early sibling aggression in two related species: the Iberian and the Euroasian lynx, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Appel, M.J.G., Yates, R.A., Foley, G.L., Bernstein, J.J., Santinelli, S., Spelman, L.H., Miller, L.D., Arp, L.A., Anderson, M., Barr, M., Pearce-Kelling, S., 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 277-288.
- Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sanchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Dominguez, L., 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2602-2608.
- Ballou, J. D., 1993. Assessing the risks of infectious diseases in captive breeding and reintroduction programs. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24, 327-335.
- Beissinger, S.R., Westphal, M.I., 1988. On the use of demographic models of population viability in endangered species management. *The Journal of Wildlife Management* 62, 821-841.

- Beltrán J., Delibes, M., 1991. Hematological and serum chemical characteristics of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in southwestern Spain. *Canadian Journal of Zoology* 69, 840-846.
- Beltrán, J.F., Delibes, M., 1993. Physical characteristics of Iberian lynxes (*Lynx pardinus*) from Doñana, Southwestern Spain. *Journal of Mammalogy* 74, 852-862.
- Berry, W.L., Jardine, J.E., Espie, I.W., 1997. Pulmonary cryptococcoma and cryptococcal meningoencephalitis in a king cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28, 485-490.
- Blomqvist, L., McKeown, S., Lewis, J.C.M., Richardson, EEP Felid Tag, International Zoo Veterinary Group, 1999, in: 1st edition, EEP Felid Regional Collection Plan & Veterinary Guidelines.
- Bolton, L.A., Lobetti, R.G., Evezard, D.N., Picard, J.A., Nesbit, J.W., van Heerden, J., Burroughs, R.E., 1999. Cryptococcosis in captive cheetah (*Acinonyx jubatus*): two cases. *Journal of the South African Veterinary Association* 70, 35-39.
- Bolton, L.A., Munson, L., 1999. Glomerulosclerosis in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 36, 14-22.
- Brand, C.J., Keith, L.B., 1979. Lynx demography during a snowshoe hare decline in Alberta. *Journal of Wildlife Management* 43, 827-849.
- Breitenmoser-Würsten, C., Zimmermann, F., Ryser, A., Capt, S., Laass, J., Siegenthaler, A., Breitenmoser, U., 2001. Untersuchungen zur Luchspopulation in der Nordwestalpen der Schweiz 1997-2000. Kora Bericht No. 9.
- Breitenmoser-Würsten, Ch., Vandel, J.M., Zimmermann, F., Breitenmoser, U., 2007. Demography of lynx *Lynx lynx* in the Jura Mountains. *Wildlife Biology* 13, 381-392.
- Briones, V., de Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.I., Galka, M., Montero, N., Goyache, J., Aranaz, A., Domínguez, L., 2000. Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerging Infectious Diseases* 6, 189-191.
- Brown, J.L., 2006. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology* 66, 25-36.

- Brown, J. L., 2011. Female reproductive cycles of wild female felids. *Animal Reproduction Science* 124, 155–162
- Brown, M., Lappin, M.R., Brown, J.L., Munkhtsog, B., Swanson, W.F., 2005. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *Journal of Wildlife Diseases* 41, 691-700.
- Butchart, S., Walpole, M., Collen, B., et al., 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328, 1164–1168.
- Cabrera, A., 1914. Fauna ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Cagnini, D.Q., Salgado, B.S., Linardi, J.L., Grandi, F., Rocha, R.M., Rocha, N.S., Teixeira, C.R., Del Piero, F., Sequeira, J.L., 2012. Ocular melanoma and mammary mucinous carcinoma in an African lion. *BMC Veterinary Research* 8, 176.
- Calvete, C., Estrada, R., Lucientes, J., Osácar, J.J., Villafuerte, R., 2004. Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long term mortality rates of European wild rabbits. *Veterinary Record* 155, 388-392.
- Calzada, J. 2000. Impacto de depredación y selección de presa del lince ibérico y el zorro sobre el conejo. PhD Thesis. Universidad de León.
- Cambre, R.C., Green, D.E., Smith, E.S., Montali, R.J., Bush, M., 1980. Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177, 800–803.
- Cameron, A.C., Trivedi, P.K., 1998. Regression analysis of count data. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Carpenter, M.A., Appel, M.J., Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Hofer, H., East, M., O'Brien, S.J., 1998. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65, 259-266.
- Citino, S.B., Munson, L., 2005. Efficacy and long-term outcome of gastritis therapy in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36, 401-416.

- Clark, T.W., Reading, R.P., Clarke, A.L., (Eds.), 1994. Endangered species recovery. Island Press, Washington, D.C.
- Cleaveland, S., Hess, G.R., Dobson, A.P., Laurenson, M.K., McCallum, H.I., Roberts, M.G., Woodroffe, R., 2002. The role of pathogens in biological conservation, in: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.), The ecology of wildlife diseases, New York, NY: Oxford University Press, pp. 139-150.
- Clubb, R., Mason, G. J., 2007. Natural behavioural biology as a risk factor in carnivore welfare: How analysing species differences could help zoos improve enclosures. Applied Animal Behaviour Science 102, 303-328.
- Clutton-Brock, T.H., 1991. The evolution of parental care. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Clyde, V.L., Ramsay, E.C., Bemis, D.A., 1997. Fecal shedding of Salmonella in exotic felids. Journal of Zoo Wildlife Medicine 28, 148-152.
- Conforti, V. A., Morato, R. G., Augusto, A. M., de Oliveira e Sousa, L., de Avila, D. M., Brown, J. L., Reeves, J. J., 2011. Noninvasive monitoring of adrenocortical function in captive jaguars (*Panthera onca*). Zoo Biology 31, 426-441.
- Consejo de Europa/WWF. 1999. Plan de Acción para el Lince ibérico en Europa.
- Crosier, A. E., Marker, L., Howard, J., Pukazhenth, B. S., Henghali, J. N., Wildt, D. E., 2007. Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. Reproduction, Fertility and Development 19, 370-382.
- Cunningham, M.W., Brown, M.A., Shindle, D.B., Terrell, S.P., Hayes, K.A., Ferree, B.C., McBride, R.T., Blankenship, E.L., Jansen, D., Citino, S.B., Roelke, M., Kiltie, R.A., Troyer, J.L., O'Brien, S.J., 2008. Epizootiology and management of feline leukaemia virus in the Florida Puma. Journal of Wildlife Diseases 44, 537-552.
- Chassy, L.M., Gardner, I.A., Plotka, E.D., Munson, L., 2002. Genital tract smooth muscle tumors are common in zoo felids but are not associated with melengestrol acetate contraceptive treatment. Veterinary Pathology 39, 379-385.
- Daniels, M.J., Golder, M.C., Jarrett, O., MacDonald, D.W., 1999. Feline viruses in wildcats from Scotland. Journal of Wildlife Diseases 35, 121-124.

- Daoust, P.Y., McBurney, S.R., Godson, D.L., van de Bildt, M.W., Osterhaus, A.D., 2009. Canine distemper virus-associated encephalitis in free-living lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) of eastern Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 45, 611-24.
- Deem, S.L., 2007. Role of the zoo veterinarian in the conservation of captive and free-ranging wildlife. *International Zoo Yearbook* 41, 3-11.
- Deem, S.L., Karesh, W.B., 2002. The veterinarian's role in species-based conservation: the jaguar (*Panthera onca*) as an example. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, pp. 1-5.
- Deem, S.L., Karesh, W.B., Weisman, W., 2001. Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation Biology* 13, 1246-1256.
- Deem, S.L., Karesh, W.B., 2002. The veterinarian's role in species-based conservation: the jaguar (*Panthera onca*) as an example. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, pp. 1-5.
- Delclaux, M., Talavera, C., López, M., Sánchez, J.M., García, M.I., 2002. Avascular necrosis of the femoral heads in a red panda (*Ailuropus fulgens fulgens*): possible Legg-Calvé-Perthes disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33, 283-285.
- Delibes, M., 1980. Feeding ecology of the Spanish Lynx in the Coto Doñana. *Acta Theriologica* 25, 309-324.
- Delibes-Mateos, M., Farfán, M.A., Olivero, J., Vargas, J.M., 2010. Land-use changes as a critical factor for long-term wild rabbit conservation in the Iberian Peninsula. *Environmental Conservation* 37, 169-176.
- Desvaux, S., Marx, N., Ong, S., Gaidet, N., Hunt, M., Manuguerra, J.C., Sorn, S., Peiris, M., Van der Werf, S., Reynes, J.M., 2009. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) outbreak in captive wild birds and cats, Cambodia. *Emerging Infectious Diseases* 15, 475-478.
- Duarte, M.D., Barros, S.C., Henriques, M., Fernandes, T.L., Bernardino, R., Monteiro, M., Fevereiro, M., 2009. Fatal infection with feline panleukopenia virus in two captive wild carnivores (*Panthera tigris* and *Panthera leo*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40, 354-359.

- Dubey, J.P., Pas, A., Rajendran, C., Kwok, O.C., Ferreira, L.R., Martins, J., Hebel, C., Hammer, S., Su, C., 2010. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Veterinary Parasitology* 172, 195-203.
- Eaton, K.A., Radin, M. J., Kramer, L.W., Wack, R.F., Sherding, R., Krakowka, S., Fox, J.G., Morgan, D.R., 1993. Epizootic gastritis associated with gastric spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 30, 55-63.
- Evermann, J.F., Benfield, D.A., 2001. Coronaviral infections, in: Williams, E.S., Barker, I.K. (Eds.), *Infectious diseases of wild mammals*, 3rd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 245-253.
- Evermann, J.F., Heeney, J.L., Roelke, M.E., McKiernan, A.J., O'Brien, S.J., 1988. Biology and pathologic consequences of feline infectious peritonitis virus infection in the cheetah. *Archives of Virology* 120, 155-171.
- Fernández, N., Palomares, F., Delibes, M., 2002. The use of breeding dens and kitten development in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology* 258, 1-5.
- Ferrer, M., Negro, J. J., 2004. The near extinction of two large European predators: super specialists pay a price. *Conservation Biology* 18, 344-349.
- Ferreras, P., Aldama, J.J., Beltrán, J.F., Delibes, M., 1994. Immobilization of the endangered Iberian lynx with xylazine and ketamine-hydrochloride. *Journal of Wildlife Diseases* 30, 65-68.
- Ferreras, P., Beltrán, J. F., Aldama, J. J., Delibes, M., 1997. Spatial organization and land tenure system of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology* 243, 163-189.
- Ferreras, P., Rodríguez, A., Palomares, F., Delibes, M., 2010. Iberian lynx: the uncertain future of a critically endangered cat, in: Macdonald, D., Loveridge, A. (Eds.), *Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 507-520.
- Fix, A.S., Riordan, D.P., Hill, H.T., Gill, M.A., Evans, M.B., 1989. Feline panleukopenia virus and subsequent canine distemper virus infection in two snow leopards (*Panthera uncia*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 20, 273-281.
- Fleming, I.A., 1994. Captive breeding and the conservation of wild salmon populations. *Conservation Biology* 8, 886-888.



- Fletcher, K.C., 1978. Notoedric mange in a litter of snow leopards. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 1231-1232.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126, 131-140.
- Frankham, R., 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17, 325–333.
- Furtado, M.M., Filoni, C., 2008. Diseases and their role for jaguar conservation. *Cat News Special Issue 4*, 35-40.
- Gañán, N., González, R., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2009. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, 848-859.
- Gañán, N., Sestelo, A., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M.J., López-Bao, J.V., Palomares, F., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2010. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139, 275-285.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinar Parasitology* 167, 36-42.
- García-Perea, R., 2000. Survival of injured Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and non-natural mortality in central-southern Spain. *Biological Conservation* 93, 265-269.
- García, I., Martínez, F., Vargas, A., Pastor, J., Bach-Raich, E., Muñoz, A., Zorrilla, I., 2009. Serum biochemical parameters for the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*): reference values, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Garner, M.M., Lung, N.P., Citino, S., Greiner, E.C., Harvey, J.W., Homer, B.L., 1996. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Veterinary Pathology* 33, 82-86.

- Gil-Sánchez, J.M., Molino Garrido, F., Valenzuela Serrano, G., 1997. Nota sobre la alimentación del lince ibérico en el Parque Natural de la Sierra de Andújar (Sierra Morena Oriental). *Doñana Acta Vertebrata* 24, 204-206.
- Gilpin, M. E., Soulé, M.E., 1986. Minimum viable populations: processes of species extinctions, in: Soulé, M.E. (Ed.), *Conservation biology-the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 19-34.
- Godoy, J.A., Casas, M., Fernández, J., 2009. Genetic issues in the implementation of Iberian lynx Ex situ Conservation Programme, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Gómez-Villamandos R.J., Velarde J., Domínguez J.M., Granados M.M., Villalobos C.M., Galka M.E., 2007. Sevoflurane anaesthesia in Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Record* 160, 592-593.
- Gonçalves da Silva, A., Lalonde, D.R., Quse, V., Shoemaker, A., Russello, M.A., 2010. Genetic approaches refine *ex situ* lowland tapir (*Tapirus terrestris*) conservation. *Journal of Heredity* 101, 581-590.
- González, R., Gomendio, M., Vargas, A., Roldán, E.R.S., 2007. Death on the road and rescue in the lab: female gamete recovery and conservation in the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*), in: *Felid Biology and Conservation, An International Conference*. The Wildlife Conservation Research Unit, Oxford University Panthera Population, IUCN/SSC Cat Specialist Group. 17-20 September, Oxford.
- Göritz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T.B., Naidenko, S.V., Vargas, A., Martínez, F., López-Bao, J.V, Palomares, F., Jewgenow, K., 2009. Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx - ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 87-91.
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research* 52, 81-87.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J., 2008. Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *Plos ONE* 3, e2776.

- Graells, M. P., 1897. Fauna mastozoológica ibérica. Memorias de la Real Academia de Ciencias, XVII. Madrid.
- Guzmán, J.N, García, F.J., Garrote, G., Pérez de Ayala, R., Iglesias, C., 2004. El lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Censo diagnóstico de las poblaciones. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid, 184 pp.
- Haines, A.M., Tewes, M.E., Laack, L.L., 2005. Survival and sources of mortality in ocelots. *Journal of Wildlife Management* 69, 255-263.
- Harrison, T.M., Sikarskie, J., Kruger, J., Wise, A., Mullaney, T.P., Kiupel, M., Maes, R.K., 2007. Systemic calicivirus epidemic in captive exotic felids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 292-299.
- Helman, R.G., Russell, W.C., Jenny, A., Miller, J., Payeur, J., 1998. Diagnosis of tuberculosis in two snow leopards using polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 89-92.
- Henriksen, H.B., Reidar, A., Hewison, A. J. Mark., Gaillard, J-M., Bronndal, M., Jonsson, S., John D. C. Linnell, J.D.C, Odden, J., 2005. Reproductive biology of captive female Eurasian lynx, *Lynx lynx*. *European Journal of Wildlife Research* 51, 151-156.
- Hope, K., Deem, S.L., 2006. Retrospective study of morbidity and mortality of captive jaguars (*Panthera onca*) in North America: 1982-2002. *Zoo Biology* 25, 501-512.
- Howard, J.G., Wildt, D.E., 2009. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 71, 130-148.
- IUCN (World Conservation Union), 1987. The IUCN policy statement on captive breeding. IUCN, Gland, Switzerland.
- IUCN, 1998. Guidelines for reintroductions. Prepared by the IUCN/SSC Reintroduction Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- IUCN, 2007. IUCN Red list of threatened species. IUCN, Gland, Switzerland.
- IUCN, 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 04 November 2011.

- IUCN/MIMAM, 1999. Taller PHVA: Análisis de la viabilidad de población y del hábitat para el lince ibérico (*Lynx pardinus*). Heredia, B., Gaona, P., Vargas, A., Ellis, S., Seal, U. (Eds.), IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. Apple Valley, MN.
- IUDZG/CBSG, 1993. The world zoo conservation strategy: the role of zoos and aquaria of the world in global conservation. Chicago Zoological Society, Brookfield, Illinois.
- Jager, H.G., Booker, H.H., Hubschle, O.J., 1990. Anthrax in cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in Namibia. *Journal of Wildlife Diseases* 26, 423-424.
- Jauniaux, T.P., De Clercq, K.E., Cassart, D.E., Kennedy, S., Vandebussche, F.E., Vandemeulebroucke, E.L., Vanbinst, T.M., Verheyden, B.I., Goris, N.E., Coignoul, F.L., 2008. Bluetongue in Eurasian lynx. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1496-1498.
- Jewgenow, K., Naidenko, S.V., Göritz, F., Vargas, A., Dehnhard, M., 2006. Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian lynx (*Lynx pardinus*) by fecal testosterone metabolite measurement. *General and Comparative Endocrinology* 149, 151-158.
- Jiménez, M.A., Sánchez, B., García, P., Pérez, M.D., Carrillo, M.E., Morena, F.J., Peña, L., 2009. Diseases of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*): histopathological survey, lymphoid depletion, glomerulonephritis and related clinical findings, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex-situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Jiménez, M.A., Sánchez, B., Pérez Alenza, M.A., García, P., López, J.V., Rodríguez, A., Muñoz, A., Martínez, F., Vargas, A., Peña, L., 2008. Membranous glomerulonephritis in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 34-43.
- Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., Teeling, E., O'Brien, S.J., 2006. The late miocene radiation of modern felidae: A genetic assessment. *Science* 311, 73-77.
- Joslin, J.O, Amand, W., Cook, R., Hinshaw, K., McBain, J., Oosterhuis, J., 1998. Guidelines for Zoo and Aquarium Veterinary Medical Programs and Veterinary Hospitals. Veterinary standards committee, American Association of Zoo Veterinarians.

- Joslin, J.O., Garner, M., Collins, D., Kamaka, E., Sinibaldi, K., Meleo, K., Montali, R., Sundberg, J., Jenson, A.B., Ghim, S., Davidow, B., Hargis, A.M., West, K., Clark, T., Haines, D., 2001. Viral Papilloma and squamous cell carcinomas in snow leopards (*Uncia uncia*). Proceedings AAZV and IAAAM Joint Conference, Orlando, Florida, pp. 155-158.
- Junge, R.E., Miller, E., Boever, W.J., Scherba, G., Sundberg, J., 1991. Persistent cutaneous ulcers associated with feline herpesvirus type 1 infection in a cheetah. Journal of the American Veterinary Medical Association 198, 1057-1058.
- Kaczensky, P., 1991. Untersuchungen zur Raumnutzung weiblicher Luchse (*Lynx lynx*), sowie zur Abwanderung und Mortalität ihrer Jungen im Schweizer Jura. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Wildbiologie und Jagdkunde der Forstwissenschaftlichen Fakultät an der Universität München.
- Kadoi, K., Kiryu, M., Iwabuchi, M., Kamata, H., Yukawa, M., Inaba, Y., 1997. A strain of calicivirus isolated from lions with vesicular lesions on tongue and snout. The New Microbiologica 20, 141-148.
- Kazensky, C.A., Munson, L., Seal, U.S., 1998. The effects of melengestrol acetate on the ovaries of captive wild felids. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 29, 1-5.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M., Poovorawan, Y., 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerging Infectious Diseases 10, 2189-2191.
- Keet, D.F., Kriek, N.P., Penrith, M.L., Michel, A., Huchzermeyer, H., 1996. Tuberculosis in buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park: spread of the disease to other species. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 63, 239-244.
- Keet, D.F., Michel, A., Brebner, K., Kriek, N., Meltzer, D.G.A., 2005. Bovine tuberculosis and its effect on lions (*Panthera leo*) in the Kruger National Park. Felid TAG Conference Proceedings, St. Louis, Missouri, pp. 23-24.
- Kennedy-Stoskopf, S., 2005. Feline herpes virus-1 issues in non-domestic felids. Felid TAG Conference Proceedings, St. Louis, Missouri, pp. 44-46.

- Kennedy, M., Citino, S., McNabb, A.H., Moffatt, A.S., Gertz, K., Kania, S., 2002. Detection of feline coronavirus in captive *Felidae* in the USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 520-522.
- Kenny, D.E., Lappin, M.R., Knightly, F., Baier, J., Brewer, M., Getzy, D.M., 2002. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus felis manul*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33, 131-138.
- Ketz-Riley, C.J., Ritchey, J.W., Hoover, J.P., Johnson, C.M., Barrie, M.T., 2003. Immunodeficiency associated with multiple concurrent infections in captive Pallas' cats (*Otocolobus manul*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34, 239-245.
- Kinsel, M. J., Briggs, M.B., Venzke, K., Forge, O., Murnane, R.D., 1998. Gastric spiral bacteria and intramuscular sarcocysts in African lions from Namibia. *Journal of Wildlife Diseases* 34, 317-324.
- Kitchener, A.C., 1999. Mate killing in clouded leopards: a hypothesis. *International Zoo News*, 221-224.
- Kolmstetter, C., Munson, L., Ramsay, E.C., 2000. Degenerative spinal disease in large felids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31, 15-19.
- Krelekamp, C.J., 2004. Husbandry guidelines Eurasian Lynx (*Lynx lynx* spp). European Association of Zoos and Aquaria.
- Kruuk, L.E.B., Clutton-Brock, T.H., Albon, S.D., Pemberton, J.M., Guinness, F.E., 1999. Population density affects sex ration variation in red deer. *Nature* 399, 459-461.
- Kvam, T., 1991. Reproduction in the European lynx, *Lynx lynx*. *Z. Säuge- tierkunde* 56, 146-158.
- Lacy, R.C., Petric, A., Warneke, M., 1993. Inbreeding and outbreeding in captive populations of wild animals, in: XXX (Eds.), *The natural history of inbreeding and outbreeding: Theoretical and empirical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago.
- Lacy, R.C., Vargas, A., 2004. Informe sobre la gestión genética y demográfica del programa de cría para la conservación del lince ibérico: Escenarios, conclusiones y recomendaciones. Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley (MN) y Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

- Landolfi, J., Terio, K.A., 2006. Transitional cell carcinoma in fishing cats (*Prionailurus viverrinus*): Pathology and expression of cyclooxygenase-1, -2, and p53. *Veterinary Pathology* 43, 674-681.
- Lantos, Á., Niemann, S., Mezösi, L., Sós, E., Erdélyi, K., Dávid, S., Parsons, L.M., Kubica, T., Rüscher-Gerdes, S., Somoskövi, A., 2003. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in captive Siberian tiger. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1462-1464.
- León-Quinto, T., Simón, M.A., Cadenas, R., Jones, J., Ruiz, V., Soria, B., 2009. An Iberian lynx biological resource bank and its applications to the *in situ* and *ex situ* conservation of the species, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Lewis, C.E., Bemis, D.A., Ramsay, E.C., 2002. Positive effects of diet change on shedding of *Salmonella spp.* in the feces of captive felids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 33, 83-84.
- Life Lince. Dirección URL: <<http://www.lifelince.org/pagina.aspx?id=94>>. [Consulta: 12 Diciembre 2012].
- Liptrap, R.M., 1993. Stress and reproduction in domestic animals. *Annals of New York Academy of Science* 697: 275-284.
- López-Bao, J. V., Palomares, F., Rodríguez, A. and Delibes, M., 2010. Effects of food supplementation on home-range size, reproductive success, productivity and recruitment in a small population of Iberian lynx. *Animal Conservation* 13, 35–42.
- López-Bao, J.V., Rodríguez, A., Palomares, F., 2008. Response of a trophic specialist, the Iberian lynx, to supplementary food: Patterns of food use and implications for conservation. *Biological Conservation* 141, 1857-1867.
- López, G., López, M., Fernández, L., Martínez-Granados, C., Martínez, F., Meli, M. L., Gil-Sánchez, J.M., Viqueira, N., Díaz-Portero, M. A., Cadenas, R., Lutz, H., Vargas, A., Simón, M.A., 2009. Management measures to control a FeLV outbreak in the endangered Iberian lynx. *Animal Conservation* 12, 173-182.
- Luaces, I., Aguirre, E., Garcia-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M.A., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Sainz, A., 2005. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Wildlife Diseases* 41, 810-815.

- Luaces, I., Doménech, A., García-Montijano, M., Collado, V.M., Sánchez, C., Tejerizo, J.G., Galka, M., Fernández, P., Gómez-Lucía, E., 2008. Detection of feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 381-385.
- Lutz, H., R. Hofmann-Lehmann, D. Fehr, C. Leutenegger, M. Hartmann, P. Ossent, M. Grob, M. Elgizoli, and P. Weilenmann. 1996. Liberation into the wild of wild felines-danger of the release of virus infections. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 138, 579-585.
- Macri, N.P., Stevenson, G.W., Wu, C.C. 1997. *Salmonella arizonae* sepsis in a lynx. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 908-911.
- Marker, L., 2011. International Studbook Cheetah. Conservation Fund, Otjiwarongo, Namibia.
- Marker, L., Munson, L., Basson, P.A., Quackenbush, S.J., 2003. Multicentric T-cell lymphoma associated with feline leukemia virus infection in a captive namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases* 39, 690-695.
- Martin, M.S., Shepherdson, D.J., 2012. Role of familiarity and preference in reproductive success in *ex situ* breeding programs. *Conservation Biology* 26, 649-656.
- Martínez, 2007. Inmovilización reversible en el lince ibérico (*Lynx pardinus*) con la combinación de ketamina y medetomidina. Diploma de Estudios Avanzados. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.
- McBurney, S., Banks, D., Anderson, D., 1998. Morbillivirus infection in four lynx. *Supplement to The Journal of Wildlife Diseases* 34, 1.
- McCallum, H., 2008. Tasmanian devil facial tumor disease: lessons for conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 631-637.
- Meli, M.L., Cattori, V., Martínez, F., López, G., Vargas, A., Simón, M.A., Zorrilla, I., Muñoz, A., Palomares, F., López-Bao, J.V., Pastor, J., ZTandon, R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., 2009. Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS ONE*, 4(3):e4744.



- Meli, M.L., Simmler, P., Cattori, V., Martínez, F., Vargas, A., Palomares, F., López-Bao, J.V., Simón, M.A., López, G., León-Vizcaino, L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., 2010. Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary Microbiology*, 132-137.
- Meltzer, D.G.A., 1999. Medical management of a cheetah breeding facility in South Africa, in: Fowler, M.E., Miller, R.E. (Eds.), *Zoo and wild animal medicine: current therapy*, 4th edn. W.B. Saunders Company, pp. 415-423.
- Mellen, J.D., Sheperdson, D.J., 1997. Environmental enrichment for felids: an integrated approach. *International Zoo Yearbook* 35, 191-197.
- Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Journal* 182, 114-124.
- Millán, J., Naranjo, V., Rodríguez, A., Pérez de la Lastra, J.M., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2007b. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of Cytauxzoon species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology* 134, 995-1001.
- Millward, I.R., Williams, M.C., 2005. Cryptococcus neoformans granuloma in the lung and spinal cord of a free-ranging cheetah (*Acinonyx jubatus*). A clinical report and literature review. *Journal of the South African Veterinary Association* 76, 228-232.
- MIMAM, 1999. Estrategia nacional para la conservación de lince ibérico. Dirección General para la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España.
- Mochizuki, M., Hiragi, H., Sueyoshi, M., Kimoto, Y., Takeishi, S., Horiuchi, M., Yamaguchi, R., 1996. Antigenic and genomic characteristics of parvovirus isolated from a lion (*Panthera leo*) that died of feline panleukopenia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 27, 416-420.
- Morais, R.N., Mucciolo, R.G., Gomes, M.L.F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N., Graham, L.H., Swanson, W.F., Brown, J.L., 2002. Seasonal analysis of seminal characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57, 2027-2041.

- Moreno, S., Villafuerte, R., 1995. Traditional management of scrubland for the conservation of rabbits *Oryctolagus cuniculus* and their predators in Doñana National Park, Spain. *Biological Conservation* 73, 81–85.
- Moreno, S., Villafuerte, R., Cabezas, S., Lombardi, L., 2004. Wild rabbit restocking for predator conservation in Spain. *Biological Conservation* 118, 183–193.
- Morita, T., T. Awakura, A. Shimada, T. Umemura, T. Nagai, and A. Haruna. 1995. Vitamin D toxicosis in cats: natural outbreak and experimental study. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 831-837.
- Mowat, G., Slough, B.G., Boutin, S., 1996. Lynx recruitment during a snowshoe hare population peak and decline in south-west Yukon. *Journal of Wildlife Management* 60, 441–452.
- Munson, L., 1993. Diseases of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*): Results of the cheetah research council pathology survey, 1989-1992. *Zoo Biology* 12, 105-124.
- Munson, L., 1994. A high prevalence of ovarian papillary cystadenocarcinomas in jaguars (*Panthera onca*). *Veterinary Pathology* 31, 604.
- Munson, L., 2001. Feline morbillivirus infection, in: Williams, E.S., Barker, I.K. (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 3rd edn. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 59-63.
- Munson, L., Citino, S. B., 2005. Proceedings of the AZA. Cheetah SSP Disease Management Workshop, White Oak. Conservation Center, Yulee, Florida.
- Munson, L., Cook, R.A., 1993. Monitoring, investigation, and surveillance of diseases in captive wildlife. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24, 281-290.
- Munson, L., Terio, K.A., Kock, R., Mlengeya, T., Roelke, M.E., Dubovi, E., Summers, B., Sinclair, A.R.E., Packer, C., 2008. Climate extremes promote fatal co-infections during Canine Distemper epidemics in African lions. *Plos ONE* 3, e2545.
- Munson, L., Terio, K.A., Ryser, M.P., Lane, E., Courchamp F., 2010. Wild felid diseases: Conservation implications and management strategies, in: Macdonald, D., Loveridge, A. (Eds.), *Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 237-260.

- Munson, L., Terio, K.A., Worley, M., Jago, M., Bagot-Smith, A., Marker, L., 2005b. Extrinsic factors significantly affect patterns of disease in free-ranging and captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) populations. *Journal of Wildlife Diseases* 41, 542-548.
- Munson, L., Wack, R., Duncan, M., Montali, R.J., Boon, D., Stalis, I., Crawshaw, G.J., Cameron, K.N., Mortenson, J., Citino, S., Zuba, J., Junge, J.E., 2004. Chronic eosinophilic dermatitis associated with persistent feline herpes virus infection in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 41, 170-176.
- Mwanzia, J.M., Kock, R.A., Wambna, J.M., Kock, N.D., Jarrett, O., 1995. An outbreak of sarcoptic mange in free living cheetah (*Acinonyx jubatus*) in the Mara region of Kenya. *Proceedings AAZV/WDA/AAWV Joint Conference, East Lansing, Michigan*, pp. 95-102.
- Nagao, Y., Nishio, Y., Shiomoda, H., Tamaru, S., Shimojima, M., Goto, M., Une, Y., Sato, A., Ikebe, Y., Maeda, K., 2012. An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): possible transmission from wild animals to zoo animals. *The Journal of Veterinary Medical Science* 74, 699-705.
- Naidenko, S.V., Erofeeva, M., Göritz, F., Neubauer, K., Fickel, J., Jewgenow, K., 2007. Eurasian lynx male reproductive success with multi-male mating in captivity. *Acta Zoolog Sin* 53, 408–416.
- Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *Journal of Wildlife Diseases* 38, 607-610.
- Nilsen, E. B., Brøseth, H., Odden, J., & Linnell, J. D., 2010. The cost of maturing early in a solitary carnivore. *Oecologia* 164, 943-948.
- O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J.F., Bush, M., Wildt, D.E., 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227, 1428-1434.
- O'Regan, H.J., Kitchener, A.C., 2005. The effects of captivity on the morphology of captive, domesticated and feral mammals. *Mammal Review* 35, 215-230.
- Oates, J. F., 1999. *Myth and reality in the rainforest: how conservation strategies are failing in West Africa*. University of California Press, Berkeley, California.

- Owston, M.A., Ramsay, E.C., Rotstein, D.S., 2008. Neoplasia in felids at the Knoxville Zoological Gardens, 1979-2003. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39, 608-613.
- Palomares, F., Caro, T.M., 1999. Interspecific killing among mammalian carnivores. *The American Naturalist* 153, 492-508.
- Palomares, F., Delibes, M., Ferreras, P., Fedriani, J.M., Calzada, J., Revilla, E., 2000. Iberian lynx in a fragmented landscape: Pre-dispersal, dispersal and post-dispersal habitats. *Conservation Biology* 14, 809-818.
- Palomares, F., Delibes, M., Revilla, E., Calzada, J., Fedriani, J.M., 2001. Spatial ecology of the Iberian lynx and abundance of European rabbit in southwestern Spain. *Wildlife Monographs* 148, 1-36.
- Palomares, F., Godoy, J. A., López-Bao, J. V., Rodríguez, A., Roques, S., Casas-Marce, M., Revilla, E., Delibes, M., 2012. Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conservation Biology* 26, 689-697.
- Palomares, F., Revilla, E., Calzada, J., Fernández, N., Delibes, M., 2005. Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biological Conservation* 122, 53-59.
- Papendick, R.E., Munson, L., O'Brien, T.D., Johnson, K.H., 1997. Systemic amyloidosis in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 34, 549-56.
- Pastor, J., 2009. Hematology reference values for the Iberian Lynx, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Paz, R.C.R.D., Gonçalves, R.M., Carciofi, A.C., Guimarães, M.A.B.V., Pessuti, C., Santos, E.F., Ferreira, F., Barnabe, R.C., 2006. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars (*Panthera onca*) in Brazilian zoos. *International Zoo Yearbook* 40, 351-359.
- Peixoto, P.V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S.S., 2007. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Veterinary Parasitology* 145, 383-387.

- Pelican, K.M., Abaigar, T., Vargas, A., Rodríguez, J.M., Bergara, J., Rivas, A., López, J., Brown, J., Wildt, D.E., 2009. Unusual gonadal hormone profiles in the Iberian as determined by fecal monitoring, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 341-351.
- Peña, L., García, P., Jiménez, M.A., Benito, A., Pérez Alenza, M.D, Sánchez, B., 2006. Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 29, 114-126.
- Pérez, J., Calzada, J., León-Vizcaíno L., Cubero, M.J., Velarde, J., Mozos, E., 2001. Tuberculosis in an Iberian lynx (*Lynx pardina*). *Veterinary Record* 148, 414-415.
- Pettan-Brewer, K.C., Lowenstine, L.J., 1999. Intrahepatic cysts and hepatic neoplasms in felids, ursids, and other zoo and wild animals, in: Fowler, M.E., Miller, R.E. (Eds), *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy 4*. W.B. Saunders Company, Philadelphia Pennsylvania, pp. 423-428.
- Pianka, E. R., Parker, W. S., 1975. Age-specific reproductive tactics. *American Naturalist*, 453-464.
- Poli, A., Abrama, F., Cavicchio, P., Bandecchi, P., Ghelardi, E., Pistello, M., 1995. Lentivirus infection in an African lion: A clinical, pathologic and virologic study. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 70-74.
- Pollak, J.L., Lacy, R.C., Ballou, J.D., 2002. PM2000: population management software. Cornell University, Ithaca, New York.
- Pope, C.E., Gomez, M.C., Dresser, B.L., 2006. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology* 66, 1518-1524.
- Pukazhenth, B., Comizzoli, P., Travis, A.J., Wildt, D.E., 2006. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 77-90.
- Queen, J., Bennett, D., Carmichael, S.C., Gibson, N., Li, A., Payne-Johnson, C.E., Kelly, D.F., 1998. Femoral neck metaphyseal osteopathy in the cat. *Veterinary Record* 142, 159-162.

- Quigley, K.S., Evermann, J.F., Leathers, C.W., Armstrong, D.L., Goodrich, J., Duncan, N.M., Miquelle, D.G., 2010. Morbillivirus infection in a wild siberian tiger in the Russian Far East. *Journal of Wildlife Diseases*, 1252-1256.
- Rabinowitz, A., 1995. Helping a species go extinct: the Sumatran rhino in Borneo. *Conservation Biology* 9, 482–488.
- Rahbek, C., 1993. Captive breeding—a useful tool in the preservation of biodiversity?. *Biodiversity and Conservation* 2, 426-437.
- Ralls, K., Ballou, J., 1986. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends in Ecology Evolution* 1, 19–22.
- Ralls, K., Ballou, J.D., Templeton, A., 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology* 2, 185–193.
- Rivas, A., Vargas, A., Martínez, F., Aguilar, J.M., Quevedo, M.A., Cuadrado, M., Sánchez, M., 2009. Hand-rearing of Iberian lynx kittens, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.
- Robert, A., 2009. Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation* 142, 2915–2922.
- Robertson, B. C., Elliott, G. P., Eason, D. K., Clout, M. N., Gemmill, N. J., 2006. Sex allocation theory aids species conservation. *Biology letters* 2, 229-231.
- Rodríguez, A., Delibes, M., 1992. Current range and status of the Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biological Conservation* 61, 189-196.
- Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M.C., O'Brien, S.J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G.L.M., Mgas, M.N., Machange, G.A., Summers, B.A., Appel, M.J.G., 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379, 441-445.
- Roelke, M.E., Johnson, W.E., Millán J., Palomares F., Revilla E., Rodríguez A., Calzada J., Ferreras P., León-Vizcaíno, L., Delibes, M., O'Brien, S.J., 2008. Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *European Journal of Wildlife Research* 54, 171-178.

- Roelke, M.E., Martenson, J.S., O'Brien, S.J., 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology* 3, 340-350.
- Roldán, E.R.S., Gomendio, M., Garde, J.J., Gañán, N., González, R., Crespo, C., Arregui, L., 2009. A genetic resource bank and assisted reproduction for the critically endangered Iberian lynx, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex-situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 305-314.
- Rosenfeld, C. S., Roberts, R. M., 2004. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biology of Reproduction* 71, 1063-1070.
- Rotstein, D.S., Thomas, R., Helmick, K., Citino, S.B., Taylor, S.K., Dunbar, M.R., 1999. Dermatophyte infections in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30, 281-284.
- Ryser-Degiorgis, M.P., 2009. Planning of Veterinary Supervision for Translocation Programmes of Wild Felids. Conservation of free-ranging Iberian lynx (*Lynx pardinus*) populations in Andalusia, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 489-498.
- Ryser-Degiorgis, M.P., Ryser, A., Bacciarini, L.N., Angst, C., Gottstein, B., Janovsky, M., Breitenmoser, U., 2002. Notoedric and sarcoptic mange in free-ranging lynx from Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases* 38, 228-232.
- Sakai, H., Yanai, T., Yonemaru, K., Hirata, A., Masegi, T., 2003. Gallbladder adenocarcinomas in two captive African lions (*Panthera leo*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34, 302-306.
- Schaller, G.B., 1972. *The Serengeti Lion*. University of Chicago Press.
- Schmidt-Posthaus, H., Breitenmoser-Würsten, C., Posthaus, H., Bacciarini, L., Breitenmoser, U., 2002. Causes of mortality in reintroduced Eurasian Lynx in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases* 38, 84-92.
- Schrieffl, S., Steinberg, T.A., Matiasek, K., Ossig, A., Fenske, N., Fischer, A., 2008. Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004). *Journal of American Veterinary Medical Association* 233, 1591-1597.

- Schroder, H.-D., Ludwig, C., Jakob, W., Reischl, U., Stolte, M., Lehn, N., 1998. Chronic gastritis in tigers associated with *Helicobacter acinonyx*. *Journal of Comparative Pathology* 119, 67-73.
- Schulz, K. 2006. Diseases of the joints, in: Fossum, T.W., Hedlund, C.S., Johnson, A.L., Schulz, K.S., Willard III, M.D., Bahr, A., Carroll, G.L., (Eds.), *Small Animal Surgery*, 3rd ed. Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, pp. 1143-1315.
- Seal, U.S., Ellis, S.A., Foose, T.J., Byers, A.P., 1993. Conservation assessment and management plans (CAMPs) and global action plans (gcaps). *Captive Breeding Specialist Group Newsletter* 4, 5–10.
- Shoemaker, A.H., Maruska, E.J., Rockwell, R., 1997. *Minimum Husbandry Guidelines for Mammals: Large Felids*. American Association of Zoos and Aquariums. XX
- Simón, M.A., Cadenas, R., Gil-Sánchez, J.M., López-Parra, M., García, J., Ruiz, G., López, G., 2009. Conservation of free-ranging Iberian lynx (*Lynx pardinus*) populations in Andalusia, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex-situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 43-55.
- Simón, M.A., Gil-Sánchez, J.M., Ruiz, G., Garrote, G., McCain, E.B., Fernández, L., López-Parra, M., Rojas, E., Arenas-Rojas, R., Rey, T.D., García-Tardío, M., López, G., 2012. Reverse of the decline of the endangered Iberian lynx. *Conservation Biology* 26, 731-736.
- Sleeman, J.M., Keane, J.M., Johnson, J.S., Brown, R.J., Woude, S.V., 2001. Feline leukemia virus in a captive bobcat. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 194-200.
- Snyder, N.F.R., Derrickson, S.R., Beissinger, S.R., Wiley, J.W., Smith, T.B., Toone, W.D., Miller, B., 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biology* 10, 338–348.
- Sobrino, R., Cabezón, O., Millán, J., Pabón, M., Arnal, M.C., Luco, D.F., Gortázar, C., Dubey, J.P., Almeria, S., 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 148, 187-192.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155, 198-203.



- Sokolov, V.E., Naidenko, S.V., Serbenyuk, M.A., 1994. Specific fights of young lynxes (*Felis lynx*, Carnivora, Felidae). *Zoologicheskii Zhurnal* 73, 132–137.
- Stahl, P., Vandell, J.-M., 1999. Mortalité et captures de lynx (*Lynx lynx*) en France (1974-1998). *Mammalia* 63, 49-59.
- Stearns, S.C., 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Stehlik, J., 2000. Reproductive biology of the European lynx, *Lynx lynx* (Linnaeus, 1758) at Ostrava Zoo. *Zoologische Garten* 70, 351-360.
- Steinel, A., Munson, L., Van Vuuren, M., Truyen, U., 2000. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology* 80, 345-350.
- Sundberg, J.P., Montali, R.J., Bush, M., Phillips Jr, L.G., O'Brien, S.J., Jenson, A.B., Van Ranst, M., Burk, R.D., 1996. Papillomavirus-associated focal oral hyperplasia in wild and captive asian lions (*Panthera leo persica*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 27, 61-70.
- Sundberg, J.P., Van Ranst, M., Montali, R., Homer, B.L., Miller, W.H., Rowland, P.H., Scott, D.W., England, J.J., Dunstan, R.W., Mikaelian, I., Jenson, A.B., 2000. Feline papillomas and papillomaviruses. *Veterinary Pathology* 37, 1-10.
- Sutherland-Smith, M., Harvey, C., Campbell, M., McAloose, D., Rideout, B., Morris, P., 2004. Transitional cell carcinoma in fishing cats (*Prionailurus viverrinus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35, 370-380.
- Swanson, W.F., 1999. Toxoplasmosis and neonatal mortality in Pallas' cats: a survey of North American zoological institutions. *Proceedings AAZV Annual Conference*, Columbus, Ohio, pp. 347-350.
- Swanson, W.F., 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66, 49-58.
- Swanson, W.F., Johnson, W.E., Cambre, R.C., Citino, S.B., Quigley, K.B., Brousset, D.M., Morais, R.N., Moreira, N., O'Brien, S.J., Wildt, D.E., 2003. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. *Zoo Biology* 22, 421–441.

- Sykes, J.M. 4th, Ramsay, E.C., 2007. Attempted treatment of tigers (*Panthera tigris*) infected with *Microsporium canis*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 252-257.
- Tear, T.H., Scott, J.M., Hayward, P.H., Griffith, B., 1993. Status and prospects for success of the Endangered Species Act: a look at recovery plans. *Science* 262, 976–977.
- Terio, K.A., Munson, L., Marker, L., Aldridge, B.M., Solnick, J.V., 2005. Comparison of *Helicobacter spp.* in cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with and without gastritis. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 229-234.
- Terio, K.A., O'Brien, T., Lamberski, N., Famula, T.R., Munson, L., 2008. Amyloidosis in black-footed cats (*Felis nigripes*). *Veterinary Pathology* 45, 393-400.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tantilercharoen, R., Damronwatanpokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Rantanamungklanon, S., Lekdumrongsak, T., Kerdangsakonwut, S., Tunhikorn, S., Poovorawant, Y., 2005. Possible tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases* 11, 699-701.
- Torres, J., García-Perea, R., Gisbert, J., Feliu, C., 1998. Helminth fauna of the Iberian lynx, *Lynx pardinus*. *Journal of Helminthology* 72, 221-226.
- Trinkel, M., Cooper, D., Packer, C., Slotow, R., 2011. Inbreeding depression increases susceptibility to bovine tuberculosis in lions: an experimental test using an inbred-outbred contrast through translocation. *Journal of Wildlife Diseases* 47, 494-500.
- USFWS, 2008. Florida Panther recovery plan (*Puma concolor coryi*), third revision. U.S Fish and Wildlife Service, Atlanta, Georgia.
- Valicek, L., Smid, B., Vahala, J., 1993. Demonstration of parvovirus in diarrhoeic African cheetahs (*Acinonyx jubatus jubatus*). *Veterinarni Medicina (Praha)* 38, 245-249.
- Valverde, J. A., 1963. Información sobre el lince español. Ministerio de Agricultura, Direccion General de Montes, Caza y Pesca Fluvial, Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza, Madrid.
- Van Rensburg, I.B., Silkstone, M.A., 1984. Concomitant feline infectious peritonitis and toxoplasmosis in a cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of the South African Veterinary Association* 55, 205-207.

- Van Vuuren, M., Goosen, T., Rogers, P., 1999. Feline herpesvirus infection in a group of semi-captive cheetahs. *Journal of the South African Veterinary Association* 70, 132-134.
- Vargas, A., Sánchez, I., Godoy, J., Roldán, E., Martínez, F., Simón, M.A., 2008. Plan de Acción para la cría en cautividad del linco ibérico. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid & Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.
- Vargas, A., Sánchez, I., Martínez, F., Rivas, A., Godoy, J.A., Roldán, E., Simón, M.A., Serra, R., Pérez, M.J., Delibes, M., Aymerich, M., Breitenmoser, U., 2009. Interdisciplinary methods in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) Conservation Breeding Program, in: Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. (Eds.), *Iberian Lynx Ex-situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain, pp. 57-71.
- Vicente, J., Palomares, F., Ruiz de Ibanez, R., Ortiz, J., 2004. Epidemiology of *Ancylostoma spp.* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the Doñana National Park, south-west Spain. *Journal of helminthology* 78, 179-184.
- Virgós, E., Cabezas-Díaz, S., Lozano, J., 2007. Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain?. Sociological constraints in the conservation of species. *Biodiversity and Conservation* 16, 3489-3504.
- Wack, R.F., Kramer, L.W., Cupps, W., 1992. Griseofulvin toxicity in four cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 23, 442-446.
- Wasieri, J., Schmiedeknecht, G., Forster, C., König, M., Reinacher, M., 2009. Parvovirus infection in a Eurasian lynx (*Lynx lynx*) and in a European wildcat (*Felis silvestris silvestris*). *Journal of Comparative Pathology* 140, 203-207.
- Wauters, L.A., Crombrughe, S.Ad., Nour, N., Matthysen, E., 1995. Do female roe deer in good condition produce more sons than daughters?. *Behav Ecol Sociobiol* 37, 189-193.
- Wielebnowski, N., Brown, J.L., 1998. Behavioral correlates of physiological estrus in cheetahs. *Zoo Biology* 17, 193-209.
- Wielebnowski, N.C., Ziegler, K., Wildt, D.E., Lukas, J., Brown, J.L., 2002. Impact of social management on reproductive, adrenal and behavioural activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Animal Conservation* 5, 291-301.

- Wildt, D., Swanson, W., Brown, J., Silwa, A., Vargas, A., 2010. Felids *ex situ*: managed programmes, research, and species recovery, in: Macdonald, D., Loveridge, A. (Eds.), *Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 217-236.
- Willi, B., Filoni, C., Catao-Dias, J.L., Cattori, V., Meli, M.L., Vargas, A., Martínez, F., Roelke, M.E., Ryser-Degiorgis, M.P., Leutenegger, C.M., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2007. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1159-1166.
- Williams, E.S., Thorne, E.T., Appel, M.J., Belitsky, D.W., 1988. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases* 24, 385-398.
- Woodford, M.H., 2001. Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release into the wild. Office International des Epizooties, Veterinary Specialist Group/ Species Survival Commission of the World Conservation Union (IUCN), Care for the Wild International and the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians.
- Yu, C.H., Kim, K.T., Hwang, D.N., Yhee, J.Y., Moon, C.T., Hur, T.Y., Sur, J.H., 2007. Peribiliary cysts associated with severe liver disease: a previously unrecognized tumor in a lion (*Panthera leo*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 709-712.

