



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCION DE VIRUS DISTEMPER CANINO EN CARNIVOROS
SILVESTRES EN CAUTIVERIO Y DE VIDA LIBRE CLINICAMENTE SANOS
EN CHILE**

CONSUELO ANDREA VEGA KLEIN

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico

Veterinario

Departamento de Medicina

Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: EZEQUIEL HIDALGO HERMOSO

PARQUE ZOOLOGICO BUIN ZOO

PROYECTO BUIN ZOO PARA LA CONSERVACIÓN DEL ZORRO CHILOTE

SANTIAGO, CHILE

2019



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCION DE VIRUS DISTEMPER CANINO EN CARNIVOROS
SILVESTRES EN CAUTIVERIO Y DE VIDA LIBRE CLINICAMENTE SANOS
EN CHILE**

CONSUELO ANDREA VEGA KLEIN

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

Nota Final:

Prof. Guía: Ezequiel Hidalgo Hermoso

Profesor Corrector: Carlos Navarro Venegas

Profesor Corrector: Pedro Abalos Pineda

SANTIAGO, CHILE

2019

RESUMEN

El virus distemper canino (VDC) es el agente causal de una de las enfermedades infecciosas más relevantes en carnívoros a nivel mundial. En las últimas décadas se han reportado diversos brotes con alta mortalidad en especies silvestres, los que provocaron una gran disminución en las poblaciones afectadas, poniendo en riesgo la conservación de especies amenazadas. Con el objetivo de determinar la presencia de VDC en diferentes especies silvestres en Chile, se realizó un estudio longitudinal de detección del gen de la Fosfoproteína (gen P) mediante n-RT-PCR. Se analizaron 136 muestras de sangre entera de carnívoros clínicamente sanos provenientes de un zoológico de la Región Metropolitana y de zorros chilotes (*Lycalopex fulvipes*) de vida libre. Como resultado, no se detectó el gen P en ninguna de las muestras analizadas, siendo todas clasificadas como negativas. La evidencia encontrada, en conjunto con estudios previos, sugiere que el contacto de los zorros chilotes con perros infectados con VDC podría tener graves consecuencias en cuanto a su salud y conservación, causando disminución poblacional o extinciones locales a lo largo de su distribución. Se recomienda realizar estudios serológicos y moleculares de carnívoros silvestres y domésticos en zonas habitadas por zorro chilote que permitan comprender la epidemiología del virus en ambientes naturales para diseñar medidas preventivas adecuadas para proteger ésta especie. Finalmente, se recomienda continuar la vigilancia del virus mediante pruebas serológicas que confirmen la utilidad de la vacunación como medida preventiva en zoológicos y mantener protocolos sistemáticos de vacunación.

Palabras clave: Virus distemper canino, n-RT-PCR, fauna silvestre, zoológicos, *Lycalopex fulvipes*.

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV) is the causal agent of one of the most relevant infectious diseases in carnivores worldwide. In the last decades, several outbreaks with high mortality in wildlife species have been reported, which caused a large decline of the affected populations, putting at risk the conservation of threatened species. In order to determine the presence of CDV in different wild species in Chile, a longitudinal study of detection of the Phosphoprotein gene (P gene) was carried out by n-RT-PCR. A total of 136 whole blood samples were analyzed, collected from different clinically healthy carnivores from a zoo in the Metropolitan Region and free-ranging Darwin's foxes (*Lycalopex fulvipes*). As a result, the presence of P gene was not detected in any of the analyzed samples, so all were classified as negative. The evidence found, in conjunction with previous studies, suggests that the contact of Darwin's foxes with CDV infected dogs could have severe consequences in their health and conservation status, causing population decline or local extinctions throughout its distribution. It is recommended to perform serological and molecular studies in wild and domestic carnivores in areas inhabited by Darwin's foxes that allow understanding the epidemiology of the virus in natural environments, in order to design adequate preventive measures to protect this specie. Finally, it is recommended to continue monitoring the virus through serological tests that confirm the efficacy of vaccination as a preventive method in zoos and maintain systematic vaccination protocols.

Keywords: Canine distemper virus, n-RT-PCR, wildlife, zoo, *Lycalopex fulvipes*.

INTRODUCCION

Virus Distemper Canino

El virus distemper canino (VDC) es un *Morbillivirus* perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus envuelto, cuyo genoma está conformado por ARN no segmentado, de hebra simple y polaridad negativa, que codifica ocho proteínas virales, seis de ellas estructurales, entre las que se incluyen las proteínas de la Matriz (M), Fusión (F), Hemaglutinina (H), Nucleocápside (N), Polimerasa Grande (L) y Fosfoproteína (P), además de dos no estructurales, las proteínas V y C (Martella *et al.*, 2008; Loots *et al.*, 2017a). El gen P corresponde a una región altamente conservada del genoma que codifica para la proteína del cofactor de la polimerasa, la que actúa junto al gen L y juntas son responsables de la síntesis de ARN, por lo que son esenciales para la replicación viral (Vagnozzi y Carrillo, 200; Nikolin *et al.*, 2012).

Se han realizado variados análisis filogenéticos basados en el gen H de diferentes cepas de VDC provenientes de todo el mundo, que han revelado que éstas se agrupan en al menos 14 linajes según las diferentes áreas geográficas, entre las que se encuentran: America-1, America- 2, America-3, America-4, Arctic-like, Rockborn-like, Asia-1, Asia-2, Africa-1, Africa-2, European Wildlife, South America-1/Europe-1, South America-2 y South America-3 (Martínez - Gutiérrez y Ruiz - Sáenz, 2016). Estudios realizados en Chile han determinado que en el país circulan al menos los linajes Europe-1 y America-1 (Salas, 2013; Abarca, 2015).

El distemper canino es una importante enfermedad infecciosa de distribución mundial, que aunque se relaciona comúnmente al perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), tiene un gran rango de hospederos, causando patología en la mayoría de las familias del orden carnívora, e incluso en otros órdenes (Origi *et al.*, 2013; Sheldon *et al.*, 2017). Esta patología multisistémica es altamente contagiosa y febril, pudiendo cursar con signología respiratoria, gastrointestinal, neurológica, cutánea, urinaria, linfática, endocrina y esquelética (Appel y Summers, 1995; Beineke *et al.*, 2015).

El VDC es transmitido principalmente vía respiratoria, mediante contacto directo con secreciones y aerosoles. La incubación puede variar entre una a cuatro semanas, y su excreción comienza siete días post infección, lo que ocurre en todas las secreciones corporales de los individuos con infección aguda, existan o no signos clínicos (Appel y Summers, 1995). Los animales que logran recuperarse, continúan excretando el virus por más de 60 a 90 días, existiendo además una larga persistencia del virus en tejidos como

neuronas, urotelio, almohadillas plantares y úvea (Martella *et al.*, 2008; Greene y Vandeveldel, 2012).

Su curso puede ser agudo o subagudo y la presentación puede ir desde infección asintomática o subclínica (en un 25-75% de los perros), hasta cuadros neurológicos mortales (Appel y Summers, 1995; Deem *et al.*, 2000). La virulencia y sintomatología varían dependiendo de la cepa involucrada, condiciones ambientales y del hospedero, siendo relevantes el estado y respuesta del sistema inmune del animal y su edad, existiendo una mayor mortalidad en perros jóvenes que en adultos (Martella *et al.*, 2008). Formas leves de la enfermedad son comunes y se incluyen signos como letargia, disminución del apetito, fiebre e infecciones del tracto respiratorio superior, siendo habitual la descarga oculonasal serosa que puede volverse mucopurulenta acompañada de tos y disnea (Greene y Vandeveldel, 2012).

Diagnóstico

El diagnóstico clínico de esta patología suele ser difícil debido a la variabilidad de signos que presenta, y a que suele confundirse con otras enfermedades digestivas o respiratorias (Gallo - Calderón *et al.*, 2007; Wyllie *et al.*, 2016).

El diagnóstico de rutina mediante inmunofluorescencia es un método de baja sensibilidad, ya que sólo es capaz de detectar los antígenos durante las tres primeras semanas post infección. Los métodos serológicos como ELISA o seroneutralización, son de escaso valor diagnóstico debido a que altos títulos de anticuerpos pueden deberse a vacunaciones previas y dar como resultado falsos positivos, además, el diagnóstico mediante inmunoensayos es poco confiable debido a que entrega resultados variables dependiendo de la etapa de la enfermedad (Elia *et al.*, 2006; Gallo - Calderón *et al.*, 2007). A pesar de lo anterior, se considera que la seroneutralización es la prueba de elección para la medición de títulos de anticuerpos y la más indicada para estudios epidemiológicos (Greene y Vandeveldel, 2012).

El aislamiento viral, a pesar de ser definitivo, es un método que consume gran cantidad de tiempo, pudiendo demorar varias semanas en realizarse. El diagnóstico molecular mediante RT-PCR se ha utilizado en múltiples ocasiones de forma satisfactoria para el diagnóstico de VDC, además de ser muy útil para estudios epidemiológicos del virus y para el estudio de las dinámicas de circulación de las diferentes cepas entre los animales susceptibles (Elia *et al.*, 2006; Martella *et al.*, 2008).

Para fines de manejo clínico, es necesario contar con un método diagnóstico sensible, específico y rápido, capaz de detectar la infección en etapas tempranas mediante la detección de pequeñas cantidades del virus. El RT-PCR anidado (n-RT-PCR), se realiza con los productos obtenidos mediante RT-PCR, y tiene el potencial de aumentar la sensibilidad de detección (Shin *et al.*, 2004). Para las técnicas moleculares, las muestras biológicas más recomendados para detectar el virus son la orina, sangre entera e hisopado conjuntival (Elia *et al.*, 2015).

Epidemiología

El distemper canino genera alta morbilidad y mortalidad en poblaciones de perros no vacunadas a nivel mundial, siendo menos frecuente en países industrializados debido a la mayor tasa de vacunación (Shin *et al.*, 2004). Pueden infectarse animales de todas las edades, siendo mayor la susceptibilidad en los cachorros (Appel y Summers, 1995). La prevalencia en perros urbanos es mayor entre los tres y seis meses de edad, lo que se correlaciona con la disminución de los anticuerpos maternos luego del destete. En contraste, en poblaciones aisladas de perros, la enfermedad afecta a individuos de todas las edades de forma severa y extensa (Greene y Vandeveld, 2012).

Con el paso de los años el rango de hospederos se ha ampliado, pero se sigue considerando al perro como el principal reservorio del virus, el que podría actuar como fuente de infección para la fauna silvestre (Gowtage - Sequeira *et al.*, 2009; Greene y Vandeveld, 2012). A pesar de lo anterior, recientemente se ha estudiado la importancia de la fauna silvestre en la diseminación del patógeno, ya que en algunos casos serían éstas especies las que habrían actuado como reservorio del virus (Almberg *et al.*, 2009; Prager *et al.*, 2012; Belsare *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2015; Nikolin *et al.*, 2017).

La infección por VDC se ha confirmado en múltiples especies silvestres, existiendo reportes de casos clínicos en diversas familias de carnívoros terrestres, incluyendo *Canidae*, *Felidae*, *Hyaenidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Ailuridae* y *Viverridae* (Deem *et al.*, 2000; Beineke *et al.*, 2015). Además se ha reportado en especies no carnívoras, entre las que se encuentran miembros de los órdenes *Primates*, *Rodentia*, *Pilosa* y *Cetartiodactyla* (Appel *et al.*, 1991; Qiu *et al.*, 2011; Origi *et al.*, 2013; Sheldon *et al.*, 2017).

A pesar del gran número de especies a las que el virus puede infectar, la morbilidad y mortalidad generada varía ampliamente según la especie involucrada (Deem *et al.*, 2000), pudiendo llegar a tasas de un 100% en especies como el hurón doméstico

(*Mustela putorius furo*) (Wyllie *et al.*, 2016). En las últimas décadas han ocurrido diversos brotes con alta mortalidad en especies de fauna silvestre como hurón de patas negras (*Mustela nigripes*), perro salvaje africano (*Lycan pictus*), león (*Panthera leo*), y lobo etíope (*Canis simensis*) (Williams *et al.*, 1988; Roelke - Parker *et al.*, 1996; Van de Bildt *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2015). Estos eventos provocaron una gran disminución en cada una de las poblaciones afectadas, lo que demuestra la importancia que puede representar el patógeno en la conservación de especies silvestres, aumentando la preocupación sobre el riesgo de extinción que puede suponer para las especies amenazadas (Viana *et al.*, 2015; Loots *et al.*, 2017b). Recientemente, se dio a conocer la confirmación de cinco casos mortales de VDC en pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*) en China (Feng *et al.*, 2016) y posteriormente en un ejemplar de leopardo de Amur (*Panthera pardus orientalis*), considerado el felino más amenazado del mundo y catalogado como en Peligro Crítico por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Sulikhán *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Pope *et al.* (2016), se examinaron a 50 mapaches (*Procyon lotor*) y ocho zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*), entre los que se encontraban tanto animales con y sin signología compatible con infección por VDC. El virus se detectó en el 74% de los individuos mediante RT-PCR en tiempo real, incluyendo al 54.5% (12/22) de los animales clínicamente sanos al momento del estudio. Los resultados de esta investigación demuestran la importancia que pueden representar los animales que a pesar de no evidenciar signología, pueden estar infectados de manera subclínica o haberse recuperado de la infección aguda, y permanecer como individuos persistentemente infectados que podrían actuar como fuente de infección del virus (Pope *et al.*, 2016).

A nivel nacional, son escasos los reportes asociados al virus en especies silvestres, entre los cuales se incluyen un brote de alta mortalidad que ocurrió el año 2003 en zorros culpeo (*Lycalopex culpaeus*) y zorros chilla (*Lycalopex griseus*) en el Parque Nacional Bosque de Fray Jorge, en el cual se observaron diversos animales con signología similar al distemper en los que el diagnóstico serológico e histopatológico reveló una posible asociación de estos animales a VDC (Moreira y Stutzin, 2005). Existen además estudios serológicos en los que se han reportado anticuerpos contra el virus en zorro culpeo, zorro chilla (Acosta-Jamett *et al.*, 2011), visón (*Neovison vison*) (Sepúlveda *et al.*, 2014) y en una colección zoológica de la Región Metropolitana (Campos, 2011).

Durante el año 2013, seis ejemplares de lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*) del Parque Zoológico Buin Zoo (PZBZ) murieron presentando signología clínica y patológica concordante con distemper canino. El brote fue confirmado molecularmente en dos de los casos mediante RT-PCR a través de la detección del gen H del virus. El análisis filogenético realizado indicó que los aislados pertenecían al linaje South America-1/Europe-1 (Abarca, 2015). Este es el único caso en Chile en el cual se ha realizado confirmación diagnóstica de VDC en especies de fauna silvestre. Aunque aparentemente sólo los lobos de crin fueron afectados por el brote, no existe información sobre otros animales del recinto que pudieron haber presentado la infección de manera asintomática, pudiendo actuar como focos de infección del agente.

El zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*) es una especie endémica de Chile, clasificada como en peligro por la UICN. Una de las amenazas más importantes para su conservación es el contagio de enfermedades desde perros domésticos, considerándose al VDC como el patógeno potencial más relevante (Silva - Rodríguez *et al.*, 2016). A pesar de esto, a la fecha no existen reportes científicos de zorros chilotes expuestos o infectados por el virus. En un estudio serológico realizado en zorros chilotes en diferentes poblaciones ubicadas entre Nahuelbuta y el archipiélago de Chiloé, donde se utilizó la técnica de seroneutralización para establecer la presencia de anticuerpos anti VDC en estos animales, se obtuvo como resultado todos los animales negativos, lo que podría implicar que estas poblaciones sean altamente susceptibles al virus (Kroeger, 2016).

Existen muy pocos estudios tanto en ambientes naturales como en colecciones zoológicas en los que se investigue a través de técnicas diagnósticas directas a especies de fauna silvestre como portadores asintomáticos y potenciales fuentes de infección del VDC. Conocer el estatus infeccioso de las especies silvestres permitiría implementar acciones de prevención y control para la enfermedad. Considerando los antecedentes expuestos, mediante esta memoria de título se analizaron molecularmente muestras de sangre entera de carnívoros silvestres pertenecientes a colecciones zoológicas y ambientes naturales, con el objetivo de determinar la presencia de VDC en animales clínicamente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de las muestras se realizó en los laboratorios de Virología Animal y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1. Muestras y controles

Se analizaron 139 muestras de sangre previamente recolectadas en tubos con EDTA provenientes de diversas especies de carnívoros silvestres clínicamente sanos, 94 de ellas pertenecientes a la colección del PZBZ y 45 de zorros chilotes de vida libre provenientes del sur de Chile, incluyendo la cordillera de Nahuelbuta, alrededores de Valdivia y la isla de Chiloé, donde se encuentran las principales poblaciones de ésta especie. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas en diferentes muestreos realizados entre los años 2012 y 2016 y almacenadas a -20°C en el PZBZ y posteriormente trasladadas al laboratorio de Virología Animal. Las muestras fueron obtenidas en el marco de los proyectos financiados por el PZBZ “Salvando al zorro de Darwin: una aproximación desde la medicina de la conservación” y “Zoológicos como centinelas para el manejo sanitario de fauna silvestre en Chile”.

Como control positivo se utilizó ARN extraído desde muestras sanguíneas de perros positivas a la detección del gen P a través de n-RT-PCR (Mateo, 2015).

Como control negativo se utilizaron muestras de ARN extraídas desde muestras de sangre con anticoagulante (EDTA), de perros no vacunados sin signos de la enfermedad. Por último, como control de reactivos, se empleó agua estéril libre de nucleasas.

2. Detección del gen P de la Fosfoproteína del VDC mediante n-RT-PCR

Obtención del ARN viral: La extracción del ARN se realizó mediante el kit de extracción TRIZOL® LS (Invitrogen®), cuyo procedimiento se realiza a temperatura ambiente (TA). Se mezclaron 0,75 mL de reactivo con 0,25 mL de la muestra, para lisar células suspendidas, haciendo pasar la suspensión varias veces a través de una pipeta. Luego, se añadieron 0,2 mL de cloroformo y las muestras fueron agitadas durante 15 segundos. Posteriormente se incubaron a TA por 15 minutos y se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. A la fase acuosa se le agregó 0,5 mL de isopropanol y se incubó a TA por 10 minutos, siendo posteriormente centrifugada a 12.000xg por 8 minutos. Luego se agregó 1 mL de etanol al 75% al precipitado, se agitó en vórtex y se centrifugó a 7.500 xg por 5 minutos a TA. El precipitado de ARN fue secado al vacío durante 5 minutos y se

resuspendió en 100 uL de agua estéril libre de nucleasas. Finalmente, se incubó el ARN durante 15 minutos a 50-60°C y se mantuvo a -20°C hasta su posterior utilización.

RT-PCR y n-RT-PCR: Para la realización de la técnica, se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 de pocillos de 0.2 mL cada uno.

Partidores: Se utilizaron dos pares de partidores del gen P: CDV-1: 5'-GGATGTGGAGAACGCAATAC-3' y CDV-2: 5'-GGAGGTCTCTCAATAGTTGA-3', para la amplificación de 1069 pares de bases (pb) (Rzezutka y Mizak, 2002). El segundo par de partidores CDV-A: 5'-ATGTTTATGATCACAGCGGT-3' y CDV-B: 5'-ATTGGGTTGCACCACTTGTC-3', permite la amplificación de 429 pb (Barrett *et al.*, 1993).

Mezcla de la reacción: La reacción RT-PCR se realizó utilizando los partidores CDV-1 y CDV-2 y el kit "*SuperScript one step RT-PCR with platinum Taq*" de Invitrogen®, siguiendo las indicaciones del fabricante, el cual consiste en 25 uL de "*2x Reaction Mix*" (0,4mM de cada desoxirribonucleótido y 3.2 mM de MgSO₄), 2 uL de "*SuperScript. III RT/Platinum Taq Mix*", 2 uL de cada partidor y 19 uL del templado de ARN para alcanzar un volumen de 50 uL totales.

El primer paso consiste en la transcripción reversa, la cual fue efectuada a 42°C por 50 minutos, seguida por una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos. Luego, un PCR de 35 ciclos (desnaturalización: 94°C durante un minuto; alineamiento: 50°C por 2 minutos; extensión 72°C durante 2 minutos) y una elongación final de 72° C durante 6 minutos (Pardo *et al.*, 2005).

Para cada muestra procedente del RT-PCR, el n-RT-PCR se realizó en un tubo con una mezcla de 11 uL de Master Mix 2X (Fermentas®), 5 uL del partidor CDV-A, 5 uL del partidor CDV-B y 1 uL de producto (muestra). Esto se incubó a 94 °C por 2 minutos y la amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineamiento a 55°C durante un minuto y elongación a 72 °C durante un minuto. La elongación final se realizó a 72 °C durante 6 minutos.

Visualización de los productos amplificados: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El producto de cada PCR fue mezclado con un producto comercial de carga (Fermentas®), que contiene glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol, con el fin de verificar la migración de las bandas de ADN. La electroforesis se realizó a 90 V por 45 minutos. Después de la electroforesis, se llevó a cabo la incubación

con bromuro de etidio (BE; 0,5 ug/mL) durante 40 minutos y se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) en un transiluminador, para ser finalmente fotografiado.

Medidas de bioseguridad: Para la realización del trabajo de laboratorio, se adoptaron las medidas de seguridad requeridas para los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de Microbiología y Virología Animal. Estas consisten en el uso de material limpio y estéril, utilización de delantal blanco y guantes de látex desechables, tanto en la preparación de las mezclas de PCR como en la incubación del gel en BE. Para la visualización de los productos amplificados, al involucrar la utilización de un transiluminador de luz UV, se requiere del uso de una placa de acrílico y gafas con filtro UV, para proteger la visión del observador. Finalmente, el gel sumergido en BE fue incinerado junto a los guantes utilizados en esta tarea, debido a que este compuesto posee propiedades mutagénicas.

RESULTADOS

Realización del n-RT-PCR para la detección del gen P de la Fosfoproteína del VDC.

Para las 139 muestras de sangre entera obtenidas de fauna silvestre tanto cautiva como de vida libre, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción reversa y posteriormente con los productos obtenidos se realizó el PCR anidado utilizando el segundo par de partidores. En la realización de cada una de las reacciones, se incluyeron además sus respectivos controles positivos, negativos y de reactivos. Luego se realizó la visualización de los productos obtenidos utilizando gel de agarosa al 2%, en donde en todos los casos, los controles positivos generaron una banda de alta intensidad de alrededor de 400 pb.

En cuanto a los aislados de campo, en las 45 muestras obtenidas de zorros chilotes de vida libre clínicamente sanos, en ninguno de los casos se obtuvo visualización de bandas, por lo que todas las muestras fueron consideradas como negativas a la detección del gen de la fosfoproteína del VDC (Anexo 1).

En el caso de las 94 muestras obtenidas de carnívoros en cautiverio del PZBZ, se realizó el mismo procedimiento, y al igual que en el caso de los zorros chilotes, no se visualizaron bandas de alta intensidad en ninguno de los casos, por lo que todos los animales muestreados fueron clasificados como negativos a la presencia del gen P del VDC (Anexo 2).

DISCUSION

“El monitoreo sanitario es fundamental para detectar, identificar y minimizar las consecuencias negativas de las enfermedades infecciosas” (Huff *et al.*, 2017). El distemper canino es una de las enfermedades infecciosas más relevantes en carnívoros domésticos, cuyo rango de hospederos se ha extendido ampliamente en las últimas décadas. Existen reportes de mortalidad causada por el virus en una gran variedad de especies de diferentes órdenes de mamíferos, por lo que actualmente se considera una amenaza para la salud y conservación de animales silvestres a nivel mundial (Martínez - Gutiérrez y Ruiz - Sáenz, 2016). La prevención de esta enfermedad requiere de una clara comprensión de los potenciales hospedadores en riesgo de infección. Esto no sólo es indispensable para establecer medidas preventivas y protocolos de tratamiento para animales infectados en cautiverio, sino también para la vigilancia y evaluación de riesgo en cuanto a posibles brotes de la enfermedad (Loots *et al.*, 2017b).

En el presente estudio se obtuvo como resultado un 100% de muestras negativas a la infección por VDC, tanto en zorros chilotes de vida libre como en diferentes carnívoros silvestres cautivos.

Aunque se trata de un agente infeccioso muy estudiado globalmente, en Chile existen pocos estudios sobre el virus en especies silvestres, lo que representa una debilidad frente a posibles brotes y dificulta la planificación para el manejo preventivo del patógeno. Además, la gran habilidad del VDC para infectar múltiples especies, combinado con la gran población de perros del país, con bajas tasas de vacunación sobre todo en zonas rurales, aumentan la preocupación por brotes en perros que puedan afectar especies no domésticas de vida libre o de poblaciones cautivas periurbanas.

Para la realización de esta memoria de título se escogió al zorro chilote debido a que se trata de una especie endémica en peligro de extinción, cuya principal amenaza son las enfermedades infecciosas transmitidas desde perros domésticos, considerándose al VDC como la más importante a pesar de no existir a la fecha reportes científicos de individuos afectados por el virus (Silva - Rodríguez *et al.*, 2016). Por lo anterior, es de gran importancia recopilar información epidemiológica que contribuya a determinar el grado de amenaza que representa el patógeno para la salud y conservación de esta especie. Dentro de los escasos estudios científicos sobre VDC realizados en el país, se realizó una evaluación serológica con la intención de determinar la presencia de anticuerpos contra *morbillivirus* en las poblaciones de zorro chilote que habitan entre la cordillera de

Nahuelbuta y la isla de Chiloé. Todas las muestras resultaron negativas, por lo que se estima que ambas poblaciones carecerían de inmunidad humoral frente al patógeno (Kroeger, 2016).

En el año 1992, se realizó en California un estudio serológico en zorros de las islas (*Urocyon littoralis*), en el cual se determinó que los animales muestreados no contaban con inmunidad adquirida contra VDC, lo que podía sugerir que el patógeno no había sido introducido a las islas en estudio, o que la especie era altamente susceptible a la infección, por lo que muy pocos individuos eran capaces de sobrevivir al virus. Los autores planteaban que en caso de que el virus fuera introducido al lugar, habría un alto riesgo de que se ocasionara un brote de alta mortalidad debido a la falta de evidencia de inmunidad adquirida en estos zorros (Garcelon *et al.*, 1992). En 1999 ocurrió un declive en la población de esta especie de hasta un 95% en algunos sectores. A pesar de tratarse de una población altamente monitoreada, se logró recuperar la carcasa de un solo individuo, en el que mediante estudios moleculares se detectó el gen P del VDC. Además, el 87% de los animales testeados contaban en ese momento con anticuerpos anti VDC. La evidencia encontrada confirmó que la disminución del tamaño poblacional habría sido provocada por un brote de VDC (Timm *et al.*, 2009).

El reporte de los zorros de las islas es clave para demostrar la importancia de los hallazgos presentados en esta investigación, ya que fueron incluidos el 88% de los individuos muestreados por Kroeger en 2016, por lo que además de no presentar el virus al momento del muestreo, los animales incluidos en el presente estudio tampoco contaban con inmunidad frente al patógeno. Esto último sugiere dos posibles escenarios, en primer lugar que no han sido expuestos al virus, o segundo, que debido a su gran susceptibilidad, muy pocos sobrevivirían a la infección. La ausencia de hallazgos físicos en el caso de este segundo escenario se explica debido a que las mortalidades esporádicas en animales silvestres son difíciles de detectar *in situ*, tanto por la descomposición rápida de las carcasas como por la acción de animales carroñeros (Wobeser, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, en caso de que los zorros chilotes sean expuestos al VDC, existiría un elevado riesgo de ocurrencia de un brote de alta mortalidad muy similar a lo reportado en los zorros de las islas por Garcelon *et al.* en 1992 y posteriormente por Timm *et al.* el año 2009. Lo anterior, sumado a la alta seroprevalencia de VDC en perros reportada por Sepúlveda *et al.*, (2014) en la Región de Los Ríos

(41,6%) y Acosta-Jamett *et al.*, (2015) en la Región de la Araucanía (52%), ambas áreas con presencia de zorro chilote, y a la alta mortalidad que puede causar el VDC en animales sin exposición o infección previa (Roelke - Parker *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2017), representa un escenario propicio para la ocurrencia de una epidemia que podría extinguir poblaciones locales de la especie y ser una amenaza para su conservación, especialmente dentro de su distribución continental, donde habitan poblaciones más pequeñas y aisladas (Silva - Rodríguez *et al.*, 2016).

Un caso similar al de esta investigación fue reportado por Millán *et al.* (2016), quienes estudiaron lobos ibéricos (*Canis lupus*) a través de RT-PCR en tiempo real y seroneutralización, obteniendo resultados negativos a la detección del virus mediante ambas pruebas. Los autores recalcan que debido a la ausencia de inmunidad adquirida, era muy probable que de ocurrir un brote de VDC, habría consecuencias dramáticas en cuanto a disminución de la población, ya que se trata de una especie amenazada que habita lugares aislados, comparable al caso de los zorros chilotes. Además, debido a que los anticuerpos que se obtienen al exponerse al virus generan inmunidad de por vida, la ausencia de anticuerpos neutralizantes en los individuos adultos indica que el VDC podría estar causando mortalidad en la población estudiada (Millán *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los brotes ocasionados por *morbillivirus* pueden causar un gran riesgo de extinción en poblaciones pequeñas de especies que se encuentren amenazadas. Lo anterior debido a las devastadoras consecuencias que pueden causar enfermedades como el distemper canino en poblaciones sin inmunidad adquirida o altamente susceptibles al virus (Harder y Osterhaus, 1997).

Se recomienda continuar con la vigilancia del estado sanitario de los zorros chilotes a través de estudios serológicos y de detección molecular, en los que se incluyan tanto a carnívoros silvestres como domésticos en las zonas habitadas por esta especie. Se espera que las futuras investigaciones permitan comprender la epidemiología del virus en ambientes naturales en Chile con el fin de diseñar medidas preventivas adecuadas para proteger a los zorros chilotes.

EL VDC también ha sido reportado como una amenaza importante para la salud y bienestar de poblaciones de mamíferos silvestres cautivos. En Chile existen dos reportes científicos relacionados, un estudio descriptivo realizado el año 2011 en el PZBZ, el cual detectó un 7,1% de seroprevalencia en carnívoros mediante seroneutralización (Campos,

2011). El segundo reporte describe un brote de distemper canino que afectó a los lobos de crin de este mismo recinto el año 2012, el cual causó la mortalidad de seis individuos (Abarca, 2015). Ambos casos confirman la relevancia que puede tener este virus en la salud de las poblaciones silvestres cautivas en Chile, por lo que es importante conocer su situación epidemiológica.

Todos los animales cautivos evaluados durante el presente estudio resultaron negativos a la presencia del gen P del VDC, siendo importante considerar que las muestras analizadas fueron obtenidas en un periodo de 5 años, entre 2012 y 2016, de forma previa y posterior al brote que afectó a los lobos de crin (Abarca, 2015). En esta memoria se esperaba detectar si existió circulación del virus entre los diferentes recintos del PZBZ durante el brote ocurrido en 2013, pero la evidencia encontrada indica que sólo los lobos de crin se vieron afectados, no encontrando a ninguna otra especie infectada por el virus.

Existe escasa información sobre detección molecular de VDC en poblaciones cautivas de carnívoros silvestres clínicamente sanos a nivel mundial, por lo que este estudio representa un aporte a la epidemiología del agente. Los resultados de este trabajo son similares a los reportados por Furtado *et al.* (2017), donde fueron analizadas 68 muestras de sangre provenientes de felinos clínicamente sanos del Zoológico de Sao Paulo y de vida libre, todas con resultados negativos a la detección de VDC mediante n-RT-PCR. Debido a que el virus se encuentran presente en la sangre de los individuos afectados principalmente durante la fase aguda de la infección, es importante considerar el momento de la captura y toma de muestra de los individuos, siendo de utilidad recolectar otros tipos de muestras biológicas, como por ejemplo hisopado conjuntival u orina (Furtado *et al.*, 2017). El tipo de muestra utilizada es un factor relevante en este tipo de estudios, por lo que se recomienda que en investigaciones futuras se incluyan tejidos biológicos adicionales para aumentar la probabilidad de detección.

Para establecer la implicancia del virus en animales en cautiverio, se realizó una revisión de reportes de casos clínicos de VDC producidos mediante infección natural (Anexo 3). Como resultado se obtuvo que de un total de 33 casos estudiados, provenientes de 27 publicaciones, 63,6% de ellos corresponden a eventos con mortalidad en los que se vieron afectados al menos tres individuos, y un 30,3% a brotes con al menos diez animales involucrados. Además, de los reportes analizados, 54,5% de ellos involucran a especies que se encuentran amenazadas en su conservación, ya sean como vulnerables o en peligro de extinción, incluyendo entre otros, tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*),

leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) y panda rojo (*Ailurus fulgens*) (Konjević *et al.*, 2011; Chinnadurai *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

La mayor prioridad para el control del VDC se basa en mantener altas tasas de vacunación en carnívoros susceptibles utilizando vacunas eficaces que induzcan una inmunidad sólida, sobre todo en áreas con alta densidad de perros domésticos que puedan estar en contacto con carnívoros silvestres (Harder y Osterhaus, 1997). Considerando lo anterior, la ausencia de detección de VDC en los carnívoros cautivos reportada en esta memoria podría explicarse debido a la vacunación sistemática que se ha implementado desde el año 2013 en el PZBZ. En este período se comenzó a inmunizar de forma anual a todos los cánidos mediante una vacuna recombinante y desde entonces no han ocurrido nuevos casos clínicos dentro de la colección (Hidalgo, 2018¹).

Se recomienda complementar este estudio mediante pruebas serológicas como seroneutralización en todos los carnívoros de la colección para evaluar de manera periódica los títulos de anticuerpos entre las especies susceptibles a VDC. Además, se recomienda ampliar el rango de especies a vacunar, y se espera que en un futuro sean incluidos todos los carnívoros de la colección.

¹ **HIDALGO, E.** 2018. [Comunicación personal]. Parque Zoológico Buin Zoo, Departamento de Conservación e Investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABARCA, M.J.** 2015. Pesquisa de virus distemper canino en lobos de crin (*Chrysocyon brachyurus*) del Parque Zoológico Buin Zoo, Región Metropolitana, Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. 27 p.
- **ACOSTA - JAMETT, G.; CHALMERS, W.S.; CUNNINGHAM, A.A.; CLEVELAND, S.; HANDEL, I.G.; BRONSVOORT, B.M.** 2011. Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Vet. Microbiol.* 152: 247-257.
- **ACOSTA - JAMETT, G.; SUROT, D.; CORTES, M.; MARAMBIO, V.; VALENZUELA, C.; VALLVERDU, A.; WARD, MP.** 2015. Epidemiology of canine distemper and canine parvovirus in domestic dogs in urban and rural areas of the Araucanía region in Chile. *Vet. Microbiol.* 178: 260-264.
- **ALMBERG, E.S.; MECH, L.D.; SMITH, D.W.; SHELDON, J.W.; CRABTREE, R.L.** 2009. A serological survey of infectious disease in Yellowstone National Park's canid community. [en línea]. *PLoS ONE* 4(9): e7042. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007042>> [consulta: 10-07-2018]
- **APPEL, M.J.G.; REGGIARDO, C.; SUMMERS, B.A.; PEARCE - KELLING, S.; MARE, C.J.; NOON, T.H.; REED, R.E.; SHIVELY, J.N.; ÖRVELL, C.** 1991. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch. Virol.* 119: 147-152.
- **APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* 44: 187-191.
- **BARRETT, T.; VISSER, I.; MAMAEV, L.; GOATLEY, L.; VAN BRESSEM, M.; OSTERHAUS, A.** 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012.
- **BEINEKE, A.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P.** 2015. Cross-species transmission of canine distemper virus - an update. *One Health* 1: 49-59.
- **BELSARE, A.V.; VANAK, A.T.; GOMPPER, M.E.** 2014. Epidemiology of viral pathogens of free-ranging dogs and indian foxes in a human - dominated landscape in central India. *Transbound. Emerg. Dis.* 61(1): 78-86.
- **CAMPOS, B.** 2011. Estudio de virus distemper canino en el zoológico de Buin, observando la seroprevalencia actual y los registros de Morbilidad y Mortalidad en los últimos cinco años, de mamíferos carnívoros terrestres. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Mayor, Escuela de Medicina Veterinaria. 64 p.
- **CHINNADURAI, S.K.; KINSEL, M.J.; ADKESSON, M.J.; TERIO, K.** 2017. Canine distemper in a vaccinated snow leopard (*Panthera uncia*). *J. Zoo Wildl. Medicine* 48(4): 1200-1203.

- **DEEM, S.L.; SPELMAN, L.H.; YATES, R.A.; MONTALI, R.J.** 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: A review. *J. Zoo Wildl. Medicine* 31(4): 441-451.
- **ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.S.; LORUSO, E.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 136: 171-176.
- **ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M.S.; LAROCCA, V.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.** 2015. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J. Virol. Methods* 213: 127–130.
- **FENG, N.; YU, Y.; WANG, T.; WILKER, P.; WANG, J.; LI, Y.; SUN, Z.; GAO, Y.; XIA, X.** 2016. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. [en línea]. *Sci. Rep.* 6: 27518. <<https://doi.org/10.1038/srep27518>> [consulta: 10-07-2018]
- **FURTADO, M.M.; TANIWAKI, S.A.; NUNES DE BARROS, I.; BRANDAO, P.E.; CATAO-DIAS, J.L.; CAVALCANTI, S.; CULLEN, L.; FILONI, C.; DE ALMEIDA - JACOMO, A.T.; PINTO - JORGE, R.S.; DOS SANTOS, N.; SILVEIRA, L.; FERREIRA - NETO, J.S.** 2017. Molecular detection of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29(5): 660-668.
- **GALLO - CALDERON, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J.** 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125: 341–349.
- **GARCELON, D.K.; WAYNE, R.K.; GONZALES, B.J.** 1992. A serologic survey of the island fox (*Urocyon littoralis*) on the Channel Islands, California. *J. Wildl. Dis. Medicine* 28(2): 223-229.
- **GORDON, C.H.; BANYARD, A.C.; HUSSEIN, A.; LAURENSEN, M.K.; MALCOLM, J.R.; MARINO, J.; REGASSA, F.; STEWART, A-M.E.; FOOKS, A.R.; SILLERO - ZUBIRI, C.** 2015. Canine distemper in endangered ethiopian wolves. *Emerg. Infect. Dis.* 21(5): 824-832.
- **GOWTAGE - SEQUEIRA, S.; BANYARD, A.C.; BARRETT, T.; BUCZKOWSKI, H.; FUNK, S.M.; CLEVELAND, S.** 2009. Epidemiology, pathology, and genetic analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *J. Wildl. Dis.* 45(4): 1008-1020.
- **GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M.** 2012. Canine distemper. **In:** Greene C.E., (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat.* 4th ed. Elsevier. St. Louis, Missouri, USA. pp 25-40.
- **HARDER, T.C.; OSTERHAUS, A.** 1997. Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts?. *TIM* 5(3): 120-124.

- **HUFF, A.G.; ALLEN, T.; WHITING, K.; WILLIAMS, F.; HUNTER, L.; GOLD, Z.; MADOFF, L.C.; KARESH, W.B.** 2017. Biosurveillance: a systematic review of global infectious disease surveillance systems from 1900 to 2016. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 36(2): 513-524.
- **JIN, Y.; ZHANG, X.; MA, Y.; QIAO, Y.; LIU, X.; ZHAO, K.; ZHANG, C.; LIN, D.; FU, X.; XU, X.; WANG, Y.; WANG, H.** 2017. Canine distemper viral infection threatens the giant panda population in China. *Oncotarget* 8(69): 113910-113919.
- **KONJEVIC, D.; SABOCANEC, R.; GRABAREVIC, Z.; ZURBRIGGEN, A.; BATA, I.; BECK, A.; GUDAN KURILJ, A.; CVITKOVIC, D.** 2011. Canine distemper in siberian tiger cubs from Zagreb Zoo: case report. *Acta Vet. Brno* 80: 47-50.
- **KROEGER, H.** 2016. Evaluación serológica de anticuerpos anti distemper canino en dos poblaciones silvestres de zorro de Darwin (*Lycalopex fulvipes*) en el sur de Chile y comparación de dos técnicas diagnósticas. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Mayor, Escuela de Medicina Veterinaria. 16 p.
- **LOOTS, A.; DU PLESSIS, M.; DALTON, D.; MITCHELL, E.; VENTERB, E.** 2017a. Genome sequences of three vaccine strains and two wild-type canine distemper virus strains from a recent disease outbreak in South Africa. [en línea]. *Genome Announc.* 5: e00603-17. <<https://doi.org/10.1128/genomeA.00603-17>> [consulta: 12-06-2018]
- **LOOTS, A.; MITCHELL, E.; DALTON, D.; KOTZ, A; VENTER, E.** 2017b. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. *J. Gen. Virol.* 98: 311-321.
- **MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine distemper virus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38: 787-797.
- **MARTINEZ - GUTIERREZ, M.; RUIZ - SAENZ, J.** 2016. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. [en línea]. *BMC Vet. Res.* 12: 78. <<http://doi.org/10.1186/s12917-016-0702-z>> [consulta: 10-12-2017]
- **MATEO, F.** 2015. Detección molecular del gen de la fosfoproteína del virus distemper canino en muestras de sangre de perros. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. 26 p.
- **MILLAN, J.; LOPEZ - BAO, J.V.; GARCIA, E.J.; OLEAGA, A.; LLANEZA, L.; PALACIOS, V.; DE LA TORRE, A.; RODRIGUEZ, A.; DUBOVI, E.J.; ESPERON, F.** 2016. Patterns of exposure of iberian wolves (*Canis lupus*) to canine viruses in human - dominated landscapes. *EcoHealth* 13: 123-134.
- **MOREIRA, R.; STUTZIN, M.** 2005. Estudio de la mortalidad de zorros en la cuarta región. *Boletín Veterinario Oficial N°3.* Servicio Agrícola y Ganadero, División de Protección Pecuaria, Chile. 8 p.
- **NIKOLIN, V.M.; WIBBELT, G.; MICHLER, F.F; WOLF, P.; EAST, M.L.** 2012.

Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. *Vet. Microbiol.* 156: 45-53.

- **NIKOLIN, V.M.; OLARTE - CASTILLO, X.; OSTERRIEDER, N.; HOFER, H.; DUBOVI, E.; MAZZONI, C.; BRUNNER, E.; GOLLER, K.; FYUMAGWA, R.; MOEHLMAN, P.; THIERER, D.; EAST, M.** 2017. Canine distemper virus in the Serengeti ecosystem: molecular adaptation to different carnivore species. *Mol. Ecol.* 26: 2111-2130.
- **ORIGGI, F.C; SATTLER, U.; PILO, P.; WALDVOGEL, A.S.** 2013. Fatal combined infection with canine distemper virus and orthopoxvirus in a group of asian marmots (*Marmota caudata*). *Vet. Pathol.* 50(5): 914-920.
- **PARDO, I.; JOHNSON, G.; KLEIBOEKER, S.** 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5009-5017.
- **POPE, J.P.; MILLER, D.L.; RILEY, M.C.; ANIS, E.; WILKES, R.P.** 2016. Characterization of a novel canine distemper virus causing disease in wildlife. *J. Vet. Diagn. Invest.* 28: 506-513.
- **PRAGER, K.C.; MAZET, J.A.; DUBOVI, E.J.; FRANK, L.G.; MUNSON, L.; WAGNER, A.P.; WOODROFFE, R.** 2012. Rabies virus and canine distemper virus in wild and domestic carnivores in northern Kenya: Are domestic dogs the reservoir? *EcoHealth* 9: 483-498.
- **QIU, W.; ZHENG, Y.; ZHANG, S.; FAN, Q.; LIU, H.; ZHANG, F; WANG, W.; LIAO, G.; HU, R.** 2011. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerging Infect. Dis.* 17(8): 1541-1543.
- **ROELKE - PARKER, M.E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S.J.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN - LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G.L.M.; MGASA, 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(1): 441-445.
- **RZEUZKA, A.; MIZAK, B.** 2002. Application of n-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Vet. Microbiol.* 88: 95-103.
- **SALAS, V.** 2013. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en perros infectados naturalmente en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. 23 p.
- **SEPULVEDA, M.A.; SINGER, R.S.; SILVA - RODRIGUEZ, E.A.; EGUREN, A.; STOWHAS, P.; PELICAN, K.** 2014. Invasive american mink: Linking pathogen risk between domestic and endangered carnivores. *EcoHealth* 11: 409-419.
- **SHELDON, J.; CUSHING, A.; WILKES, R.; ANIS, E.; DUBOVI, E.** 2017. Serologic response to canine distemper virus vaccination in captive Linnaeus's two - toed

sloths (*Choloepus didactylus*) after a fatal canine distemper virus outbreak. J. Wildl. Dis. Medicine 48(4): 1250-1253.

- **SHIN, Y.J.; CHO, K.O.; CHO, H.S.; KANG, S.K.; KIM, H.J.; KIM, Y-H.; PARK, H.S.; PARK, N.Y.** 2004. Comparison of one - step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. Aust. Vet. J. 82(1-2): 83-86.
- **SILVA - RODRIGUEZ, E.; FARIAS, A.; MOREIRA - ARCE, D.; CABELLO, J.; HIDALGO - HERMOSO, E.; LUCHERINI, M.; JIMENEZ, J.** 2016. *Lycalopex fulvipes*. [en línea]. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41586A107263066. <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41586A85370871.en>> [consulta: 05-10-2017]
- **SULIKHAN, N.S.; GILBERT, M.; BLIDCHENKO, E.Y.; NAIDENKO, S.V.; IVANCHUK, G.V.; GORPENCHENKO, T.Y.; ALSHINETSKIY, M.V.; SHEVTSOVA, E.I.; GOODRICH, J.M.; LEWIS, J.C.; GONCHARUK, M.S.; UPHYRKINA, O.V.; ROZHNOV, V.V.; SHEDKO, S.V.; MCALOOSE, D.; MIQUELLE, D.G.; SEIMON, T.A.** 2018. Canine distemper virus in a wild far eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). J. Wildl. Dis. Medicine 54(1): 170-174.
- **TIMM, S.F.; MUNSON, L.; SUMMERS, B.A.; TERIO, K.A.; DUBOVI, E.J.; RUPPRECHT, C.E.; KAPIL, S.; GARCELON, D.K.** 2009. A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). J. Wildl. Dis. Medicine 45(2): 333-343.
- **VAGNOZZI, A.; CARRILLO, C.** 2006. Análisis comparativo del gen P de rinderpest virus (RPV). InVet 8(1): 67-91.
- **VAN DE BILDT, M.W.G.; KUIKEN, T.; VISEE, A.M.; LEMA, S.; FITZJOHN, T.R.; OSTERHAUS, A.** 2002. Distemper outbreak and its effect on african wild dog conservation. Emerg. Infect. Dis. 8(2): 211-213.
- **VIANA, M.; CLEVELAND, S.; MATTHIOPOULOS, J.; HALLIDAY, J.; PACKER, C.; CRAFT, M.E.; HAMPSON, K.; CZUPRYNA, A. DOBSON, A.P.; DUBOVI, E.J.; ERNEST, E.; FYUMAGWA, R.; HOARE, R.; HOPCRAFT, G.C.; HORTON, D.L.; KAARE, M.T.; KANELLOS, T.; LANKESTER, F.; MENTZEL, C.; MLENGEYA, T.; MZIMBIRI, I.; TAKAHASHI, E.; WILLETT, B.; HAYDON, D.T.; LEMBO, T.** 2015. Dynamics of a morbillivirus at the domestic - wildlife interface: Canine distemper virus in domestic dogs and lions. PNAS 112 (5): 1464-1469.
- **WYLLIE, S.E.; KELMAN, M.; WARD, M.P.** 2016. Epidemiology and clinical presentation of canine distemper disease in dogs and ferrets in Australia, 2006 - 2014. Aust. Vet. J. 94: 215-222.
- **WILLIAMS, E.S.; THORNE, E.T.; APPEL, J.G.; BELITSKY, D.W.** 1988. Canine distemper in black - footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. J. Wildl. Dis. Medicine 24(3): 385-398.

- **WOBESER, G.A.** 2007. Disease in wild animals: Investigation and management. 2nd ed. Springer. Berlin, Germany. 393 p.
- **ZHANG, H.; SHAN, F.; ZHOU, X.; LI, B.; ZHAI, J.Q.; CHEN, W.; ZHAI, S.L.; LUO, M.L.** 2017. Outbreak and genotyping of canine distemper virus in captive siberian tigers and red pandas. [en línea]. Sci. Rep. 7(1): 8132. <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08462-4>> [consulta: 05-01-2018]

ANEXO 1

Tabla N°1: Resumen de muestras de zorros chilotes (*Lycalopex fulvipes*) de vida libre.

MUESTRAS ZORROS CHILOTES VIDA LIBRE					
N°	Id	Fecha Muestreo	Lugar de Captura	Serología ^a	Resultado
1	30145	25-03-2014	Nahuelbuta - Butamalal	-	Negativo
2	30217	27-03-2014	Nahuelbuta - Butamalal	Negativo	Negativo
3	.09089	05-08-2014	Chiloé - Tara	Negativo	Negativo
4	16900	05-12-2016	Valdivia - Reserva costera	-	Negativo
5	16901	08-12-2016	Valdivia - Reserva costera	-	Negativo
6	30143	23-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo
7	30146	01-07-2014	Chiloé - Cole Cole	Negativo	Negativo
8	30147	03-08-2014	Chiloé - Chaiguata	Negativo	Negativo
9	30151	13-10-2015	Chiloé - Tablaruca	Negativo	Negativo
10	30159	14-12-2014	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
11	30161	06-06-2016	Chiloé - Tantauco	-	Negativo
12	30162	26-04-2016	Valdivia - Oncol	-	Negativo
13	30167	11-06-2013	Chiloé - Yaldad	Negativo	Negativo
14	30168	27-11-2013	Nahuelbuta - Butamalal	Negativo	Negativo
15	30169	25-10-2014	Chiloé - Caleta Zorra	Negativo	Negativo
16	30170	11-06-2013	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
17	30171	26-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo
18	30176	23-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo
19	30178	08-05-2014	Nahuelbuta - Butamalal	Negativo	Negativo
20	30181	14-10-2015	Chiloé - Tablaruca	Negativo	Negativo
21	30182	13-10-2015	Chiloé - Tablaruca	Negativo	Negativo
22	30187	01-07-2014	Chiloé - Cole Cole	Negativo	Negativo
23	30197	06-05-2015	Chiloé - Tantauco	Negativo	Negativo
24	30199	23-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo

25	30201	14-10-2014	Chiloé - Quilén	Negativo	Negativo
26	30205	12-06-2013	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
27	30221	16-06-2013	Chiloé - Lar	Negativo	Negativo
28	30222	11-10-2015	Chiloé - Tablaruca	Negativo	Negativo
29	30223	11-06-2013	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
30	30227	03-08-2014	Chiloé - Chaiguata	Negativo	Negativo
31	30230	14-12-2014	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
32	30234	17-06-2013	Chiloé - Lar	Negativo	Negativo
33	30235	09-08-2014	Chiloé - Puntra	-	Negativo
34	30237	03-08-2014	Chiloé - Chaiguaco	Negativo	Negativo
35	30216	06-05-2015	Chiloé - Tantauco	Negativo	Negativo
36	.A060	13-07-2016	Valdivia - Reserva costera	-	Negativo
37	30145 R	06-05-2014	Nahuelbuta - Butamalal	Negativo	Negativo
38	30159 R	25-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo
39	30168 R1	22-02-2016	Nahuelbuta - Butamalal	-	Negativo
40	30177	25-10-2014	Chiloé - Caleta Zorra	Negativo	Negativo
41	30205 R	27-10-2014	Chiloé - Ahuenco	Negativo	Negativo
42	30230 R	25-06-2016	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo
43	30227 R	31-03-2015	Chiloé - Chaiguata	Negativo	Negativo
44	ELIMINADA			-	Negativo
45	ELIMINADA			-	Negativo
143	30202	24-02-2016	Nahuelbuta - Butamalal	Negativo	Negativo
144	30206	11-06-2013	Chiloé - Ahuenco	-	Negativo

^a = Seroneutralización publicada por Kroeger, 2016.

ANEXO 2

Tabla N°2: Resumen de muestras obtenidas de carnívoros cautivos del Parque Zoológico Buin Zoo.

MUESTRAS CARNÍVOROS PARQUE ZOOLOGICO BUIN ZOO					
N°	Id	Nombre Común	Especie	Fecha Muestreo	Resultado
46	1114	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	01-12-2015	Negativo
47	1186	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	dic-15	Negativo
48	1457	Zorro polar	<i>Vulpes lagopus</i>	02-12-2015	Negativo
49	1711	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	16-12-2015	Negativo
50	1838	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	dic-15	Negativo
51	1952	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	02-12-2015	Negativo
52	2007	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
53	2007	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-02-2014	Negativo
54	2007	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	16-12-2015	Negativo
55	2233	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
56	2275	Quique	<i>Galictis cuja</i>	26-12-2012	Negativo
57	2392	Quique	<i>Galictis cuja</i>	26-12-2012	Negativo
58	2435	Mofeta	<i>Mephitis mephitis</i>	04-10-2013	Negativo
59	3202	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	14-05-2013	Negativo
60	3202	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	22-07-2013	Negativo
61	3202	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	21-12-2015	Negativo
62	3326	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
63	3373	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	03-12-2015	Negativo
64	3448	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	11-07-2013	Negativo
65	3448	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
66	3448	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	20-02-2014	Negativo
67	3448	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	dic-15	Negativo
68	3539	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	02-12-2015	Negativo
69	3543	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	02-12-2015	Negativo

70	3551	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	02-12-2015	Negativo
71	3555	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	02-12-2015	Negativo
72	3743	Leopardo de las nieves	<i>Panthera uncia</i>	14-06-2016	Negativo
73	3755	Mofeta	<i>Mephitis mephitis</i>	04-10-2013	Negativo
74	4032	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	24-12-2015	Negativo
75	4229	Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	02-09-2013	Negativo
76	4333	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	20-05-2013	Negativo
77	4333	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	21-01-2016	Negativo
78	4354	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	09-05-2013	Negativo
79	4439	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	09-01-2013	Negativo
80	4454	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	dic-15	Negativo
81	4517	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	09-05-2013	Positivo ^b
82	4521	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
83	4557	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
84	4613	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	25-04-2013	Negativo
85	4642	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
86	4769	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	16-12-2015	Negativo
87	4935	León	<i>Panthera leo</i>	06-10-2012	Negativo
88	4935	León	<i>Panthera leo</i>	04-06-2013	Negativo
89	5319	Perro salvaje africano	<i>Lycaon pictus</i>	16-04-2013	Negativo
90	5563	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	06-10-2012	Negativo
91	5563	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
92	5563	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	20-02-2014	Negativo
93	5563	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	16-12-2015	Negativo
94	5638	Leopardo de las nieves	<i>Panthera uncia</i>	14-06-2016	Negativo
95	5736	Zorro chilla	<i>Lycalopex griseus</i>	19-08-2013	Negativo
96	5755	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	07-05-2013	Negativo
97	5755	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	22-12-2015	Negativo
98	5838	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
99	6621	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo

100	6821	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	02-12-2015	Negativo
101	6957	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
102	7037	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	01-12-2015	Negativo
103	7073	Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	11-07-2014	Negativo
104	7296	Mofeta	<i>Mephitis mephitis</i>	04-10-2013	Negativo
105	7353	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	20-11-2013	Negativo
106	7353	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	01-12-2015	Negativo
107	7436	Puma	<i>Puma concolor</i>	22-10-2013	Negativo
108	7447	Caracal	<i>Caracal caracal</i>	10-04-2013	Negativo
109	7448	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	16-12-2015	Negativo
110	7490	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	09-05-2013	Positivo ^b
111	7490	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	07-05-2013	Positivo ^b
112	7573	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	08-07-2013	Negativo
113	7760	Zorro plateado	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	01-12-2015	Negativo
114	7836	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
115	7836	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-02-2014	Negativo
116	7836	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	18-03-2014	Negativo
117	8083	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	06-05-2013	Negativo
118	8558	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	20-02-2014	Negativo
119	8558	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	18-12-2015	Negativo
120	8628	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	07-10-2012	Negativo
121	8628	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	08-01-2013	Negativo
122	8765	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
123	8765	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	16-12-2015	Negativo
124	8785	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-02-2014	Negativo
125	8828	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	09-01-2013	Negativo
126	9382	Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>	16-12-2015	Negativo
127	9781	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-08-2013	Negativo
128	9781	Zorro culpeo	<i>Lycalopex culpaeus</i>	19-02-2014	Negativo
129	.0346	Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	27-08-2013	Negativo

130	.0495	León	<i>Panthera leo</i>	17-06-2016	Negativo
131	.0711	Perro salvaje africano	<i>Lycaon pictus</i>	16-04-2013	Negativo
132	.0723	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	14-05-2013	Negativo
133	.0723	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	22-07-2013	Negativo
134	.0723	Lobo de crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	dic-15	Negativo
135	Elsa	León	<i>Panthera leo</i>	10-12-2013	Negativo
136	Esteban	Lobo europeo	<i>Canis lupus lupus</i>	19-10-2015	Negativo
137	Loba Alfa	Loba alfa	<i>Canis lupus lupus</i>	13-02-2014	Negativo
138	Moncho	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	29-04-2013	Negativo
139	Rita	León	<i>Panthera leo</i>	16-06-2016	Negativo
140	Oso M.	Oso malayo	<i>Helarctos malayanus</i>	12-06-2013	Negativo
141	887	Suricata	<i>Suricata suricatta</i>	02-12-2013	Negativo
142	9302	Suricata	<i>Suricata suricatta</i>	02-12-2013	Negativo

^b = Muestras no incluidas, individuos con signología clínica y detección previa del gen H del VDC mediante RT-PCR (Abarca, 2015).

ANEXO 3

Tabla N°3: Resumen de reportes de casos clínicos de VDC en especies silvestres en cautiverio causadas por infección natural publicados entre los años 1989 y 2018.

REPORTES DE CASOS CLÍNICOS DE VDC OCURRIDOS POR INFECCIÓN NATURAL EN ESPECIES SILVESTRES CAUTIVAS (1989 - 2018)					
N°	Especie	Orden/ Familia	Estado de Amenaza	Individuos Afectados	Referencia
1	Lobo de crin (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Carnivora/ <i>Canidae</i>	Casi Amenazado	6	Abarca, 2015 ^c
2	Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	Casi Amenazado	1	Appel <i>et al.</i> , 1994
3	Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	En Peligro	4	Appel <i>et al.</i> , 1994
4	Leopardo (<i>Panthera pardus</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	Vulnerable	5	Appel <i>et al.</i> , 1994
5	León (<i>Panthera leo</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	Vulnerable	7	Appel <i>et al.</i> , 1994
6	León marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	Carnivora/ <i>Otariidae</i>	Preocupación Menor	1	Barret <i>et al.</i> , 2004
7	Hormiguero gigante (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	<i>Pilosa/ Myrmecopha gidae</i>	Vulnerable	3	Britt <i>et al.</i> , 2006 ^d
8	Tigre indochino (<i>Panthera tigris corbetti</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	En Peligro	1	Cameron <i>et al.</i> , 1998 ^d
9	Manturón (<i>Arctictis binturong</i>)	Carnivora/ <i>Viverridae</i>	Vulnerable	4	Chandra <i>et al.</i> , 2000
10	Leopardo de las nieves (<i>Panthera uncia</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	Vulnerable	1	Chinnadurai <i>et al.</i> , 2017
11	Visón (<i>Neovison vison</i>)	Carnivora/ <i>Mustelidae</i>	Preocupación Menor	107	Dyer y Schamber, 1999
12	Panda gigante (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	Carnivora/ <i>Ursidae</i>	Vulnerable	6	Feng <i>et al.</i> , 2016
13	Leopardo de las nieves (<i>Panthera uncia</i>)	Carnivora/ <i>Felidae</i>	En Peligro	2	Fix <i>et al.</i> , 1989

14	Perro mapache (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	<i>Carnivora/ Canidae</i>	Preocupación Menor	56	Guo <i>et al.</i> , 2013
15	Panda gigante (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	<i>Carnivora/ Ursidae</i>	Vulnerable	1	Guo <i>et al.</i> , 2013
16	Tigre siberiano (<i>Panthera tigris altaica</i>)	<i>Carnivora/ Felidae</i>	En Peligro	2	Konjević <i>et al.</i> , 2011
17	Panda rojo (<i>Ailurus fulgens</i>)	<i>Carnivora/ Ailuridae</i>	En Peligro	5	Kotani <i>et al.</i> , 1989
18	Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	<i>Carnivora/ Felidae</i>	En Peligro	12	Nagao <i>et al.</i> , 2012
19	Marmota de cola larga (<i>Marmota caudata</i>)	<i>Rodentia/ Sciuridae</i>	Preocupación Menor	7	Origgi <i>et al.</i> , 2013
20	Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	<i>Primates/ Cercopitheci dae</i>	Preocupación Menor	Aprox. 10.000 (>4.000 muertos)	Qiu <i>et al.</i> , 2011
21	Macaco cangrejero (<i>Macaca fascicularis</i>)	<i>Primates/ Cercopitheci dae</i>	Preocupación Menor	46	Sakai <i>et al.</i> , 2013
22	Kinkajous (<i>Potos flavus</i>)	<i>Carnivora/ Procyonidae</i>	Preocupación Menor	3	Sheldon <i>et al.</i> , 2017
23	Leopardo de las nieves (<i>Panthera uncia</i>)	<i>Carnivora/ Felidae</i>	En Peligro	1	Silinski <i>et al.</i> , 2003 ^d
24	Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	<i>Primates/ Cercopitheci dae</i>	Preocupación Menor	20	Sun <i>et al.</i> , 2010
25	Civeta de las palmeras enmascarada (<i>Paguma larvata</i>)	<i>Carnivora/ Viverridae</i>	Preocupación Menor	1	Techangams uwan <i>et al.</i> , 2014
26	Civeta enana (<i>Viverricula indica</i>)	<i>Carnivora/ Viverridae</i>	Preocupación Menor	1	Techangams uwan <i>et al.</i> , 2014
27	Civeta de las palmeras común (<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>)	<i>Carnivora/ Viverridae</i>	Preocupación Menor	18	Techangams uwan <i>et al.</i> , 2014
28	Visón (<i>Neovison vison</i>)	<i>Carnivora/ Mustelidae</i>	Preocupación Menor	Múltiples	Trebbien <i>et al.</i> , 2014
29	Perro salvaje africano (<i>Lycaon pictus</i>)	<i>Carnivora/ Canidae</i>	En Peligro	49	Van de Bildt <i>et al.</i> , 2002

30	Zorro fénec (<i>Vulpes zerda</i>)	<i>Carnivora/ Canidae</i>	Preocupación Menor	15	Woo <i>et al.</i> , 2010
31	León (<i>Panthera leo</i>)	<i>Carnivora/ Felidae</i>	Vulnerable	1	Wood <i>et al.</i> , 1995
32	Tigre siberiano (<i>Panthera tigris altaica</i>)	<i>Carnivora/ Felidae</i>	En Peligro	1	Zhang <i>et al.</i> , 2017
33	Panda rojo (<i>Ailurus fulgens</i>)	<i>Carnivora/ Ailuridae</i>	En Peligro	5	Zhang <i>et al.</i> , 2017
^c = Memoria de título. ^d = Reporte de conferencia.					