



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO SEROLÓGICO Y MOLÉCULAR DE DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO
EN COMUNIDADES DE CARNÍVOROS DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE
JANOS, CHIHUAHUA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**PRESENTA
KAREN MORENO ORTIZ**

TUTOR PRINCIPAL: DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

DR. RURIK HERMANN LIST SÁNCHEZ

Departamento de Ciencias Ambientales, UAM Lerma

Ciudad Universitaria, Cd. Mx Agosto, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor a mi familia

A mis padres por su apoyo incondicional, por su profundo amor y por una vida llena de aprendizaje, plenitud y confianza.

A mis hermanos por su amor, apoyo, entusiasmo y aliento durante toda nuestra vida.

A mi esposo Alberto Pescador Pereda por su apoyo y confianza, por creer en mis sueños y estar siempre a mi lado con amor y paciencia.

Con cariño y agradecimiento a: Adriana Fernández, Mauricio López, André Rubio, Tere López, Susana Juárez, Mario Palma, Juan Carlos Martínez, Jonathan.

A mi tutor Gerardo Suzán Azpiri por su confianza, ejemplo, y amistad todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

Mi infinito agradecimiento a mis tutores:

Gerardo Suzán: Por su apoyo constante, por creer en mí, por su paciencia, orientación y amistad todos estos años.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento: Gracias por toda su paciencia y enseñanza; por hacerme parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Rurik H. List S: Por su apoyo, paciencia y asesoría.

A los miembros del jurado:

Dr. Carlos González Rebeles Islas: Gracias por siempre tener una sonrisa de apoyo y por su orientación.

Dra. Leonor Huerta Hernández: por su amabilidad y disposición

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira: por su amabilidad y ayuda

Dr. Hugo Ramírez Álvarez: por su apoyo y comprensión

Al laboratorio de Virología de la FMVZ- UNAM y a cada uno de sus integrantes por su apoyo, asesoría, confianza y amistad.

Con especial agradecimiento a Tere López, Susana García, Mario Palma, Juan Carlos, Liliana Valdés, Erika, Pepe; por su asesoría y enseñanza en el laboratorio, por formar parte de mi crecimiento académico, pero sobre todo por su gran amistad, confianza y cariño.

Al equipo de trabajo del proyecto Janos, André Rubio, Mauricio López, Adriana Fernández, Jonathan, Manuel Moguel, Hugo, Shiara González.

A Laboratorios Tornel S.A de C.V por la donación de vacunas y ayuda en el procesamiento de muestras de CPV.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al proyecto de Janos por el financiamiento otorgado para esta investigación.

RESUMEN

Los carnívoros silvestres son susceptibles a enfermedades originadas de perros y gatos domésticos como el distemper (CDV) y parvovirus canino (CPV). Estos patógenos causan alta mortalidad por lo que se consideran una amenaza para la conservación de carnívoros. Las prevalencias y el impacto de estas enfermedades pueden variar dependiendo de la diversidad de especies susceptibles en una zona. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la diversidad de especies con la infección y prevalencia de anticuerpos contra CDV y CPV en carnívoros silvestres y domésticos de la Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua. Las capturas se realizaron en temporadas de secas y lluvias (2013 y 2014). Se usaron trampas tomahawk, cepos y cámaras trampa para la captura y estimación de abundancia poblacional en diferentes tipos de vegetación y además se obtuvieron valores de riqueza, abundancia relativa, diversidad y similitud de especies. En total se capturaron 66 carnívoros silvestres y 18 domésticos de 8 especies pertenecientes a 5 familias (*Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae* y *Felidae*). La prevalencia general a CPV fue de 60.71% (51/84) y se detectó el virus en 21 individuos; para CDV se obtuvo una prevalencia general de 47.6% (40/84), y fue detectado en 6 individuos. Los sitios con mayor diversidad fueron Bosque de Pino Encino =1.617 y Matorral =1.523, la similitud fue mayor entre Pastizal 2 y Matorral-Pastizal $J=0.75$ y la prevalencia de las infecciones para CPV 91.6% y CDV 66.6% fue mayor en el sitio MAT. En este estudio los resultados indican que la alta prevalencia y presencia de CDV y CPV en la comunidad de carnívoros sugiere un efecto local de amplificación. La presencia de perros domésticos y especies generalistas como el coyote podría facilitar la transmisión de estos patógenos. Este estudio resalta la importancia de considerar las interacciones interespecíficas e intraespecífica, así como la estructura de la comunidad que podría tener un papel importante en la transmisión y mantenimiento de las infecciones en la región y aportar información necesaria para estrategias de prevención de infecciones y conservación de vertebrados.

Palabras clave: Diversidad, Distemper Canino, Parvovirus Canino, Efecto de Amplificación, Conservación.

ABSTRACT

Wild carnivores are susceptible to diseases caused dogs and cats as distemper (CDV) and canine parvovirus (CPV). These pathogens cause high mortality that is considered a threat to the conservation of carnivores. The prevalence and impact of these diseases relates to the diversity and abundance of susceptible species in an area. The aim of this study was to determine the relationship between species diversity with infection and prevalence of antibodies to CDV and CPV in wild and domestic carnivores in the Biosphere Reserve Janos, Chihuahua. The field trapping periods included the dry and rainy seasons (2013 and 2014). Tomahawk and camera traps were used for estimate population abundance in different types of vegetation. Relative abundance, diversity and similarity of species data was obtained. A total of 66 domestic and 18 wild carnivores belonging to 8 species and 5 families (Canidae, Procyonidae, Mustelidae, Mephitidae and Felidae) were captured. The antibody prevalence of CPV was 60.71% (51/84) and the virus was detected in 21 individuals. For CDV antibody prevalence was 47.6% (40/84), and the virus was detected in 6 individuals. Most diverse sites were Pine Oak Forest $H = 1.617$ and Scrub = 1.523, the similarity was greater between Grassland and Scrub/Grassland $J = 0.75$ and prevalence of infections 91.6% for CPV and CDV was 66.6% higher in the Grassland site. In this study, the results indicate that the high prevalence and presence of CDV and CPV in the community of carnivores suggests a local amplification effect. The presence of domestic dogs and generalist species as the area near the coyote could facilitate the transmission of these pathogens. This study highlights the importance of considering the interspecific and intraspecific interactions as well as the structure of the community that could have an important role in the transmission and maintenance of infections in the region and provide basic information necessary for prevention strategies infections and conservation vertebrates.

Keywords: Diversity, Canine Distemper, Parvovirus Canino, Amplification Effect of Conservation.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	5
DISTEMPER CANINO	5
<i>Generalidades</i>	<i>5</i>
PARVOVIRUS CANINO	8
<i>Generalidades</i>	<i>8</i>
<i>Carnívoros domésticos como fuente de infección.....</i>	<i>10</i>
<i>Importancia de los carnívoros en el ecosistema</i>	<i>12</i>
<i>La biodiversidad y las enfermedades.....</i>	<i>15</i>
<i>La Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua</i>	<i>18</i>
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
METODOLOGÍA.....	21
ÁREA DE ESTUDIO	21
SITIOS DE ESTUDIO	21
DISEÑO DE MUESTREO	23
REGISTRO DE CARNÍVOROS SILVESTRES	24
<i>Captura de animales.....</i>	<i>24</i>
<i>Toma de muestras.....</i>	<i>25</i>
ANÁLISIS DE LABORATORIO	26

<i>Parvovirus canino</i>	26
<i>Inhibición de la hemaglutinación (IH)</i>	27
<i>Procedimiento:</i>	27
<i>Distemper canino</i>	30
<i>Seroneutralización</i>	31
<i>Detección molecular del CDV</i>	33
ANÁLISIS DE DATOS	36
ANÁLISIS DE DIVERSIDAD	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
RESULTADOS	40
RIQUEZA, DIVERSIDAD, EQUIDAD Y ABUNDANCIA RELATIVA.....	40
<i>Capturas</i>	40
<i>Cámaras trampa</i>	44
ANÁLISIS DE LABORATORIO	48
<i>Parvovirus canino (CPV)</i>	48
<i>Análisis molecular</i>	50
<i>Distemper Canino (CDV)</i>	52
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
LITERATURA CITADA	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los sitios de estudio por tipo de vegetación.....	22
Cuadro 2 Lista de especies de carnívoros registrados por tipo de vegetación y captura directa	41
Cuadro 3. Riqueza, diversidad y equidad de carnívoros por tipo de vegetación y captura directa	42
Cuadro 4. Lista de especies de carnívoros registrados por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.....	45
Cuadro 5. Riqueza, diversidad, equidad de carnívoros por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.....	46
Cuadro 6. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por tipo de vegetación.....	49
Cuadro 7. Resultados positivos a CPV por serología y en los análisis moleculares.	50
Cuadro 8. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por tipo de vegetación.....	53
Cuadro 9. Resultados positivos a CDV por serología y en los análisis moleculares.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localización de los sitios de muestreo	22
Figura 2. Manejo de individuos	25
Figura 3. Técnica de Inmunocromatografía Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0	26
Figura 4. Procedimiento para la titulación de parvovirus canino con la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.	29
Figura 5. Técnica de Inmunocromatografía Anigen Rapid CDV Ab Test Kit 2.0	31
Figura 6. Condiciones y mezcla de la reacción de la RT-PCR	34
Figura 7. Abundancia relativa de carnívoros por tipo de vegetación y captura directa	42
Figura 8. Dendograma de similitud de especies por tipo de vegetación y captura directa.	43
Figura 9. Abundancia relativa de carnívoros por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.	46
Figura 10. Dendograma de similitud de especies por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.	47
Figura 11. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por especie	48
Figura 12. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por especie por tipo de vegetación	49
Figura 13. Árbol filogenético del gen VP2 parcial del CPV.	51
Figura 14. Relación de la diversidad de especies y prevalencia del CPV	52
Figura 15. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por especie	53
Figura 16. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por especie por tipo de vegetación	54
Figura 17. Árbol filogenético del gen H parcial del CDV.	56
Figura 18. Relación de la diversidad de especies y prevalencia del CDV	57

INTRODUCCIÓN

El incremento de la actividad humana a nivel mundial ha elevado el contacto entre personas, animales domésticos y silvestres, aumentando el riesgo de transmisión de enfermedades ya conocidas y el surgimiento de nuevas enfermedades (Daszak *et al.*, 2000). Las enfermedades emergentes y reemergentes tienen obvias implicaciones para la salud humana, además de un enorme impacto económico y consecuencias importantes en la conservación (Daszak *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2008; Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005). Actualmente sabemos que existe un alto potencial de transmisión de microorganismos en animales silvestres provenientes de reservorios domésticos (Woodroffe, 1999, Daszak *et al.*, 2000). Por ejemplo en diversas partes del mundo se han detectado enfermedades que afectan a los animales de vida silvestre como resultado de su interacción con las especies domésticas; la parafiliarisis en búfalos, síndrome de inmunodeficiencia felina, el distemper y parvovirus canino en félidos y mustélidos, así como la tuberculosis bovina en carnívoros silvestres, son algunos ejemplos importantes (Spencer *et al.*, 1992; Roelke- Parker *et al.*, 1996).

Estudios acerca de los efectos de la diversidad en relación a las enfermedades infecciosas, proporcionan información valiosa sobre el papel que juegan las comunidades ecológicas en la regulación de la abundancia natural de diversos patógenos que afectan a los animales silvestres (Pedersen *et al.*, 2007). Por ejemplo algunos trabajos describen que la frecuencia de contacto entre especies que pueden ser reservorios de algún patógeno y aquellas que podrían ser susceptibles de contraer estos agentes, está relacionada a los cambios originados por la actividad humana como la fragmentación o pérdida de hábitat, que generan cambios en la diversidad de especies y en la abundancia de las poblaciones (Lafferty y Gerber 2002; Dobson, 2004). También se sabe que la diversidad de especies está relacionada a la frecuencia de contacto inter-especie, es decir, que las tasas de contacto podrían reducirse si existe una alta diversidad faunística y

por lo tanto disminuir la transmisión de enfermedades (Dobson, 2004; Suzán y Ceballos, 2005; Cleaveland, 2007).

La diversidad biológica puede jugar un doble papel en la emergencia o transmisión de enfermedades infecciosas, pues algunos cambios en la composición de especies de hospederos puede proveer de una fuente potencial más grande de patógenos (efecto de amplificación) y por otro lado puede reducir (efecto de dilución) la prevalencia de agentes infecciosos (Keesing *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la transmisión de patógenos de animales domésticos a silvestres, denominado *Spill-over*, ha sido la base de la aparición de enfermedades infecciosas en animales silvestres, convirtiéndose en una amenaza para las especies susceptibles o aquellas en peligro de extinción (Murray *et al.*, 1999). Cuando alguna especie susceptible a alguna enfermedad se encuentra en hábitats fragmentados con poblaciones reducidas y cercana o en convivencia con especies que pueden ser reservorios de algún patógeno, el riesgo de extinción puede aumentar (Dobson, 2004; Cleaveland *et al.*, 2007; Suzán y Ceballos, 2005). Se sabe que cuando las especies están estrechamente relacionadas, como lo son los carnívoros domésticos y los silvestres, existe un mayor riesgo de contraer alguna enfermedad infecciosa (Davies y Pedersen, 2008).

Enfermedades como el parvovirus (CPV) y el distemper canino (CDV) son algunos de los patógenos que se han reconocido como un problema creciente para la conservación en todo el mundo, pues cada vez existe mayor evidencia de que estas enfermedades pueden mantenerse y persistir en un sistema multi-hospedero en donde los perros domésticos y los carnívoros silvestres juegan un papel fundamental (Roelke-Parker *et al.*, 1996; Craft *et al.*, 2008; Almberg *et al.*, 2010). Los cánidos domésticos (*Canis lupus familiaris*) es la especie más abundante y distribuida en el mundo (Daniels y Bekoff, 1989) y los perros son particularmente abundantes en las zonas urbanas de algunos países en desarrollo, donde pueden ser excelentes reservorios de patógenos, ya que por lo

general viven en grandes poblaciones, no son vacunados y se les permite transitar libremente, facilitando el contacto entre huéspedes infectados y susceptibles (OMS/ WSPA, 1990).

El CPV y el CDV pueden transmitirse de forma directa o por el contacto con fómites o heces de animales infectados, y pueden propagarse rápidamente porque los carnívoros tienen altas tasas de dispersión debido a que pueden moverse grandes distancias y a que sus áreas de distribución son muy amplias (Murray et al, 1999; Woodroffe et al., 2004), sin embargo, falta mucho por comprender acerca de cómo se mantienen y transmiten entre sus poblaciones (Murray *et al.*,1999).

En Norte América durante muchos años se han documentado brotes epizoóticos de CPV y CDV en distintas poblaciones de animales silvestres. En los últimos años se ha encontrado evidencia de estos patógenos en carnívoros silvestres importantes para la conservación, como los lobos del Parque Nacional de Yellowstone (Almberg *et al.*, 2009; Mech *et al.*, 2008) y las infecciones por CDV en grandes félicos como leones (*Panthera leo*), tigres (*Panthera tigris*), leopardos (*Panthera pardus*) y jaguares (*Panthera onca*) en cautiverio (Appeal y Summers, 1999). También el CDV y CPV han contribuido a la declinación de poblaciones de carnívoros silvestres como la zorra de isla Catalina (*Urocyon littoralis catalinae*), el mink de Florida (*Neovison vison*), coyotes, lobos (*Canis lupus*), pumas (*Puma concolor*) y otros carnívoros silvestres en Estado Unidos (Almberg *et al.*, 2010). De acuerdo a estudios realizados en Norte América se sabe que especies como coyotes (*Canis latrans*), mapaches (*Procyon lotor*), zorrillos (*Mephitis sp.*) y zorras (*Urocyon sp.*) que se han adaptado a los ambientes urbanos, sirven como enlace en la transmisión de enfermedades como el CPV y CDV entre animales domésticos y las especies silvestres (Kapil *et al.*, 2008).

En nuestro país la información sobre la prevalencia de enfermedades infecciosas en carnívoros silvestres es escasa (Suzán y Ceballos, 2005; Mena, 2007; Araiza *et al.*, 2007; Rendón, 2009; Guerrero, 2011) y poco se sabe de las infecciones en la frontera norte de nuestro país, donde coexisten varias especies de carnívoros silvestres y domésticos y donde las condiciones ambientales son similares a los de la frontera sur de EUA.

La región de la Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua (RBJ) destaca por mantener una gran riqueza biológica (List *et al.*, 1998; CONANP, 2006) y por ser una zona cercana al Sur de Estados Unidos, donde se han reportado casos de CPV y CDV en carnívoros silvestres en zonas de California, Arizona, Colorado y Texas (Guo *et al.*, 1986; Appeal *et al.*, 1994; Gese *et al.*, 1997). Es importante destacar la extinción en vida libre del hurón de patas negras (*Mustela nigripes*) en Norteamérica; las principales causas fueron el envenenamiento y disminución de su hábitat, así como el brote de distemper canino transmitido por perros domésticos; sumado a la disminución de las poblaciones de su principal alimento el perrito de cola negra (*Cynomys ludovicianus*) debido al brote de peste bubónica (Williams *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1996). El poco impacto antropogénico y la importancia biológica de esta zona, así como los esfuerzos por recuperar a estas especies, logró que en 2001 la RBJ fuera considerada como uno de los sitios potenciales para la reintroducción al medio silvestre de los hurones (Miller *et al.*, 1996, Pacheco *et al.*, 2002).

Por ello este trabajo tuvo como objetivo evaluar la presencia y la prevalencia de CPV y CDV en la reserva de la biósfera de Janos, Chihuahua; así como estimar asociaciones de estos patógenos con la diversidad de carnívoros silvestres; con la finalidad de conocer si estos agentes patógenos podrían estar afectando a las poblaciones de carnívoros y conocer las implicaciones que podrían tener en la conservación. Para ello seleccionamos 5 localidades en la Reserva de la Biósfera

de Janos (RBJ) en Chihuahua, México. Esta reserva se encuentra localizada al noroeste del estado, presenta un clima árido con veranos calientes y lluvias en invierno; la vegetación de la zona está compuesta a en su mayoría por pastizales y en menor cantidad por áreas de matorral y bosque (CONANP, 2006).

Los casos de brotes de enfermedades infecciosas reportados en carnívoros silvestres han demostrado que el “*Spillover*” de animales domésticos a silvestres se ha convertido en un problema de conservación a nivel mundial y ha sido poco estudiado en México (Mena, 2007; Guerrero, 2011). Los objetivos de este estudio que este estudio son identificar la presencia de CPV y CDV en carnívoros silvestres, e identificar las variables de diversidad, asociadas a su presencia y prevalencia; los resultados de este estudio podrían contribuir a establecer medidas adecuadas para el manejo y conservación de los carnívoros silvestres en México.

ANTECEDENTES

Distemper Canino

Generalidades

El virus del distemper canino (CDV) pertenece al género Morbillivirus de la familia Paramixoviridae. Los morbillivirus presentan genoma de **ARN** no segmentado de cadena simple, de sentido negativo y de un tamaño aproximado de 15.7 kb (Lamb y Parks, 2007). Es un virus con un diámetro aproximado de entre 150-300 nm (Zipperle *et al.*, 2010). Codifica una proteína asociada a la cápside (M), dos glicoproteínas; Hemoglutinina (H) y una proteína de fusión que se encuentra en la envoltura (F), dos proteínas asociadas a la actividad de transcriptasa; fosfoproteína (P) y una proteína grande (L) proteína asociada a la nucleocápside (N) que encapsida el **ARN** vírico (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Este virus presenta 6 genes llamados N, P/V/C, M, F, H y L que codifican las 6 proteínas estructurales del virión, cada gen codifica una proteína, excepto P/V/C que codifica la fosfoproteína P y dos proteínas no estructurales denominadas C y V. El gen H es una proteína fundamental para el virus y sus hospederos animales, pues utiliza esta proteína para unirse a los receptores sobre la célula en el primer paso de la infección. Tras unirse la proteína F, fomenta la fusión de las membranas de las células del huésped que da lugar a la formación de sincitios (Lamb *et al.*, 2006).

Se han identificado 8 genotipos del CDV ubicados geográficamente: América-1 (que incluye la mayoría de las cepas vacúnales), América-2 (Norteamérica), Ártica (región ártica de Europa), Asia-1, Asia-2, Europa-1, Europa-2 (animales silvestres) y Sudáfrica (An *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2006, 2007; Woma *et al.*, 2010).

La infección y diseminación del virus se produce por contacto directo y se caracteriza por fiebre, signos respiratorios e intestinales y trastornos neurológicos (Appel, 1987), el virus entra por vía oral o nasal y comienza a replicarse en el tejido linfoide, produciendo inmunosupresión grave. El periodo de incubación puede variar de entre 1 a 4 semanas o más y el resultado de la infección y la gravedad de los signos varían dependiendo de la virulencia de la cepa, la edad del animal y el estado inmunitario, aunque mundialmente se reconoce un solo serotipo, circulan varios genotipos de distinta virulencia y tropismo celular, (Greene y Appel, 1998).

El rango natural de hospederos comprende familias del orden Carnívora como Canidae (perros, coyotes y zorros) Procyonidae (mapaches y panda rojo) Mustelidae (hurones, visones y tejones) Mephitidae, Hyaenidae, Ailuridae, Viverridae y Felidae (Meesling *et al.*, 2003), pero también afecta a especies del orden Artiodactyla y a primates (Appel *et al.*, 1991; Machida *et al.*, 1993).

Los individuos susceptibles pueden ser de diferentes edades, siendo los cachorros los más propensos a padecerla, puede presentarse de forma subclínica o inaparente o de manera aguda con altas mortalidades, dependiendo de la especie en cuestión, la cepa viral o el ambiente (Appel y Summers, 1995). Los animales infectados diseminan el virus a través de las excreciones corporales después de 7 días; los signos clínicos incluyen neumonía, conjuntivitis, diarrea, ataxia e hiperestesia. Los animales que logran recuperarse adquieren una inmunidad de larga duración (Appel, 1998; Montali, 1987).

Este virus se transmite por medio de la inhalación de las partículas virales o por aerosoles (Greene y Appel, 1998), la enfermedad se disemina fácilmente entre especies susceptibles en donde los perros son el principal reservorio. El CDV es enzoótico en la mayoría del mundo, y las zonas donde se han presentado epizootias fueron en los individuos que se encontraban aislados del virus o no estaban vacunados, haciéndolos altamente susceptibles (Appel y Summers, 1995).

El diagnóstico del distemper canino (CDV) se basa en la historia clínica, así como la observación de signos clínicos y lesiones, la demostración de los característicos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos identificados mediante la histopatología, así como la seroneutralización, prueba estándar para la detección de anticuerpos contra la enfermedad (Appel y Robson, 1973).

La utilización de vacunas de virus activo modificado es la principal forma de control contra el CDV. Los programas actuales para el control de esta enfermedad se basan en la vacunación de la mayoría de los individuos dentro de una población, suponiendo una inmunidad eficiente dentro de sus grupos (Greene y Appel, 1998; John y Samuel, 2000).

En los últimos años ha sido una enfermedad reportada en carnívoros silvestres en todo el mundo, por ejemplo en los grandes félidos del Parque Nacional Serengeti en Tanzania (Roelke- Parker *et al.*, 1996) en zoológicos de Norteamérica (Appeal *et al.*, 1994), pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona (Appeal *et al.*, 1991), en primates no humanos (*Macaca fuscata*) en Japón (Yoshikawa *et al.*, 1989), así como en lobos (*Canis lupus*), zorros (*Vulpes vulpes*) y coyotes (*Canis latrans*) en América (Laurenson, 1998; Cleaveland *et al.*, 2000; Almberg *et al.*, 2010).

Parvovirus canino

Generalidades

El CPV es un virus pequeño (25nm) ADN de cadena sencilla sin envoltura pertenece a la familia *Parvoviridae* del genero *Parvovirus* que posee tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y dos no estructurales NS1 y NS2 (Murphy *et al.*, 1995) este virus está estrechamente relacionado al de la panleucopenia felina (FPV), al parvovirus de los mapaches (RPV), los minks (*Mustela lutreola* o *Neovison vison*) (MEV), el zorro azul (*Alopex lagopus*) (BFPV) y al perro mapache (*Nyctereutes procyonides*) (RDPV) (Tattersall *et al.*, 2005). Existen 2 tipos de parvovirus canino, antigénicamente diferentes, uno conocido como MVC o parvovirus canino tipo1 (CPV-1) y otro llamado parvovirus canino tipo 2 (CPV-2). La infección por CPV- 1 puede transmitirse por vía oro-nasal o transplacentaria, tras la infección el virus se replica en los tejidos linfáticos y el epitelio intestinal, la mayoría de las infecciones son asintomáticas y los animales rara vez presentan signos clínicos (Berns *et al.*, 2000).

El parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) surgió como un nuevo patógeno que se extendió en todo el mundo causando alta mortalidad en los perros y se piensa que se originó de un ancestro antigénicamente parecido, adaptado a un nuevo huésped a través de algún carnívoro silvestre (Truyen *et al.*, 1998). Aunque las

tasas de mortalidad e infección se redujeron con la introducción de la vacuna, el virus ha mutado generando tres variantes antigénicas más CPV-2a, 2b y 2c que se han encontrado en Europa, Asia, África y América (Truyen, 2006; Nakamura *et al.*, 2004).

Este virus se replica en el tejido linfoide y se difunde por los leucocitos hasta llegar al epitelio intestinal, causando diarreas hemorrágicas graves; también es capaz de replicarse en las células cardíacas ocasionando miocarditis fatal (Truyen, 2006). Es transmitido por el contacto con las heces de animales infectados o por fómites; el virus no afecta a todos los perros de la misma forma, las distintas cepas producen efectos diferentes dependiendo de la edad del animal, la exposición, la dosis del virus y la virulencia de la cepa (Truyen, 2006). La excreción del virus en las heces le permite sobrevivir en el ambiente por meses, ya sea en el frío, humedad o calor y cuando los animales sobreviven a la infección, poseen una inmunidad de por vida (Nakamura *et al.*, 2004).

El diagnóstico clínico puede ser difícil ya que muchas otras patologías pueden causar diarreas; por ello realizar estudios de laboratorio es esencial. Existen pruebas como ELISA la cual utiliza muestras derivadas de las heces de animales sospechosos, la Inmunocromatografía (IC), Hemoaglutinación (HA) o pruebas como PCR para la detección del ADN viral que son muy sensibles (Desario *et al.*, 2005; Truyen *et al.*, 1998). Sin embargo para detectar la exposición al virus, debido a su capacidad hemoaglutinante, la técnica más utilizada es la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) para muestras de suero (Carmichael *et al.*, 1980).

El parvovirus afecta a todas las especies de cánidos (Green, 1993) y se ha reportado en carnívoros silvestres como prociónidos, mustélidos, úrsidos y en felinos, causando altas mortalidades en cachorros (Funk *et al.*, 2001). En poblaciones de carnívoros silvestres en donde es vital mantener cierto número de individuos para una población estable, este virus puede afectar el éxito

reproductivo contribuyendo a su extinción (Woodroffe, 1999). El control del parvovirus canino se lleva a cabo mediante la utilización de vacunas con virus activo modificado o inactivado, así como realizar la vacunación de la mayoría de los individuos susceptibles en la población (Jonh y Samuel, 2000). Otra medida de control es la reducción del contacto entre animales infectados y los susceptibles.

Esta enfermedad ha sido asociada a perros domésticos como reservorios y transmisores a especies de carnívoros silvestres en todo el mundo, reportándose en lobos, zorros y coyotes en América, así como a epidemias con alta mortalidad en leones africanos (Laurenson, 1998; Cleaveland *et al.*, 2000; Almberg *et al.*, 2010).

Carnívoros domésticos como fuente de infección

Los animales domésticos son especies con una amplia distribución mundial y son mantenidos en altas densidades y pueden actuar fácilmente como reservorios de patógenos que pueden compartirse con los animales silvestres (Lafferty y Gerber, 2002). Los perros y los gatos son los carnívoros domésticos más comunes, se encuentran en todo el mundo y están asociados a los asentamientos humanos, como animales de compañía, trabajo o protección (Cleaveland *et al.*, 2006; Young, 1994; Serpell, 1995).

En los países en vías de desarrollo muchas poblaciones de perros se encuentran libres en las zonas rurales, utilizando áreas naturales o de ganadería para buscar comida, ocasionando interacciones con los animales silvestres e incrementando la probabilidad de transmisión de enfermedades infecciosas (van de Bilt *et al.*, 2002). Enfermedades causadas por CPV y el CDV se mantienen en zonas urbanas y rurales donde la densidad de perros es alta (Haydon *et al.*, 2002a), por lo que representan una buena oportunidad para el mantenimiento de estos patógenos ya

que los perros domésticos se encuentran ampliamente distribuidos y con escasa vacunación (Susuky *et al.*, 2007).

Los cánidos domésticos y ferales afectan a las poblaciones de carnívoros silvestres de diferentes formas; depredación, competencia, hibridación y transmisión de enfermedades (Young *et al.*, 2011). Las interacciones que ocurren entre carnívoros domésticos y silvestres en zonas rurales, en donde los perros y gatos suelen desplazarse en áreas dominadas por humanos y ocasionalmente tener cercanía con la fauna silvestre local (Wandeler *et al.*, 1993), no sólo afecta a los animales silvestres, también incrementa el contacto con los asentamientos humanos cercanos y la posible transmisión de enfermedades zoonóticas.

Los perros domésticos han sido reconocidos como importantes agentes de infección, causando epizootias en distintas especies, como la epidemia de distemper en los leones del Serengueti, originada por perros domésticos no vacunados cercanos al parque (Cleaveland *et al.*, 2000; Roelke-Parker *et al.*, 1996). Otros ejemplos de los efectos de los perros domésticos en las poblaciones de carnívoros silvestres son la pérdida poblacional del perro salvaje africano (*Lycaon pictus*) a causa de la rabia (Woodroffe, 1997), así como la hiena moteada (*Crocuta crocuta*) y el hurón de patas negras (*Mustela nigripes*) por distemper canino (McCarthy *et al.*, 2007; Roelke-Parker *et al.*, 1996). Incluso sin la existencia de un contacto directo entre los perros y los carnívoros silvestres, algunos patógenos como el CPV tienen la capacidad de mantenerse en el ambiente por largos períodos, suficiente para la transmisión de la enfermedad (Gordon y Angrick, 1986).

Aunque se ha reportado que el tamaño de las poblaciones de carnívoros silvestres, no es suficiente para mantener enfermedades infecciosas, ya que estas requieren de un contacto directo entre individuos de diferentes especies (Dobson y Foufopoulos, 2001), el *spillover* de patógenos proveniente de los perros

domésticos puede afectarlos en gran medida e incluso causar su extinción (Cleaveland *et al.*, 2000).

El incremento en la probabilidad de transmisión de enfermedades en donde la interface humano, animales domésticos y silvestres es más estrecha (Dazak *et al.*, 2000) el conocimiento de los factores que determinan la transmisión de enfermedades podría ayudarnos a predecir la emergencia de patógenos, así como evitar la extinción de fauna silvestre y el control de enfermedades zoonóticas (Deem *et al.*, 2001).

Importancia de los carnívoros en el ecosistema

Los carnívoros son depredadores y son reconocidos como especies fundamentales en los ecosistemas porque proveen varios servicios, como la capacidad para regular el número, distribución y comportamiento de sus presas (Halpern *et al.* 2005; Dobson *et al.*, 2006), como indicadores de una alta riqueza de especies (Sergio *et al.*, 2006) y porque ayudan a promover el desarrollo económico gracias a su naturaleza carismática utilizada en la recreación y el ecoturismo (Dobson *et al.*, 2006).

Su papel ecológico es muy importante, ya que su influencia directa se extiende no sólo a los herbívoros y las plantas a través de sus efectos en la cascada trófica, también sabemos de su papel en la regulación de mesodepredadores (Ripple *et al.*, 2013; Terborgh *et al.*, 2010). Los carnívoros poseen la doble función de limitar a las poblaciones de herbívoros mediante la depredación, así como la competencia interespecífica con los mesocarnívoros; contribuyendo de manera directa sobre múltiples niveles de la red trófica, influyendo en la estructuración y funcionamiento de los ecosistemas (Prugh *et al.*, 2009, Ripple *et al.*, 2010).

La naturaleza y fuerza de sus impactos responde a factores como su tamaño, demanda metabólica, densidad, sociabilidad y tácticas de caza (Prugh *et al.*, 2009; Ritchie *et al.*, 2009). Los carnívoros pueden tener limitaciones energéticas, historias de vida lentas, bajas densidades poblacionales y necesidad de una mayor distancia para conseguir presas (Carbone *et al.*, 2009) por lo que la combinación de todas estas cualidades los ha puesto en conflicto con la creciente demografía humana (Cardillo *et al.*, 2005).

Los carnívoros son particularmente sensibles a los cambios en el paisaje, debido a sus bajas densidades poblacionales y a la necesidad de grandes extensiones de superficie (Carroll *et al.*, 2001). Los impactos humanos que más han afectado a sus poblaciones incluyen la pérdida y degradación de su hábitat, la cacería y la introducción de especies exóticas, frenando o incluso eliminando los servicios ecosistémicos que proveen (Hilton y Taylor, 2000).

Los cambios efectuados en el paisaje por la actividad humana han generado nuevas interacciones entre humanos y animales silvestres, superficies en las que antes se requería décadas para modificarlo, ahora requieren de pocos años, proporcionando nuevos hábitats para algunas especies, permitiéndoles adaptarse y sobrevivir (Radeloff *et al.*, 2005).

Las especies exitosas en los nuevos ambientes usan la flexibilidad en su comportamiento como mecanismo de adaptación bajo condiciones extremas (Sol y Lefebvre, 2000). Definiendo como flexibilidad en el comportamiento, a la capacidad de responder apropiadamente a condiciones normales, pero en caso de ser necesario alterar su respuesta ante los cambios (Schlaepfer *et al.*, 2002).

Ejemplo de estas adaptaciones a los cambios antropogénicos es el surgimiento de especies generalistas (Dukes y Mooney, 1999). En Norteamérica el mapache (*Procyon lotor*), el zorrillo (*Mephitis mephitis*), el tlacuache (*Didelphis virginiana*) y

el coyote (*Canis latrans*) por su amplia distribución en zonas desérticas, bosques, praderas y zonas urbanas, así como su adaptación al alimento y refugio (Crooks y Soulé, 1999; Bekoff y Gese, 2003; Gehrt, 2007) los hace un claro ejemplo de especies generalistas (Prange y Gehrt, 2004).

Aunque algunas especies de carnívoros silvestres han logrado adaptarse a los cambios constantes en su hábitat, la disminución reciente en sus poblaciones demuestran que las enfermedades infecciosas, tienen importantes efectos en su conservación (Murray *et al.*, 1999); ya que pueden ser un factor importante en la regulación de su supervivencia (Deem *et al.*, 2001; Funk *et al.*, 2001).

El creciente aumento de ungulados y carnívoros domésticos en hábitats fragmentados, aumenta el riesgo de la presencia de patógenos en poblaciones reducidas de carnívoros silvestres, ocasionando mayor contacto entre individuos, así como el aumento en la transmisión de enfermedades y otras presiones poblacionales (Deem *et al.*, 2001).

Por ello para prevenir la disminución en las poblaciones de carnívoros silvestres, es de gran importancia identificar las enfermedades que los afectan, los factores ecológicos y antropogénicos, así como los posibles reservorios de agentes patógenos que podrían afectarlos, como una herramienta clave para el éxito en la conservación de carnívoros silvestres en todo el mundo.

La biodiversidad y las enfermedades

La diversidad de especies en el mundo se ha visto amenazada por diversos factores importantes; la pérdida de hábitat, la disponibilidad de recursos, la depredación y las especies invasoras incluyendo a mucha enfermedades, esta última se ha comenzado a estudiar con más detenimiento para entender como los patógenos tienen una influencia directa sobre los individuos, así como sobre la estructura de sus poblaciones y comunidades (Keesing *et al.*, 2006).

Actualmente es reconocida la importancia de la alteración de la diversidad de especies en la transmisión de diferentes patógenos (Dazak *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2008). Existen diferentes estudios en donde se ha descrito que especies comunes actúan como reservorios de algún patógeno, pero en poblaciones donde cuentan con una alta diversidad de especies dentro de una comunidad de hospederos, puede desviarse la transmisión del patógeno de los reservorios primarios hacia otros hospederos que actúan como un filtro, o si se disminuye la abundancia de los reservorios primarios; se reducen las tasas de transmisión dependientes de la densidad poblacional (Ostfeld *et al.*, 2000a; Norman *et al.*, 1999; Begon, 2008; Suzán *et al.*, 2009). Para ambos casos una alta diversidad está correlacionada con una baja prevalencia de la enfermedad (Knops *et al.*, 1999; Roscher *et al.*, 2007).

Para entender cómo la diversidad puede incrementar o disminuir la presencia de una enfermedad, debemos conocer si la transmisión del patógeno responde a la densidad de huéspedes infectados (*denso dependiente*) o a la proporción total de la población infectada (*frecuencia dependiente*) (Dobson, 2004; Rudolf y Antonovic, 2005). Cuando la transmisión es *denso dependiente*, al adicionar nuevas especies se reducirá la transmisión, es decir que la abundancia del huésped principal se reduce al incluir más especies; por lo tanto la transmisión interespecífica es menor que intraespecífica. En casos donde la transmisión es

frecuencia dependiente al añadir nuevos hospederos se disminuirá la enfermedad, sin importar si se reduce o no la abundancia del huésped principal; por lo que se logrará una disminución de la proporción de los individuos infectados al agregar especies, logrando disminuir el contacto entre individuos susceptibles e infectados (Dobson, 2004). Estudios realizados en comunidades de roedores y hantavirus, un patógeno de transmisión directa; ha demostrado que cuando el reservorio competente es la especie dominante se presentan prevalencias más altas que cuando no se encuentra al reservorio competente, disminuyendo así la probabilidad de encuentros directos entre los reservorios, cuando se aumenta la diversidad de especies de roedores (Suzán *et al.*, 2009; Mills, 2009).

Keesing y Ostfeld (2006) diseñaron modelos sobre el papel de la diversidad en la transmisión de enfermedades; estos describen las interacciones entre patógeno-hospedero, patógeno-vector-hospedero y patógeno-multihospederos. Explicando los efectos por los que puede darse la transmisión de enfermedades; amplificación o reducción de los agentes infecciosos, proporcionando así una visión del potencial riesgo en las enfermedades (Keesing *et al.*, 2006). El efecto de dilución se produce cuando existe una alta diversidad de especies, disminuyendo la prevalencia del patógeno. Cuando se reduce la tasa de encuentro entre los individuos infectados y los individuos susceptibles, disminuye la tasa de transmisión, reduciendo la abundancia de los reservorios o el aumento en la mortalidad o recuperación de los individuos infectados (Keesing *et al.*, 2006). El efecto de amplificación se produce cuando existe una relación positiva entre la biodiversidad y la prevalencia del patógeno, esto puede pasar en las comunidades de baja diversidad en que las especies de reservorios competentes son abundantes o la adición de nuevas especies que son capaces de adquirir y transmitir al patógeno fácilmente (Keesing *et al.*, 2006).

En el caso de enfermedades como el distemper y parvovirus canino en donde se ha comprobado que los virus causales se mantienen y transmiten por el contacto con animales domésticos; la dinámica de las enfermedades infecciosas está fuertemente influenciada por el comportamiento y la ecología de los carnívoros silvestres; estos se presentan en bajas densidades de población y viven en grupos sociales territoriales altamente unidos (Mills, 1997; Woodroffe, 2011; Fuller *et al.*, 1992). Modelos epidemiológicos simples predicen que las altas tasas de contacto que se producen dentro de los grupos sociales eleva la prevalencia de infecciones por transmisión directa (Anderson y May, 1979), una predicción que es ampliamente apoyada por datos empíricos (Coté y Poulin, 1995).

Por lo tanto, la exposición podría ser especialmente alta en grupos grandes de carnívoros silvestres cuando se introduce un patógeno. Sin embargo, los encuentros entre los grupos son raros debido a la baja densidad de población y el comportamiento territorial, por lo que puede haber pocas oportunidades para la transmisión de patógenos entre los grupos (Woodroffe y Donnelly, 2011). Estos efectos sobre el comportamiento de los patrones de contacto sugiere que es probable que la transmisión intraespecífica de patógenos sea dependiente de la frecuencia en lugar de dependiente de la densidad (Begon *et al.*, 2002).

Por lo tanto para poder prevenir disminuciones en las poblaciones de carnívoros silvestres, es de gran importancia identificar las posibles enfermedades que los afectan, así como las condiciones ecológicas que incrementan su severidad y dispersión (Murray *et al.*, 1999).

La Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua

Uno de los sitios más importantes para la conservación de mamíferos en México es la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, ya que mantiene una gran riqueza biológica gracias a diferentes factores como su localización geográfica y el poco impacto que ha tenido la región a lo largo de la historia. Una de sus características más relevantes es que está considerada un área prioritaria para la conservación de la naturaleza en Norteamérica (Ceballos *et al.*, 2004; CONABIO, 2000).

Esta área posee 79 especies de mamíferos pertenecientes a 47 géneros, 18 familias y 4 órdenes (Pacheco *et al.*, 2000; Ceballos *et al.*, 2004). Es una prioridad para la conservación de la biodiversidad en Norteamérica, ya que posee hábitats poco representados en áreas naturales protegidas, como es el ecosistema de pastizal; poblaciones abundantes de especies en riesgo (*Vulpes macrotis*, *Taxidea taxus*, *Puma concolor*, *Ursus americanus*, *Bison bison*, *Cynomys ludovicianus*, *Antilocapra americana* y *Erethizon dorsatum*) (Pacheco y Ceballos, 1999-2000). Es importante resaltar que el perro llanero (*Cynomys ludovicianus*) de Norteamérica, esencial en el ecosistema de pastizal, ya que permite la presencia de especies en riesgo como el águila real, el tecolote llanero y la zorra del desierto, pues estas dependen de ellos para obtener comida o refugio (Ceballos *et al.*, 2000; List, 2003).

Además de su riqueza animal, esta zona también es relevante por su importancia vegetal, pues a pesar de ser un mosaico de áreas naturales y modificadas mantiene zonas de matorrales y bosques, manchones de vegetación riparia y humedales, así como grandes extensiones de pastizal, un ecosistema seriamente amenazado en México (Ceballos *et al.*, 2005; COTECOCA, 1978).

Tal vez uno de los registros más recientes sobre la extinción de una especie de mamífero de vida libre de Norteamérica, en donde la presencia de enfermedades infecciosas estuvieron involucradas, fue lo ocurrido en los años 70's; donde la combinación de diferentes factores como el brote de peste bubónica y de distemper canino, así como la declinación de las poblaciones de perro llanero por envenenamiento; ocasionó que en 1980 se declarará como posiblemente extinta en vida silvestre al hurón de patas negras (*Mustela nigripes*) (Miller *et al.*, 1996). Los intentos de recuperación de la especie y posterior reintroducción al medio silvestre incluyeron diversos sitios donde se encontraran poblaciones estables del perro llanero, su principal fuente de alimento; entre ellos se consideró como un sitio potencial para la reintroducción a la región de Janos-Casas grandes, Chihuahua, debido a que se contaba con una de las poblaciones más extensas de esta especie, por lo que en 1998 se logró el reconocimiento de esta área en particular para la sobrevivencia de estos mustélidos y en 2001 fueron puestos en libertad en las praderas mexicanas 94 individuos. (Pacheco *et al.*, 2002). Aunque se liberaron con éxito estos hurones como parte de los esfuerzos de recuperación de sus poblaciones, a la fecha no se han podido identificar individuos o poblaciones estables, las causas aún son desconocidas; pues podrían intervenir distintas variables; como sus hábitos ecológicos o tal vez a causa de alguna enfermedad, pues son altamente sensibles al virus del distemper canino.

El estudio de la ecología de enfermedades en esta área aportará información sobre ciertos patógenos que afectan a los carnívoros de la zona y los factores de riesgo para su presencia y prevalencia; estos pueden ser relevantes para establecer medidas adecuadas para el manejo y conservación de los carnívoros silvestres, ya que en gran parte del mundo así como en México la diversidad biológica se pierde como consecuencia de las enfermedades que afectan a la fauna silvestre.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la presencia y prevalencia de parvovirus y distemper canino en la región de Janos y estimar asociaciones entre la prevalencia y presencia de estos patógenos con la diversidad y abundancia relativa poblacional de los carnívoros silvestres.

Objetivos específicos

- Describir la estructura de comunidades de carnívoros silvestres de acuerdo a los parámetros comunitarios de riqueza, diversidad y abundancia de especies en los diferentes tipos de vegetación (pastizal, matorral- pastizal y bosque de pino-encino).
- Determinar la prevalencia de parvovirus y distemper canino en las poblaciones de carnívoros silvestres y domésticos.
- Realizar el diagnóstico molecular para confirmar la presencia de parvovirus y distemper canino, así como determinar los genotipos que están circulando.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Este estudio se realizó en la Reserva de la Biosfera de Janos, la cual se localiza en el Municipio de Janos, situado al noroeste del Estado de Chihuahua, limitado al norte por la frontera de Nuevo México, Estados Unidos y al este con el Estado de Sonora. La reserva cuenta con una superficie terrestre de 5264 km² que incluyen en el extremo norte a la Sierra Madre Occidental y en el extremo oeste parte del Desierto Chihuahuense; presenta dos tipos de clima; árido templado y templado húmedo, en donde la vegetación está compuesta por pastizales, matorrales y bosques de pino- encino (COTECOCA 1978; Gay y Dwyer 1980; Lebgue, 2002).

Sitios de estudio

Se seleccionaron 5 sitios dentro de la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, cada uno con diferente tipo de vegetación de acuerdo a los descrito por Pacheco y colaboradores en 2000 (Cuadro 1), la distancia promedio entre cada sitio fue de 10 km en los cuales existía cercanía con casas, ranchos o pequeños poblados. Los tipos de vegetación incluyeron pastizal, matorral, bosque de pino-encino y zonas riparias y la combinación de matorral/pastizal (Figura 1).

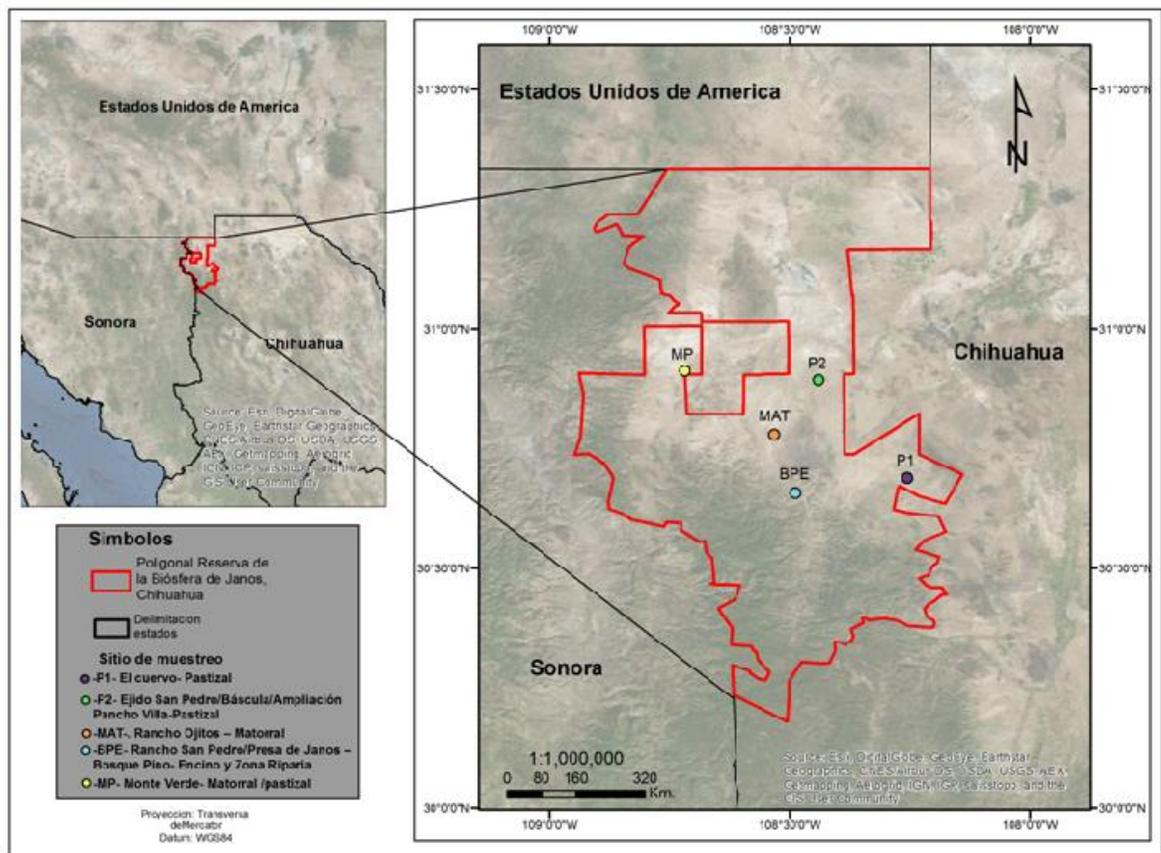


Figura 1. Mapa de localización de los sitios de muestreo

Cuadro 1. Clasificación de los sitios de estudio por tipo de vegetación

Localidad	Hábitat	Identificación
Cuervo	Pastizal	P1
Ejido San Pedro/Báscula/Ampliación Pancho Villa	Pastizal	P2
Rancho Ojitos	Matorral	MAT
Rancho San Pedro/Presa casa de Janos	Bosque de Pino- Encino/ Zona Riparia	BPE
Monte Verde	Matorral/ Pastizal	MP

Diseño de muestreo

Para este estudio se llevaron a cabo 2 muestreos, el primero en otoño-invierno (octubre-diciembre de 2013) y el segundo en primavera-verano (mayo-junio de 2014).

Trampas Tomahawk: en cada sitio se colocaron transectos, cada uno con 16 trampas Tomahawk (12 de 30" x 30" x 70" y 12 de 60" x 20" x 28") espaciadas a intervalos aproximados de 500 metros entre cada una. Partiendo de un diseño estratificado que contempla diferentes tipos de vegetación pastizal, bosque de pino-encino, matorral xerófilo y pastizal-matorral.

En cada transecto las trampas se dejaron activas por 10 días consecutivos, las trampas fueron cebadas con sardinas, pollo, atún y atrayentes comerciales, y se mantuvieron abiertas durante todo el día y revisadas en las mañanas.

Trampas cepos: para cada muestreo se colocaron un total de 16 trampas tipo cepo (Oneida Victor, #2 y #3) dispuestas en transectos a la orilla de caminos y veredas del área de estudio, estuvieron espaciadas aproximadamente a 500 metros de distancia entre cada una y fueron colocadas cerca de una trampa Tomahawk. Se usaron atrayentes comerciales. Los cepos se mantuvieron activos desde las 17:00-18:00 h hasta las 09:00 h, realizando al menos dos revisiones durante este periodo.

Cámaras-trampa: En cada muestreo se establecieron un total de 75 estaciones de monitoreo divididas en tres distintos tipos de vegetación, dando un total de 25 cámaras-trampa para cada hábitat (bosque de pino-encino, matorral xerófilo y pastizales). Cada estación estuvo compuesta por una cámara-trampa colocada a una altura de entre 40 y 120 cm y una estación olfativa cebada con sardinas y esencias. En cada sitio, las cámaras trampa fueron dispuestas en transectos,

dejando una distancia entre cada cámara de 1 km aproximadamente (Larrucea *et al.* 2007).

Registro de carnívoros silvestres

Captura de animales

Cada animal capturado en los ceños y en las trampas Tomahawk fue previamente sujetado con un lazo para perros (Gese *et al.*, 1987) antes de ser inmovilizado químicamente con una mezcla de hidrocloreuro de ketamina (Anesket®) e hidrocloreuro de xilacina (Rompun®) según las dosis reportadas para mamíferos medianos (Kreeger *et al.*, 2002). Los ejemplares capturados se identificaron por especie, registrando los datos de sexo, peso, tamaño, estado reproductivo y edad; cada individuo se marcó con aretes metálicos numerados en las orejas y fueron liberados en el sitio de captura.

En el caso de los cánidos domésticos, se manipularon con previa autorización de los propietarios, de ser necesario se utilizó un bozal para obtener sangre de la vena cefálica. Se realizó una pequeña encuesta a los propietarios para obtener datos acerca de edad, programa de vacunación y desparasitación, alimentación, enfermedades y actividades de recreo, similar a lo hecho por Acosta-Jamett en 2009. Después de obtener la muestra de sangre, todos los perros fueron vacunados contra la rabia con una vacuna de virus activo modificado (Rab-Aid® Laboratorios Pisa, México).

Toma de muestras

Se obtuvieron 3 ml de sangre con tubos con y sin anticoagulante de cada individuo por medio de punción venosa, el suero fue conservado en crioviales con tapa de rosca Sarsted® y mantenido a -196°C en un tanque de nitrógeno líquido para ser llevadas y posteriormente procesadas en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Figura 2



Figura 2. Manejo de individuos

Análisis de laboratorio

Parvovirus canino

Serología

Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0

Para la detección de anticuerpos virales contra el CPV se utilizó el Kit del Test Rápido Anigen para CPV Ag (BioNote, Inc.). Es un Inmunoensayo Cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno del CPV en el suero, plasma o sangre de muestras caninas. Este kit está diseñado para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG contra parvovirus canino, con una sensibilidad del 98% y especificidad del 100% comparada con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) según el fabricante (Figura 3).

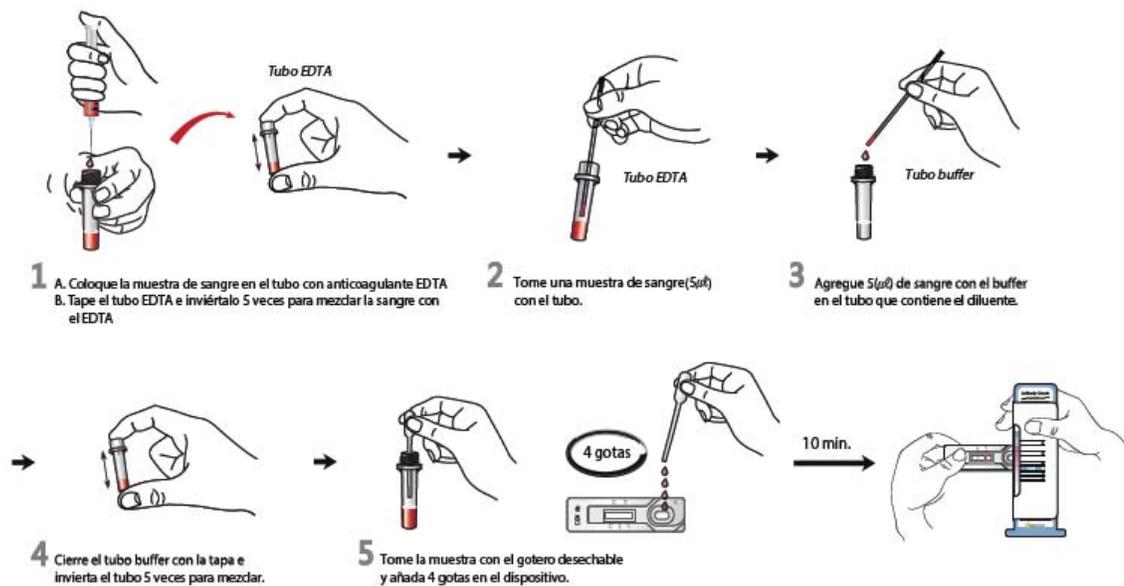


Figura 3. Técnica de Inmuno cromatografía Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0

Inhibición de la hemaglutinación (IH)

La prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación fue utilizada para detectar los anticuerpos contra las hemaglutininas virales, que evitan que éstos aglutinen a los eritrocitos. La prueba tiene dos variantes, se utilizó el método beta en donde se pusieron cantidades decrecientes de suero con cantidades constantes de virus (suero diluido - virus constante) (Coligan, 2005). Como control positivo se utilizó la cepa L-85 aislada en México de virus activo y modificado en cultivos celulares para los serotipos de campo CPV, CPV2a y CPV2b de una vacuna comercial donada por laboratorios Tornel.

Procedimiento:

Elaboración de una suspensión de eritrocitos de cobayo al 1%

Obtención de muestra sanguínea de cobayo mediante punción venosa, empleando una solución Alsevers como anticoagulante (volumen/volumen), los eritrocitos fueron utilizados en fresco. Fueron lavados tres veces, en cada lavado se agregó PBS y se centrifugó a 1000 xg por 15 min y se descartó el sobrenadante, para utilizar el paquete final y preparar la suspensión de eritrocitos.

Tratamiento de sueros para destruir inhibidores inespecíficos con caolín

Los sueros se trataron con caolín para destruir los inhibidores inespecíficos antes de su empleo en las reacciones de IH con caolín, para ello se mezclaron cantidades iguales de suero diluido 1/5 (20µl suero + 80µl PBS) en un tubo eppendorf con 100µl de caolín en una proporción de 1:1, se mezcló 2 o 3 veces y se incubó durante 20 min a temperatura del laboratorio, se centrifugó por 15 min a 1000xg a 4°C y se recuperó el sobrenadante para realizar la prueba de IHA.

Estandarización del virus a 4 UHA

Se tituló el virus por medio de la prueba de HA, realizando diluciones dobles seriadas comenzando con una dilución 1/5 en 100 µl en 12 pozos. La dilución necesaria para obtener las 4 UHA se obtuvo dividiendo el punto final de HA entre el número de unidades deseadas. Después se realizó una dilución doble seriada de los sueros sospechosos en 10 pozos, iniciando con 1:5 de la siguiente forma: se colocó 40 µl de Solución Salina Fisiológica (SSF) en el primer pozo y 25µl en los pozos restantes, se añadió 10µl del suero al primer pozo, se pipeteó 7 veces y se realizaron las diluciones dobles siguientes, transfiriendo 25µl de un pozo al siguiente y desechando 25µl en el último pozo.

Titulación del suero

Se colocaron 40µl de SSF en toda la primera columna de la placa de fondo en "U" (A-H) las últimas filas de la placa (G y H) fueron utilizadas para los testigos de eritrocitos y virus. Posteriormente se adicionaron 10µl de las muestras de suero sospechoso, pipeteando 7 veces y transfiriendo 25µl de la mezcla a los pozos restantes, y desechando la misma cantidad en el último pozo, después fueron añadidos 25µl del virus previamente titulado y se incubó a 37°C por 30 min, por último fueron añadidos a todos los pozos 25µl de eritrocitos de cobayo a todos los pozos de la placa (Figura 4). Se realizó la lectura a los 30 o 45 min, cuando los pozos del control de eritrocitos se habían sedimentado para formar un botón bien delimitado y el control del virus estaba hemoaglutinado (Coligan, 2005).

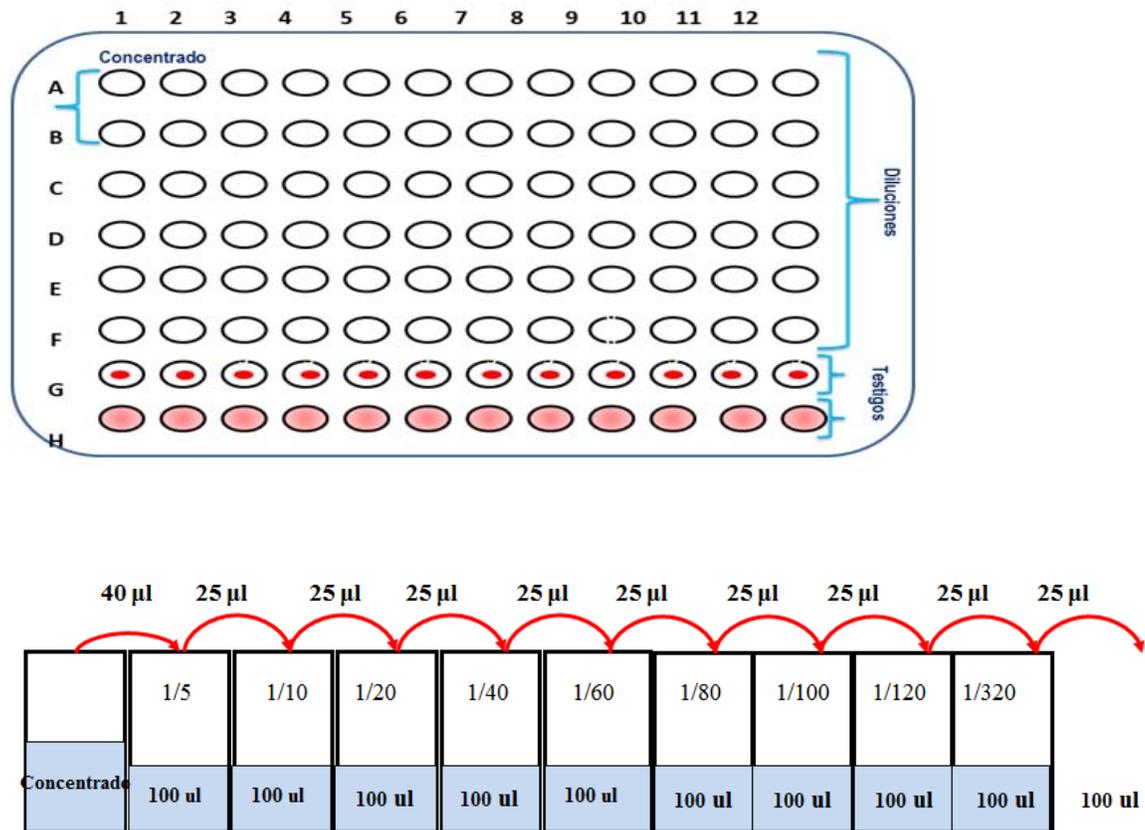


Figura 4. Procedimiento para la titulación de parvovirus canino con la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.

Para la determinación de anticuerpos contra el CPV en las muestras obtenidas se observó la inhibición de la Hemoaglutinación en los sueros positivos a la infección que consistió en la formación de un botón con borde bien definido en el fondo de la placa, considerando títulos positivos a partir de $\geq 1:60$. En el testigo del virus se observó aglutinación y se confirmó que se utilizaron las Unidades Hemoaglutinantes previstas en la prueba, mientras que en los testigos de suero y glóbulos rojos se observó sedimentación. Para determinar el título viral del CPV se empleó el método estadístico de Reed and Muench (Cunningham, 1971; Burleson *et al.*, 1992; Harlow y Lane, 1999; Coligan, 2005).

Detección Molecular del CPV

Para la extracción de **ADN** de las 84 muestras obtenidas para el diagnóstico de parvovirus canino se utilizó el protocolo de purificación total de **ADN** de sangre animal o células, Spin-Column Protocol del kit DNeasy® Blood & Tissue Kit, Quiagen. Posteriormente el material genético obtenido fue trasladado a los laboratorios Tornell en la Ciudad de México donde fueron amplificados mediante PCR con cebadores del propio laboratorio.

Obtenidos los productos de la amplificación, fueron purificados y enviados al Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM, posteriormente fueron comparados con el banco de secuencias de los virus reportados en el GenBank (Benson *et al.*, 2005). Finalmente se realizó un análisis y un árbol filogenético para establecer el genotipo, utilizando el software **MEGA 6**.

Distemper canino

Serología

Anigen Rapid CDV Ab Test Kit 2.0

Para la detección de anticuerpos contra el CDV se utilizó el Test Rápido Anigen para CDV Ag (BioNote, Inc.) es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno del Parvovirus Canino en el suero, plasma o sangre de muestras caninas. Este kit está diseñado para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG contra el CDV, con una sensibilidad del 98% y especificidad del 100% comparada con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) según el fabricante (BioNote, Inc.) (Figura 5).

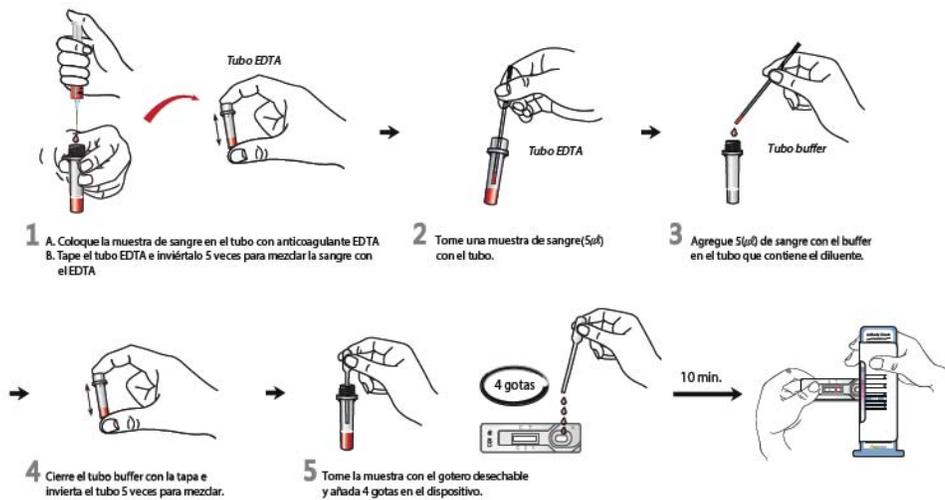


Figura 5. Técnica de Inmunocromatografía Anigen Rapid CDV Ab Test Kit 2.0

Seroneutralización

Cultivo celular

Para la realización de la prueba de Seroneutralización se llevó a cabo el crecimiento y mantenimiento de dos líneas celulares; MDCK NBL-2 CL-34™ ATCC® (Madin Darby Canine Kidney) y Vero CCL-81™ ATCC® (Kidney Epithelial *Cercopithecus aethiops*). Las líneas celulares se descongelaron a 4°C y fueron centrifugadas a 1500 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO 12800-07 EE.UU) al 10% de suero fetal bovino (FBS, GIBCO® EE.UU).

Se usó un gabinete de bioseguridad nivel II para el trabajo de las líneas celulares, el descongelamiento consistió en verter el microtubo con las células previamente descongeladas con una pipeta serológica a una botella de 25 cm² (Sarstedt

EE.UU) que contenía 4 ml de medio de crecimiento pre incubado a 37 °C. Se colocó en una temperatura de 37°C y se dejó incubar 72 horas hasta obtener una monocapa confluyente del 80 al 100%. Posteriormente se decantó el medio del lado contrario a la monocapa y se agregó 0.5 ml de una solución de lavado para retirar células muertas y detritus celular, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, se decantó la solución, se adicionó 0.25 ml de solución de desprendimiento de Tripsina EDTA 0.25%) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, y así promover el desprendimiento y disgregación de la monocapa de cultivo. Posteriormente se resuspendió en medio de crecimiento para subcultivar y se distribuyeron en nuevas botellas de 25 cm². Esas botellas a su vez se crecieron en el medio de mantenimiento DMEM al 10% de suero fetal bovino (SFB) para posteriormente ser crecidas en botellas de 75cm² con un volumen final de de 15 ml por botella y obtener un “stock de células” que se utilizaron para la prueba de Seroneutralización (Payment y Trudel, 1993).

Prueba de Seroneutralización

Se utilizaron células Vero en placas de 96 pozos con un 80% de confluencia. Previamente en una placa de 96 pozos sin células se realizaron las diluciones del virus titulado y los sueros sospechosos, adicionando 45µl de MEM al 2% en los pozos, a excepción de las filas asignadas para los controles de virus y sueros (G y H respectivamente) que contenían medio al 10%. En seguida se adicionó 5µl de suero a toda la placa, se pipeteó 7 veces y fueron transferidos 25µl a los pozos restantes desechando la misma cantidad en el último pozo, en seguida fueron colocados 50µl de virus a todos los pozos incluidos los controles y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente 37°C.

Una vez realizadas las diluciones, la placa que contenía las células fue decantada y se fueron transfiriendo de la placa de ELISA a la de cultivo celular las diluciones

realizadas a partir de la dilución más baja a la más alta, respetando las últimas filas como controles. Por último se registró el efecto citopático 24, 48 y 72 horas post infección (pi) considerando títulos positivos a partir de $\geq 1:16$.

Esta prueba se utilizó para demostrar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra CDV, observando que al reaccionar el anticuerpo con el virus, este pierde la capacidad de infectar a las células, y en consecuencia de causar daño. Se empleó el método beta, en el que se requiere una cantidad conocida de virus, que se enfrentó a cantidades decrecientes de suero. Se observó si existía una reducción del efecto citopático producido por los anticuerpos presentes en el suero, como muerte celular y sincitios, además y se realizó la titulación del suero por medio del método de Read and Muench.

Detección molecular del CDV

Extracción de ARN por el método de Trizol

Se agregaron 0.5 ml de Trizol (Invitrogen EE.UU) a la muestra de sangre, posteriormente se homogenizó por el vórtex y se agregó 200 μ l de cloroformo puro de grado molecular y se mezcló en vórtex por un período de 1 min, se centrifugó a 12 000 rpm, se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml que contenía isopropanol absoluto frío de grado molecular y se mantuvo a -20 °C toda la noche, para precipitar eficientemente el **ARN**, se centrifugó a 12 000 rpm por un período de 15 min y se decantó el sobrenadante para así poder lavar el botón de **ARN** con 1 ml de etanol al 75% se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm, se decantó y dejó secando hasta que se evaporó el etanol, el tubo se colocó horizontalmente y abierto sobre una toalla de papel absorbente limpia, por un período de 15 min, posteriormente se hidrató el botón con 30 μ l de agua DEPC y se conservó a -70 °C, hasta su uso.

Amplificación del producto mediante la técnica de RT- PCR en un solo paso

Se utilizaron los iniciadores que amplifican el fragmento del gen de la proteína N de 640pb (Forward 5'TCT GAG GCA GAT GAG TTC TT3', Reverse 5'CCA TAG CATAAC TCC AGA GC3', similares a lo publicado en el artículo de Simón-Martínez y colaboradores en 2008.

Después de la obtención de ARN por el método de Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante para utilizarlo como cadena molde para el RT-PCR. Se utilizó el kit OneStep RT-PCR Kit (Quiagen, EE.UU) de la siguiente manera: preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR mediante el uso del termociclador (Mastercycler gradient, *Eppendorf*) se obtuvieron los productos de amplificación con dos programas unidos, uno para la retrotranscripción y otro para la reacción de amplificación como se muestra en la (Figura 6) y los volúmenes de reacción para la RT-PCR.

			Mezcla de Reacción	
			Componente	Volumen de reacción
50°	30 min	RT		
95°	15 min			
94°	2 min	35x	Buffer 5x	2.5 µl
94°	30 sec		DNTP's	0.5 µl
55°	30 sec		FWD	0.25 µl
72°	90 sec		RVS	0.25 µl
72°	2 min	1x	Taq	0.5 µl
4°	∞		H ₂ O	6 µl

Figura 6. Condiciones y mezcla de la reacción de la RT-PCR

Purificación de los productos de la PCR mediante E-Gel® Agarose Gel Electrophoresis System (Invitrogen)

La purificación se realizó en un casete que contiene un gel de agarosa al 2%, pre hidratado y pre teñido con un colorante fluorescente (Proprietary fluorescent stain), y un sistema de electroforesis (iBase™ Power System, Invitrogen), que se coloca en una cubeta conectada a una fuente de poder, posteriormente se observa en un transiluminador, permitiendo separar fragmentos de PCR y recuperarlos en un pocillo, utilizando un volumen de reacción de 25 µl.

Se cargó el volumen de muestra total en la fila superior de los pocillos del E-Gel® SizeSelect™, se cargaron 2µl de buffer de carga y 23 µl de producto de la PCR, los pocillos restantes se llenaron de agua con 30 µl y se seleccionó el programa 7, llamado size select 1-2%, con una duración de 15 minutos, en el que se observó la migración de las bandas a través del gel, utilizando unos lentes de protección (Safe Imager™ Viewing Glasses), se verificó que los pocillos inferiores estuvieran hidratados en cada momento para la eficiente recuperación de las bandas. Las bandas se recuperaron de la fila inferior de los pocillos, en un volumen aproximado de 20 µl de agua. Finalmente las bandas recuperadas se visualizaron con E-Gel® EX 2% (G4010-02, Proprietary fluorescent stain, Invitrogen).

Las secuencias purificadas fueron enviadas al Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM, posteriormente fueron identificadas por comparación con secuencias de los virus descritos en el GenBank (Benson *et al.*, 2005) y se realizó un análisis y un árbol filogenético para establecer el genotipo, utilizando el software **MEGA 6**.

Análisis de datos

Análisis de diversidad

- Riqueza específica

Corresponde al número de especies presentes en la comunidad.

- Índices de diversidad

Para la estimación de diversidad de mamíferos silvestres se calcularon los índices de diversidad Shannon-Wiener y Simpson (Krebs, 1999, Moreno, 2001). El índice de Shannon-Wiener (H) se obtuvo mediante la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde s = número de especies, p_i = proporción de la especie i con respecto a la comunidad. Este es un índice que asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra (Krebs, 1999). Adquiere valores de entre 0 cuando existe una sola especie y el logaritmo del número total de especies (s) cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Moreno, 2001).

Se calculó la diversidad máxima (H max) mediante el logaritmo del número de especies (s), el cual indica el valor de la diversidad en el caso de que todas las especies tuvieran el mismo número de individuos. El índice de Simpson se calculó con la ecuación:

$$1-D = \sum (p_i)^2$$

Donde p_i es la proporción de individuos de la especie i dentro de la comunidad. Los valores van de 0 (baja diversidad) hasta casi 1, e indica la probabilidad de muestrear al azar dos individuos que pertenecen a especies diferentes (Krebs,

1999, Moreno, 2001). Para medir la regularidad con la que los individuos se reparten entre las especies presentes en la comunidad, se calculó la *equidad*, dividiendo el valor del índice de Shannon-Wiener entre el logaritmo del número de especies presentes en la comunidad.

- Coeficiente de similitud de Jaccard

Se comparó la similitud en la composición de especies entre los diferentes tipos de vegetación utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, con la ecuación:

$$S_j = \frac{J}{(a + b - j)}$$

En donde J es el número de especies compartidas en los sitios A y B, a = número de especies en el sitio A, b = número de especies en el sitio B. El intervalo de valores va de 0 cuando no se comparte ninguna especie hasta 1, cuando los dos sitios tienen la misma composición de especies (Moreno, 2001). Se usó este coeficiente para construir dendogramas mediante el método UPGMA para graficar la similitud de especies entre los tres tipos de vegetación muestreados.

- Acumulación de especies

Para la elaboración de las curvas de acumulación de especies para cada tipo de vegetación (pastizal, matorral y bosque de pino-encino/zona riparia) se utilizaron los programas Statistics y Species Diversity and Richness 4.1.2 (Seabey y Henderson, 2006). Posteriormente se realizó la evaluación de la calidad del muestreo utilizando la ecuación de Clench para modelar el esfuerzo de muestreo.

La ecuación de Clench está recomendada para estudios en sitios de área extensa y para protocolos en los que, cuanto más tiempo se pasa en el campo (es decir, cuanta más experiencia se gana con el método de muestreo y con el grupo

taxonómico), mayor es la probabilidad de añadir nuevas especies al inventario (Soberón y Llorente, 1993). Su expresión matemática es:

$$S_n = a \cdot n / (1 + b \cdot n)$$

Se calculó la pendiente de la asíntota de la curva (el número de especies predicho) a/b , para la ecuación de Clench, el inventario puede considerarse confiable cuando la pendiente se hace aproximadamente $<0,1$. La expresión de la derivada de la ecuación de Clench es:

$$a / (1 + b \cdot n)^2$$

Para conocer el esfuerzo de muestreo necesario para registrar una determinada proporción de la fauna se utilizó la ecuación:

$$nq = q[b \cdot (1 - q)]$$

- Estimación de abundancias

La estimación de las abundancias relativas se realizó a partir de los datos obtenidos de dos métodos: 1) el método directo de captura por medio de trampas Tomahawk y ceos y 2) el método indirecto de cámaras-trampa.

A partir de los datos obtenidos de la captura por medio de las trampas Tomahawk y ceos, la abundancia relativa de cada especie fue estimada mediante la división del número de individuos capturados de cada especie sobre el total de individuos capturados (Linhart y Knowlton, 1975).

Con los datos de presencia/ausencia obtenidos de las cámaras-trampa se estimaron las abundancias relativas de cada una de las especies de mamíferos

carnívoros. Esto se llevó a cabo por medio del índice modificado de Linhart y Knowlton (1975): $IAP = N/CT_N$, dónde: IAP= Índice de abundancia; N= número de ejemplares de las especies fotografiadas en todas las estaciones de monitoreo; y CT_N = número de noches operables de todas las cámaras trampa de cada hábitat estudiado.

Análisis estadístico

Se aplicaron pruebas de χ^2 cuadrada para identificar si existieron diferencias estadísticas entre los tipos de vegetación, entre el tipo método empleado para la estimación de abundancias relativas (captura directa y cámaras trampa), así como para saber si existía alguna diferencia significativa entre la prevalencias de la primera y segunda salida de campo para ambas enfermedades.

Se realizó un análisis de Correlación de Pearson para saber si existía una relación entre la diversidad de especies, el tipo de vegetación y la prevalencia o presencia de la enfermedad, así como entre la abundancia relativa y la prevalencia o presencia de la enfermedad en la zona. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (SAS® Institute, EUA).

RESULTADOS

Riqueza, diversidad, equidad y abundancia relativa

Capturas

El esfuerzo de captura fue de 1096 noches/trampa, registrando un total de 66 individuos del orden carnívora pertenecientes a 8 especies y 5 familias; Canidae, Procyonidae, Mustelidae, Mephitidae y Felidae. Se obtuvieron capturas en todos los tipos de vegetación. La especie con el mayor número de capturas fueron *Canis latrans* con 18, seguida de *Vulpes macrotis* con 15 individuos, el menor número de capturas se obtuvo de la especie *Mephitis macroura* con 3, en el sitio de BPE se lograron capturar un total de 26 individuos que representan el 39.4% de todos los carnívoros silvestres capturados en la zona (Cuadro 2).

Riqueza: en este estudio se registró un total de 8 especies por captura directa y 11 por fototrampeo. La mayor riqueza de especies se obtuvo del BPE (6), mientras que la zona de vegetación MP fue el sitio con la menor riqueza de especies (3) (Cuadro 3).

Diversidad y equidad: de acuerdo con el índice de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson el sitio clasificado como BPE mostró la mayor diversidad ($H = 1.617$), seguida de MAT ($H = 1.523$). La prueba *t de student* pareada por tipo de vegetación no mostró una diferencia estadística significativa al comparar la diversidad de especies de carnívoros ($p > 0.05$). La mayor equidad se encontró en MAT ($E = 0.946$) y la menor en el P2 ($E = 0.825$) (Cuadro 2).

Abundancia relativa (Ar): las especies de carnívoros más abundantes fueron *Canis latrans* (27.27%) y *Vulpes macrotis* (22.72%); *C. latrans* fue la especie dominante en 4 de los 5 tipos de vegetación, mientras que la especie *V. macrotis* fue una especie exclusiva de los sitios P1, P2 y MP, así como *U. cinereoargenteus* fue exclusiva de BPE (Figura 7).

Similitud de especies: de acuerdo con el coeficiente de similitud de Jaccard, se observó que los sitios de P2 y MP compartieron el mayor número de especies ($J=0.75$) y entre el MAT y BPE fue de ($J= 0.57$). El rango de especies compartidas entre los diferentes tipos de vegetación va de 3 a 5 especies (Figura 8).

Cuadro 2 Lista de especies de carnívoros registrados por tipo de vegetación y captura directa

Especie	Pastizal 1	Pastizal 2	Matorral	Bosque Pino-Encino	Matorral-Pastizal	Total Capturas
Familia Canidae						
<i>Canis latrans</i>	3	5	2	7	1	<u>18</u>
<i>Vulpes macrotis</i>	4	5			6	<u>15</u>
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>				7		<u>7</u>
Familia Felidae						
<i>Lynx rufus</i>	1		3	1		<u>5</u>
Familia Procyonidae						
<i>Procyon lotor</i>			2	2		<u>4</u>
Familia Mustelidae						
<i>Taxidea taxus</i>	3	1	1		1	<u>6</u>
Familia Mephitidae						
<i>Mephitis mephitis</i>		1	1	6		<u>8</u>
<i>Mephitis macroura</i>				3		<u>3</u>
Total de Capturas	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>9</u>	<u>26</u>	<u>8</u>	<u>66</u>
Total de especies	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>3</u>	

Cuadro 3. Riqueza, diversidad y equidad de carnívoros por tipo de vegetación y captura directa

Sitios	Capturas	Riqueza			Simpson (1-D)	Equidad
		(s)	Shannon (H)	H max		
Pastizal 1	11	4	1,295	1.401	0,7107	0.924
Pastizal 2	12	4	1,144	2.386	0.6389	0.825
Matorral	9	5	1,523	1.609	0,7654	0.946
Bosque Pino-Encino	26	6	1,617	1.742	0,7811	0.902
Matorral/Pastizal	8	3	0,7356	1.099	0,4063	0.662

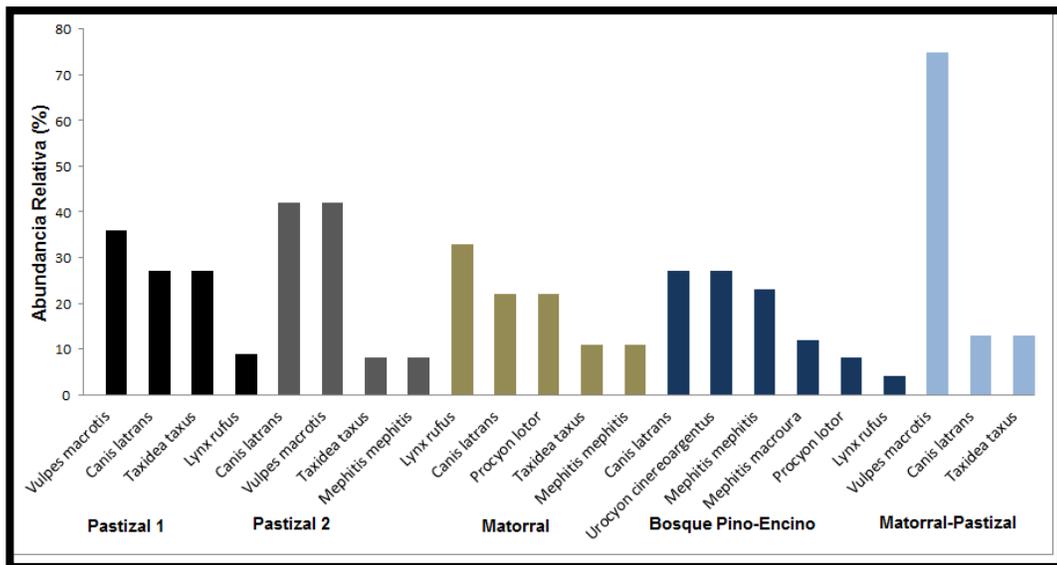


Figura 7. Abundancia relativa de carnívoros por tipo de vegetación y captura directa

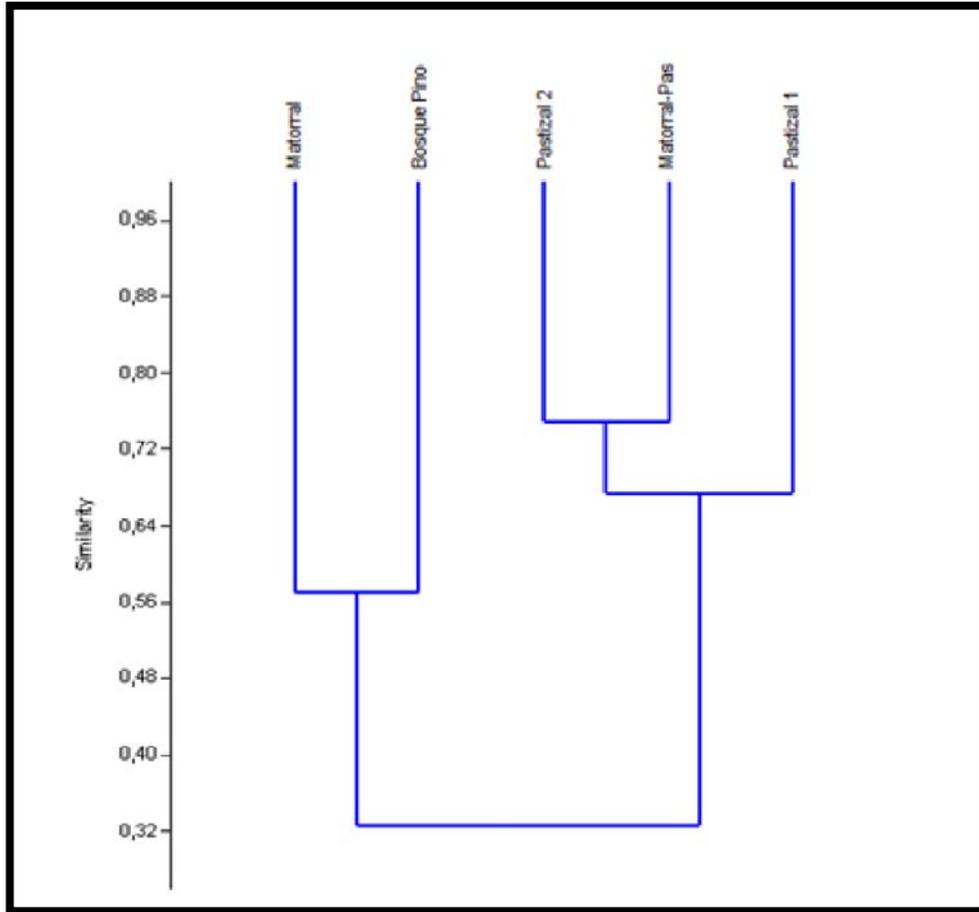


Figura 8. Dendrograma de similitud de especies por tipo de vegetación y captura directa.

Cámaras trampa

El esfuerzo de captura fue de 1044 noches/trampa, registrando un total de 148 eventos, se registraron individuos pertenecientes a 11 especies agrupados en 6 familias Canidae, Procyonidae, Mustelidae, Mephitidae, Felidae y Ursidae. Estos eventos fueron registrados sólo en tres de los sitios de trabajo; P1, MAT y BPE. La especie con el mayor número de eventos registrados fue *Canis latrans* con 74, seguida de *Procyon lotor* con 27; cabe mencionar que se registraron eventos únicos en el sitio BPE; la presencia de *Ursus arctos*, *Puma concolor* y un perro doméstico (Cuadro 4).

Riqueza: de acuerdo a la clasificación de los sitios de muestreo por tipo de vegetación, la mayor riqueza de especies se obtuvo de los sitios BPE con 7 especies registradas, seguida del MAT con 6, mientras que en la zona de vegetación P1 sólo se registraron 5 especies (Cuadro 5).

Diversidad y equidad: de acuerdo con el índice de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson el sitio clasificado como BPE mostró la mayor diversidad ($H = 1.287$), seguida de MAT ($H = 1.301$). La prueba *t de student* pareada por tipo de vegetación no mostró una diferencia estadística significativa al comparar la diversidad de especies de carnívoros ($p > 0.05$). La mayor equidad se encontró en MAT ($E = 0.946$) y la menor en el P2 ($E = 0.825$) (Cuadro 5).

Abundancia relativa (Ar): las especies de carnívoros más abundantes fueron *Canis latrans* (50%), seguida de *Procyon lotor* (18.24%); *C. latrans* fue la especie dominante en los 3 tipos de vegetación, mientras que las especies *Puma concolor* y *Ursus Americanus* fueron exclusivas del sitio BPE, registrando un solo evento cada una (Figura 9).

Similitud de especies: de acuerdo con el coeficiente de similitud de Jaccard, se observó que los sitios de P1 y MP compartieron el mayor número de especies

($J=0.57$), el sitio de BPE mostró un índice de $J= 0.25$ con los sitios anteriores. El rango de especies compartidas entre los diferentes tipos de vegetación fue de 2 y 3 especies (Figura 10).

Cuadro 4. Lista de especies de carnívoros registrados por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.

Especie	Pastizal 1	Matorral	Bosque Pino-Encino	Total
Familia Canidae				
<i>Canis familiaris</i>			1	1
<i>Canis latrans</i>	21	26	27	<u>74</u>
<i>Vulpes macrotis</i>	5			<u>5</u>
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>			16	<u>16</u>
Familia Felidae				
<i>Puma Concolor</i>			1	<u>1</u>
<i>Lynx rufus</i>	2	7	3	<u>12</u>
Familia Procyonidae				
<i>Procyon lotor</i>		23	4	<u>27</u>
Familia Mustelidae				
<i>Taxidea taxus</i>	2	1		<u>3</u>
Familia Mephitidae				
<i>Mephitis mephitis</i>		1		<u>1</u>
<i>Mephitis macroura</i>	2	5		<u>7</u>
Familia Ursidae				
<i>Ursus americanus</i>			1	<u>1</u>
Total de Eventos	32	63	53	<u>148</u>
Total de Especies	5	6	7	

Cuadro 5. Riqueza, diversidad, equidad de carnívoros por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.

Sitios	Capturas	Riqueza			Equidad
		(s)	Shannon (H)	H max	
Pastizal 1	32	5	1.086	1.609	0.533
Matorral	63	6	1.31	1.791	0.677
Bosque Pino-Encino	253	7	1.287	1.945	0.639

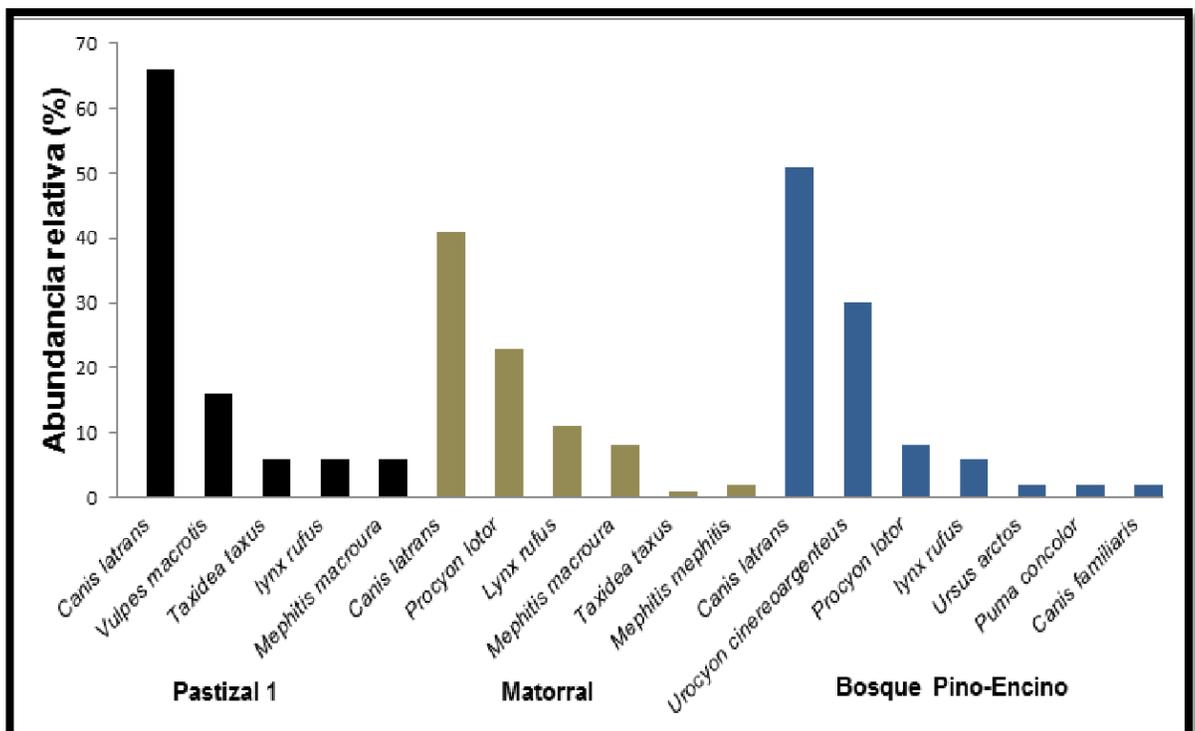


Figura 9. Abundancia relativa de carnívoros por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.

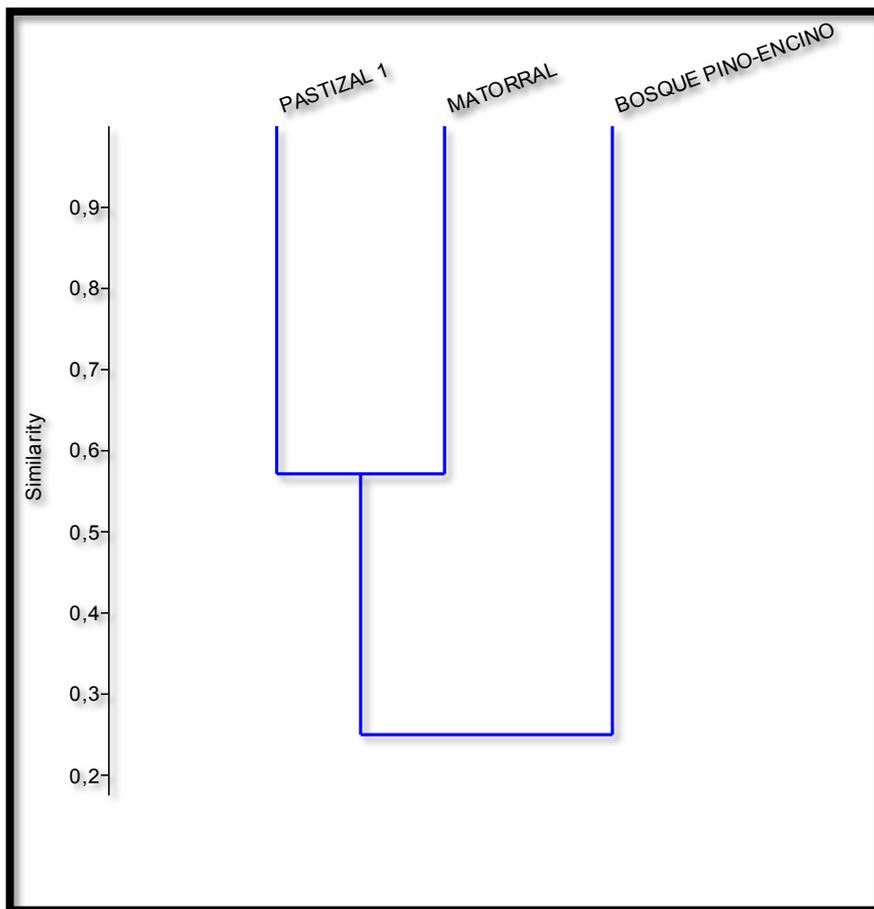


Figura 10. Dendrograma de similitud de especies por tipo de vegetación utilizando cámaras trampa.

Análisis de laboratorio

Parvovirus canino (CPV)

Serología

Se analizaron un total de 84 muestras; de las cuales 66 pertenecían a carnívoros silvestres y 18 a carnívoros domésticos. Se obtuvo una prevalencia de anticuerpos del 60.71% (51/84). La prevalencia de anticuerpos encontrada por familia fue mayor en los cánidos 46.4% (39/84). La especie en las que se registró la prevalencia de anticuerpos más alta fueron *Canis lupus familiaris* con 100% (18/18) y *Canis latrans* con 83.3% (15/18). Es importante resaltar que todas las especies capturadas fueron positivas a la presencia de anticuerpos contra el CPV (Figura 11).

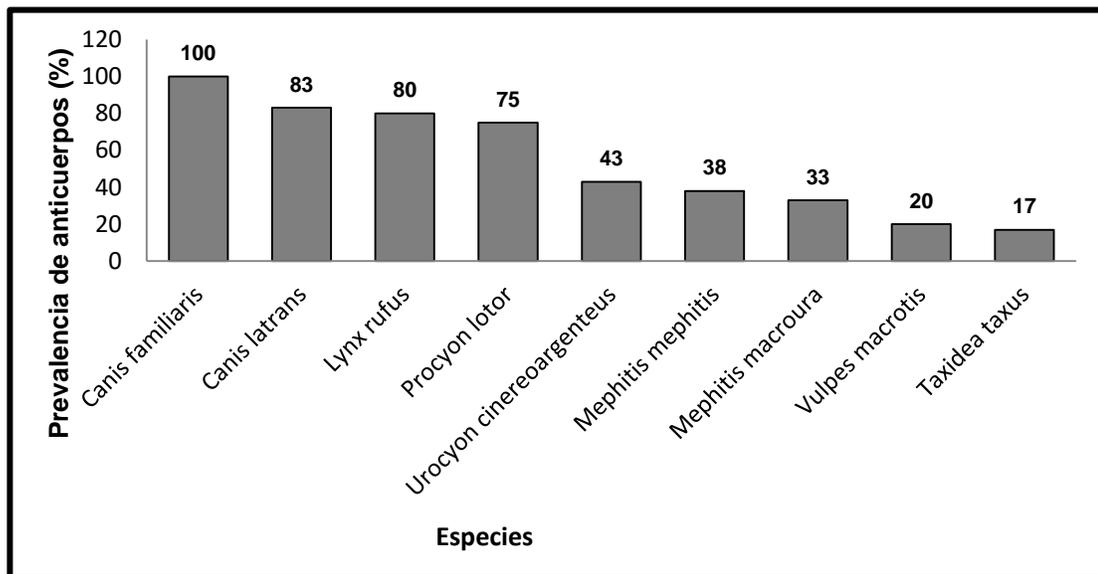


Figura 11. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por especie

El área de vegetación MAT registró la mayor prevalencia de anticuerpos 91.6% (11/12) seguida de la zona de MP con 63.6% (5/11) (Cuadro 5).

Cuadro 6. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por tipo de vegetación

Sitio	No. Individuos	No. Positivos	P (%)
P1	12	7	58.3
P2	20	13	65
MAT	12	11	91.6
BPE	29	15	51.72
MP	11	5	63.6

P= Prevalencia de anticuerpos

El tipo de vegetación que registró el mayor número de especies seropositivas fue BPE (n=15), mientras que los demás sitios de vegetación presentaron prevalencias superiores al 50% (Figura 12).

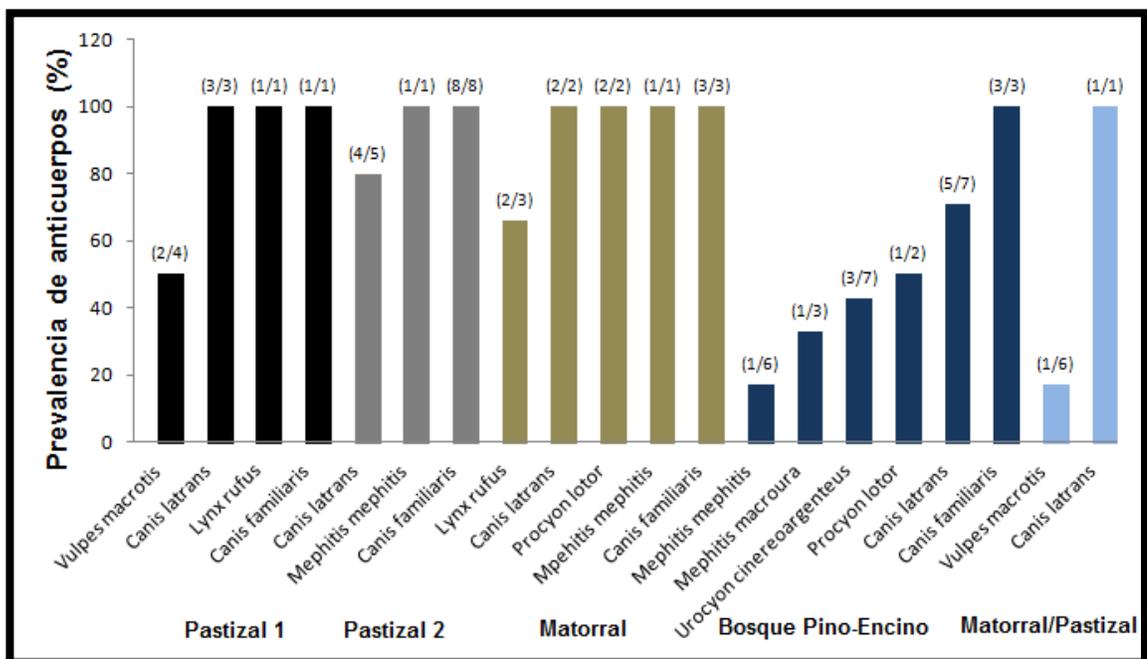


Figura 12. Prevalencia de anticuerpos contra el CPV por especie por tipo de vegetación

Análisis molecular

Se analizaron 84 muestras pertenecientes a 8 especies; de los 51 individuos seropositivos a serología, 21 fueron positivos al análisis molecular (Cuadro 6).

Cuadro 7. Resultados positivos a CPV por serología y en los análisis moleculares.

<u>Especie</u>	<u>NI</u>	<u>IS</u>	<u>PM</u>
<i>Canis latrans</i>	18	15	4
<i>Vulpes macrotis</i>	15	3	7
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	7	3	0
<i>Taxidea taxus</i>	6	1	0
<i>Procyon lotor</i>	4	3	1
<i>Lynx rufus</i>	5	4	1
<i>Mephitis mephitis</i>	8	3	3
<i>Mephitis macroura</i>	3	1	0
<i>Canis familiaris</i>	18	18	5

NI: Número de individuos analizados; IS: Individuos seropositivos; PM: Positivos análisis molecular

Las 21 muestras positivas en la técnica de PCR fueron comparadas con secuencias nucleotídicas de virus disponibles en el GenBank. Para establecer las relaciones filogenéticas se editaron las secuencias del gen VP2 del CPV a un tamaño de 123pb y se construyó el árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor, el árbol fue construido con 1000 repeticiones (bootstraps) como soporte estadístico se eliminaron todas las porciones que contenían saltos, el análisis evolutivo se hizo

utilizando el programa MEGA6. Las secuencias reportadas en este trabajo poseen una identidad del 98 y 99% de y se agrupan como una sola variante (Figura 13).

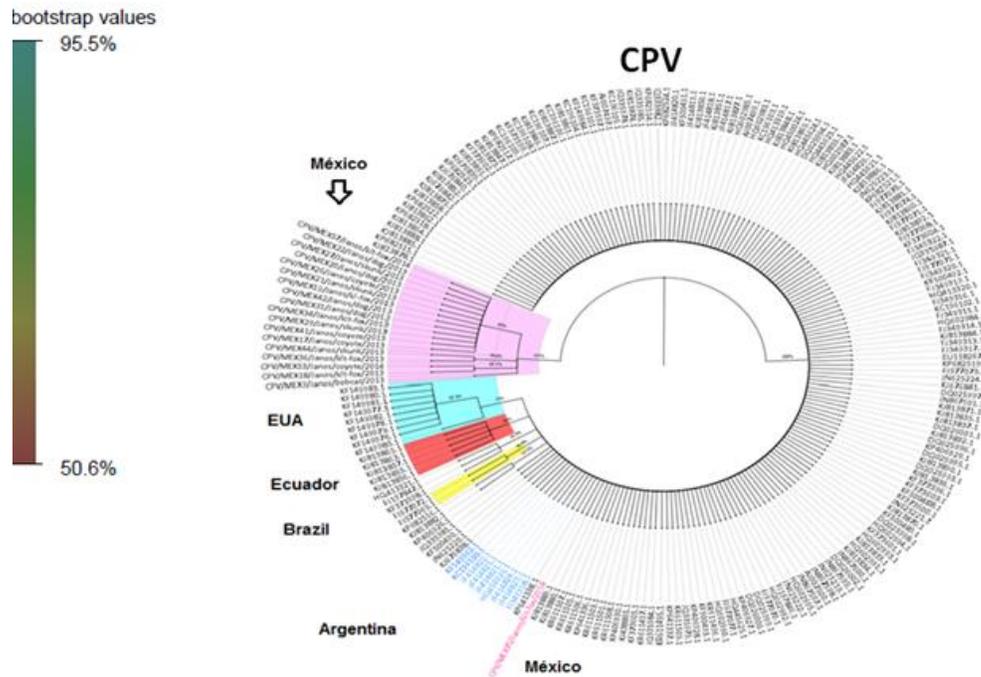


Figura 13. Árbol filogenético del gen VP2 parcial del CPV.

Al realizar el análisis para identificar si existía alguna relación entre la diversidad de especies (1-D) en cada sitio de estudio y la prevalencia de CPV, muestra que uno de los sitios con mayor diversidad MAT (0,7654) también muestra una mayor seroprevalencia 91.6% (Figura 14).

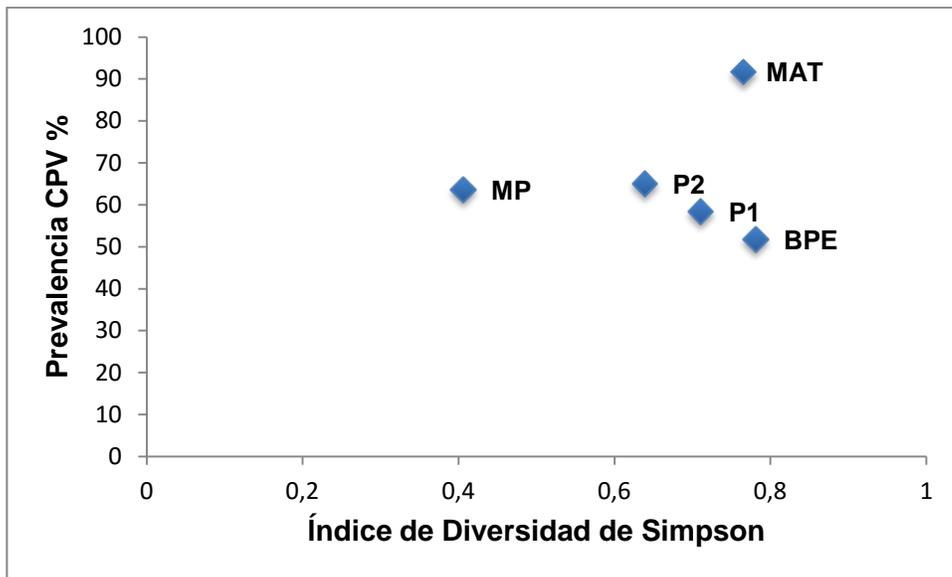


Figura 14. Relación de la diversidad de especies y prevalencia del CPV

Distemper Canino (CDV)

Análisis serológico

Se analizaron un total de 84 muestras; de las cuales 66 pertenecían a carnívoros silvestres y 18 a carnívoros domésticos. Se obtuvo una prevalencia de anticuerpos del 47.6 % (40/84). La prevalencia de anticuerpos encontrada por familia fue mayor en los cánidos 46.4% (39/84). La especies en las que se registró la prevalencia de anticuerpos más alta fueron *Lynx rufus* con 80% (4/5), *Procyon lotor* con 75% (3/4) y *Canis latrans* con 72% (13/18). Es importante resaltar que todas las especies capturadas fueron positivas a la presencia de anticuerpos contra CDV (Figura 15).

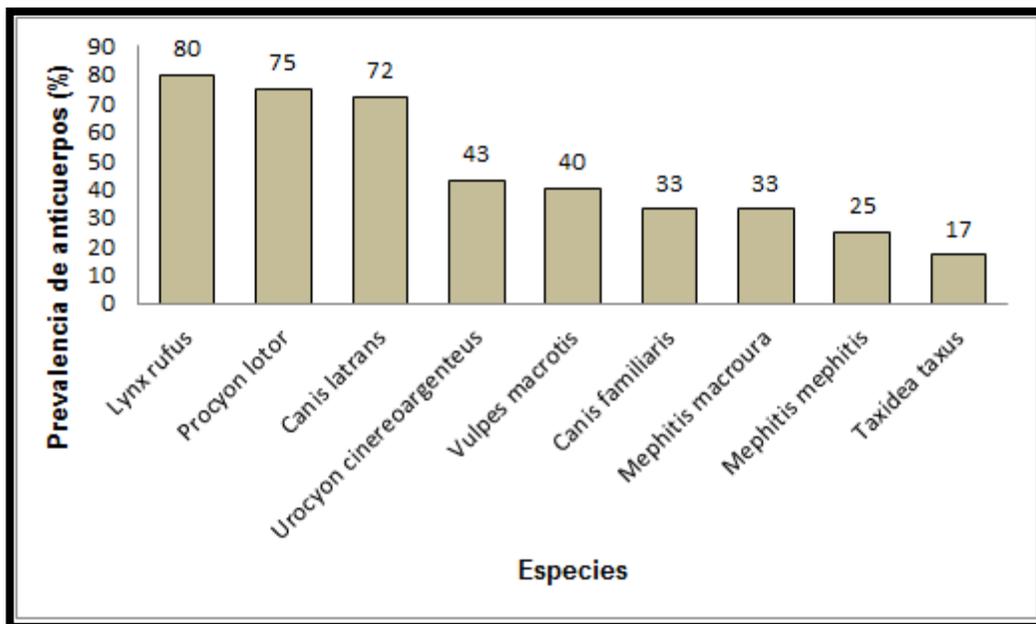


Figura 15. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por especie

El área de vegetación MAT registró la mayor prevalencia de anticuerpos 66.6% (8/12), el sitio MP presentó una seroprevalencia del 36.36% (4/11) (Cuadro 7)

Cuadro 8. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por tipo de vegetación

Sitio	No. Individuos	No. Positivos	P (%)
P1	12	7	58.3
P2	20	9	45
MAT	12	8	66.6
BPE	29	12	41.3
MP	11	4	36.3

P= Prevalencia de anticuerpos

El tipo de vegetación que registró el mayor número de especies seropositivas fue BPE, mientras que los demás sitios de vegetación presentaron prevalencias superiores al 30% (Figura 16).

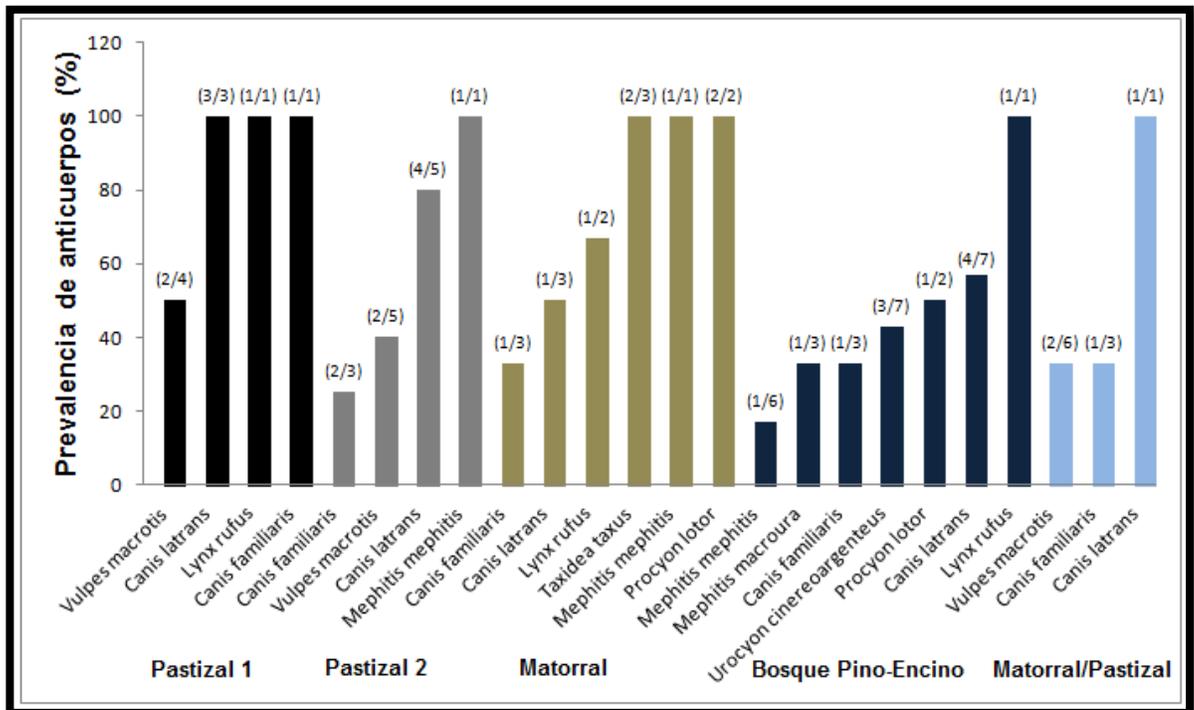


Figura 16. Prevalencia de anticuerpos contra el CDV por especie por tipo de vegetación

Análisis molecular

Se analizaron 84 muestras pertenecientes a 8 especies; de los 40 individuos seropositivos, sólo 6 fueron positivos al análisis molecular (Cuadro 6).

Cuadro 9. Resultados positivos a CDV por serología y en los análisis moleculares.

Especie	NI	IS	PM
<i>Canis latrans</i>	18	15	4
<i>Vulpes macrotis</i>	15	3	7
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	7	3	0
<i>Taxidea taxus</i>	6	1	0
<i>Procyon lotor</i>	4	3	1
<i>Lynx rufus</i>	5	4	1
<i>Mephitis mephitis</i>	8	3	3
<i>Mephitis macroura</i>	3	1	0
<i>Canis familiaris</i>	18	18	5

NI: Número de individuos analizados; IS: Individuos seropositivos; PM: Positivos análisis molecular

Las 6 muestras positivas en la técnica de RT-PCR fueron comparadas con secuencias nucleotídicas de virus disponibles en el GenBank, para establecer las relaciones filogenéticas se editaron las secuencias del gen H del CDV a un tamaño de 613pb y se construyó el árbol filogenético, utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor, el árbol fue construido con 1000 repeticiones (bootstraps) como soporte estadístico se eliminaron todas las porciones que contenían saltos, el análisis evolutivo se hizo utilizando el programa MEGA6. Las secuencias reportadas en este trabajo poseen una identidad del 98% y 99% y se agrupan en una sola variante. **Figura 17**

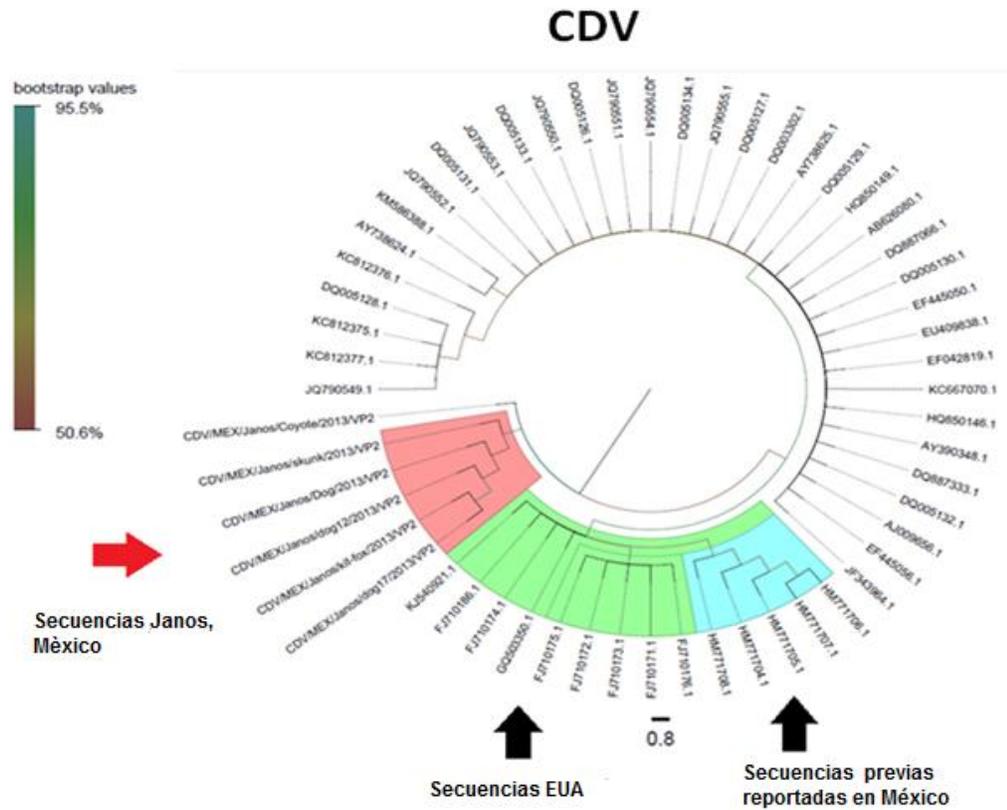


Figura 17. Árbol filogenético del gen H parcial del CDV.

CDV/MEX/Janos/coyote/2013; CDV/MEX/Janos/zorrillo/2013;
 CDV/MEX/Janos/perro1/2013; CDV/MEX/Janos/perro12/2013;
 CDV/MEX/Janos/zorra desierto/2013; CDV/MEX/Janos/perro17/2013

Al realizar el análisis para identificar si existía alguna relación entre la diversidad de especies (1-D) en cada sitio de estudio y la prevalencia de CDV se muestra que uno de los sitios con mayor diversidad MAT (0,7654) también muestra una mayor seroprevalencia 66.6%.

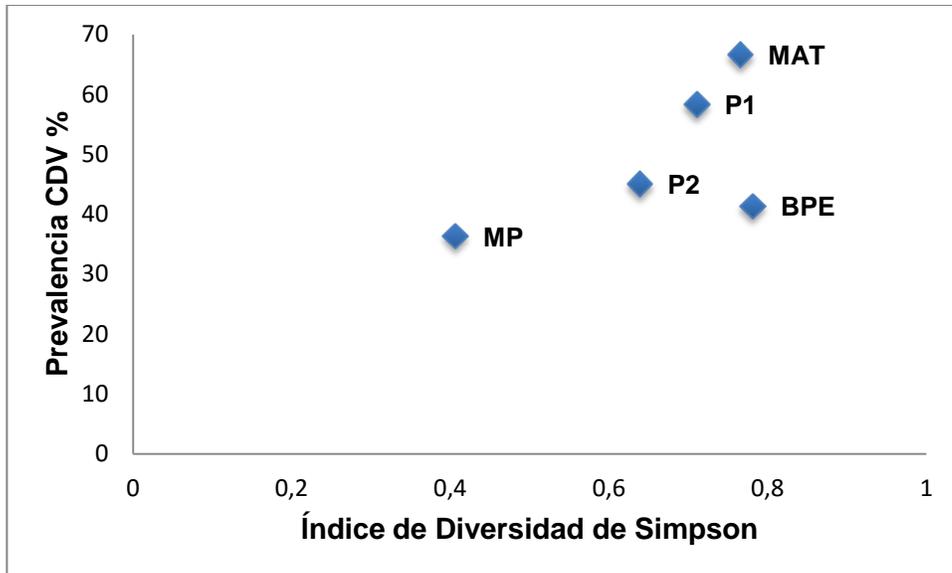


Figura 18. Relación de la diversidad de especies y prevalencia del CDV

DISCUSIÓN

La región de la Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua presenta una alta diversidad de carnívoros medianos en cuanto a riqueza y composición de especies (List y Macdonald, 1998; Pacheco et al, 2000. En este trabajo se lograron obtener valores ecológicos como riqueza, diversidad y abundancia relativa de especies, mediante capturas directas y uso de cámaras trampa; reportando la presencia de 10 especies y 5 familias de carnívoros silvestres, lo que concuerda con lo reportado por Pacheco y colaboradores (2000).

La mayor riqueza y abundancia de especies utilizando ambos métodos, se registró en la zona de bosque de pino-encino y zonas riparias, lo que concuerda con lo realizado por List y Macdonald (1998), en donde las especies más abundantes encontradas fueron el coyote y la zorra del desierto; en este trabajo se determinó que las especies más abundantes en los diferentes tipos de vegetación también fueron *Canis latrans* y *Vulpes macrotis*. El coyote fue la especie dominante en la mayoría de los sitios, esto puede ser debido a que se han adaptado con éxito a los distintos cambios en su hábitat ocasionada por la disminución o desaparición de los grandes depredadores, cambiando su rango de distribución en la mayor parte de Norteamérica (Parker, 1995). La zorra del desierto fue exclusiva de la vegetación de pastizal y pastizal/matorral, la razón podría ser que evitan las zonas en donde los coyotes pueden representar una amenaza para su supervivencia, pues se sabe que limitan su distribución e incluso causan grandes mortalidades como en las zorras *Vulpes velox* en Norteamérica (List, 2003).

La presencia de especies como *Urocyon cinereoargenteus* de manera exclusiva en las zonas riparias, demuestra que tal vez las zonas de pastizal no son sus áreas primarias de distribución (List et al., 1997), *Mephitis mephitis* y *M. macroura* presentan una distribución normal reportada por List (1997) y Pacheco y colaboradores (2000), reportándolas como especies comunes en la región.

La presencia de *Puma concolor* y *Ursus americanus* fueron registradas mediante un solo evento con la utilización de cámaras trampa en el sitio de BPE, estas especies se encuentran bajo las categorías; en peligro de extinción para el oso negro y en protección especial para el puma según la NOM- 059-SEMARNAT-2010 para especies nativas de México de flora y fauna. Aunque existen reportes anteriores de avistamientos de oso negro en la zona (List, 1997; PROFEPA, 2013), es importante que siga existiendo evidencia que permita conocer la presencia de estas especies en la región, ya que sus áreas de distribución o el tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional ha disminuido drásticamente, debido a factores como la destrucción o modificación de sus hábitats, el aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación.

Las abundancia de especies como *Taxidea taxus* y *Lynx rufus* y *Mephitis mephitis* fue más baja comparada con especies como *Canis latrans* o *Vulpes macrotis*, registrando capturas de sólo 3 o 4 individuos al igual que muy pocos registros obtenidos de las cámaras trampa.

En cuanto a la similitud de especies por tipo de vegetación los sitios clasificados como pastizal 2 y matorral compartieron el 75% de especies, en donde se encontraron 3 de las 4 especies reportadas en este tipo de vegetación, similar a lo reportado por List (1997), sin diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tipos de vegetación.

La alta diversidad de mamíferos de la reserva, resultado de su ubicación geográfica, la continuidad de su vegetación y la cercanía con otras áreas de gran importancia biológica como la sierra madre occidental, han permitido la presencia de una gran variedad de especies como, el oso negro, puma o el perro llanero, está última considerada una especie clave en el ecosistema de pastizal, cuya existencia permite la presencia de otros mamíferos que dependen de ellos como

alimento o refugio (Ceballos et al., 1993 y 1999; List, 1997; List y Macdonlad, 1998; List 2000). Especies como la zorra del desierto dependen directamente de las colonias de perritos para proveerles refugio, además de ser su principal alimento (Ceballos et al., 1993; List, 1997). Las modificaciones en el entorno de las colonias de perritos o la invasión de vegetación arbustiva afecta de manera directa a las zorras del desierto, pues las hace más vulnerables a los ataques de coyotes (List, 1997). Especies menos abundantes como el tlalcoyote (*Taxidea taxus*) también debe su presencia a los perritos de la pradera, pues también son su principal alimento. Por todas estas razones se considera de vital importancia a las colonias de perritos dentro de la reserva, pues son un factor importante que mantiene un gran número de especies de vertebrados entre los que se encuentran los carnívoros silvestres de la región (Ceballos y Pacheco, 2000; List y Macdonald, 1998).

La región de Janos representa unos de los sitios de mayor importancia para la conservación de la diversidad biológica de los mamíferos de México y aunque existen factores que amenazan su función e integridad biológica como la creciente expansión agrícola, el sobrepastoreo y el crecimiento de los asentamientos poblacionales; esta área es uno de los sitios más importantes para la conservación en Norteamérica (List y Mcdonald, 1998; Pacheco *et al.*, 1999; Ceballos *et al.*, 2004).

En este trabajo se determinó que el CPV está presente en todos los tipos de vegetación, en donde la prevalencia de anticuerpos contra CPV registrada en la zona fue de 60.71% (51/84). Los cánidos mostraron altas seroprevalencias (perros 100%, coyotes 83.3% y zorra gris 43% comparadas con lo reportado por Araiza en 2007 (perros 35%, coyotes 34% y zorras (39%) en Sonora, Coahuila y Chihuahua. En coyotes se han hecho reportes de seroprevalencias de más de 90% para Texas, Utah, Idaho (Thomas *et al.*, 1984), 65% en Georgia (Holzman *et*

al., 1992), 71% en el sureste de Colorado (Gese *et al.*, 1991) y 66% en California (Cyhper *et al.*, 1998), similar a lo encontrado en este estudio. Al igual que en los estudios mencionados anteriormente, el parvovirus no estuvo asociado a enfermedad, pues aunque las prevalencias son altas es indicativo de una enfermedad altamente contagiosa pero no fatal (Thomas *et al.*, 1984; Gese *et al.*, 1991). La escasa o nula mortalidad en coyotes a causa de este virus puede deberse a una alta prevalencia de adultos con inmunidad protectora y la resultante transferencia de anticuerpos de la madre (Thomas *et al.*, 1984). Debido a que los coyotes son una especie muy adaptable a los cambios en su entorno y a que su distribución es muy amplia, se ha recomendado evaluar su estado de salud, ya que puede funcionar como reservorio de enfermedades infecciosas en zonas donde existen perros domésticos u otros carnívoros silvestres (Gese *et al.* 1991).

Las altas prevalencias encontradas en los cánidos domésticos de la zona (100%) no difiere en comparación con otros estudios realizados en áreas naturales como la zona del Pedregal en la Ciudad de México, en donde se han reportado seroprevalencias del 95% (Suzán y Ceballos, 2005), pues es conocido que los perros domésticos también se consideran reservorios de parvovirus canino para las especies silvestres (Gese *et al.*, 1991; Aguirre *et al.*, 1994). Basados en que los coyotes y los perros domésticos de la zona son las especies más abundantes, se encuentran en todos los tipos de vegetación y poseen las prevalencias más altas, considerando una seroprevalencia alta mayor a 50% (Thomas *et al.*, 1984), podrían ser indicadores de que la infección tiene un alto índice de contagio.

Las prevalencias encontradas en esta zona para la zorra nortea son bajas (20%) comparadas con lo reportado por Gese (2004) para la zorra veloz (*Vulpes velox*) en Colorado (71%). Aunque la prevalencia es baja en las zorras del desierto, los coyotes podrían ser una fuente potencial de exposición al virus.

La prevalencia de anticuerpos contra el CDV en la zona fue de 47.6% (40/84); se encuentra en todos los tipos de vegetación y en todas las especies registradas en este estudio; lince, mapaches y coyotes presentaron las seroprevalencias más altas con 80%, 75% y 72% respectivamente. En California se han reportado prevalencias de 37% en coyotes (Cypher *et al.*, 1998), mientras que en Texas la prevalencia en coyotes es de 56% (Guo *et al.*, 1986), considerando a estos cánidos como reservorios y fuente de infección para otros carnívoros silvestres. La alta seroprevalencia encontrada en los coyotes que además es la especie más abundante en la zona podría sugerir que la enfermedad circula dentro de las poblaciones de cánidos de la reserva, pues en estudios realizados en Texas de 1975-1984 mostraron seroprevalencias de 30% a 86% considerando a esta enfermedad enzoótica en la zona (Guo *et al.*, 1986). En América Nava *et al.*, (2008) reportaron casos de seroprevalencia en jaguares silvestres en áreas naturales y reservas en Brasil, realizaron un muestreo del CDV en jaguares, pumas y perros en dos parques estatales en el Bosque Atlántico. Encontraron jaguares (60% n=10) y pumas (14%, n=7) positivos a distemper dentro del Parque Estatal Ivinhema, donde se encontró un 100% de perros positivos.

En México únicamente se ha realizado un estudio de prevalencia de enfermedades infecciosas utilizando kits comerciales, en jaguares capturados en la región de Calakmul, en los estados de Campeche y Quintana Roo (Ceballos *et al.*, 2002; Chávez, 2010). Además existen pocos estudios de prevalencia de CDV en México en otras especies de carnívoros susceptibles a moquillo, es de importancia mencionar que se han realizado estudios de prevalencia de distemper en el mapache pigmeo (*Procyon pygmeus*) endémico de la isla de Cozumel en Quintana Roo y perros callejeros en la misma isla (McFadden *et al.*, 2005; Mena, 2007). En ese estudio, McFadden y colaboradores (2005) realizaron la prueba de seroneutralización en 28 muestras de mapaches, resultando un individuo positivo con bajos títulos de anticuerpos.

Mena (2007) utilizó la prueba de inmunofluorescencia (IFA) con diecisiete muestras de improntas conjuntivales y la prueba de RT-PCR a partir de glóbulos blancos, encontrando un mapache (1.08%) positivo por IFA de 92 muestreados y tres mapaches (12%) y 4 perros (16%) positivos de 25 analizados por RT-PCR. Es importante mencionar que identificaron la más alta prevalencia de animales positivos (60%) en zonas de influencia humana y un menor porcentaje (27%) en la zona más conservada de manglar y únicamente se encontraron mapaches positivos en zonas donde hubo perros positivos. Resaltando que los mapaches de esta zona presentaron una seroprevalencia del 75% en menor número de individuos (4), mayor a lo reportado por McFadden *et al.*, (2005) y Mena en 2007 para zonas tropicales, ya que el mapache se ha identificado como reservorio silvestre del virus. En Estados Unidos se han documentado brotes de distemper en poblaciones silvestres, sin embargo no se había reportado la prevalencia del virus en esta especie en México (Hoff y Bigler, 1974; Lednicky *et al.*, 2004; Kapil *et al.*, 2008).

Los perros domésticos no presentaron una prevalencia alta (33%), pero existe mucha información que sugiere que el moquillo canino es transmitido por los perros domésticos hacia los carnívoros silvestres, ya que se han encontrado prevalencias más altas en áreas urbanas y suburbanas que en las áreas rurales (Frölich *et al.*, 2000)

El estudio de la prevalencia y epidemiología de patógenos infecciosos como los CDV y CPV resulta complicado en poblaciones de carnívoros que son difíciles de visualizar y capturar en hábitats con vegetación muy densa (Sepúlveda, 2013). La diseminación e incidencia de epizootias de distemper tanto en carnívoros domésticos como silvestres podría verse incrementada con el constante crecimiento de las poblaciones de perros asociadas a las poblaciones humanas y la expansión de la urbanización (Kapil y Yeary, 2011).

En casos donde ambas enfermedades han sido estudiadas en los carnívoros silvestres en determinadas regiones geográficas, se ha hecho evidente su importancia en la conservación de estos mamíferos, ejemplo de ello es el Parque Nacional de Yellowstone en EUA, donde el CPV fue implicado en la alta mortalidad en cachorros de lobo (*Canis lupus*) (Johnson *et al.*, 1994) y es considerado un factor limitante del crecimiento de las poblaciones de lobo en la zona (Mech y Goyal, 1995). También se sugirió que los CPV y CDV tiene la capacidad encontrarse de manera enzoótica en las poblaciones de coyote y que pueden causar altas mortalidades bajo condiciones de estrés, altas densidades, escasez de alimento o parasitismo (Thomas *et al.*, 1984; Guo *et al.*, 1986; Trainer y Knowlton, 1968).

Es importante reconocer que los coyotes constituyen una fuente potencial de exposición a los CPV y CDV para especies en peligro como *Vulpes macrotis* y *Taxidea taxus*. La oportunidad de un contacto interespecífico y posible transmisión de enfermedades virales es alta, debido a que los coyotes están presentes en todas las áreas ocupadas por la zorra del desierto y del tlalcoyote (Cyhper y Spencer, 1998).

Por otra parte la extinción local del hurón de patas negras posiblemente a causa de un brote del CDV y el brote de peste bubónica que afectó al perrito llanero de cola negra en la región (Miller *et al.*, 1996) así como su posterior reintroducción, hace a este sitio de estudio ideal para conocer el posible riesgo de enfermedades transmitidas por animales domésticos en las poblaciones de carnívoros silvestres de la zona.

Existen varios estudios que demuestran que el moquillo y el parvovirus caninos puede ser transmitidos por los cánidos domésticos a los animales silvestres, pues se han encontrado altas prevalencias a estas enfermedades en zonas urbanas y suburbanas (Frölich, 2000; Acosta-Jamett, 2009). Aunque la mayoría de los

estudios en carnívoros susceptibles a estos virus es mediante la presencia de anticuerpos contra ambos patógenos, muy pocas veces se llega al diagnóstico molecular, por ello en este estudio se llevaron a cabo para identificar los genotipos circulantes en la región de Janos en México. Aunque el CDV está serológicamente clasificado como un único serotipo, los análisis filogenéticos del gen H del virus han permitido la identificación de 12 genotipos diferentes con una marcada distribución geográfica en América (Americano 1 y 2, Sudamérica, Argentina y Edo de Mex), Asia (Asia 1, 2 y 3), Europa (Rockborn, fauna europea y Ártico) y Sudáfrica (Carpenter *et al.*, 1998; Calderón *et al.*, 2007; Kapil *et al.*, 2008; Simón-Martínez *et al.*, 2008; Woma *et al.*, 2010; Gámiz *et al.*, 2011; Kapil y Yeary, 2011). En México se han encontrado ocho genovariantes (EdoMex-1 a EdoMex-7 y CIESAjSMC) que no habían sido previamente reportadas y se encuentran circulando en el Estado de México (Gámiz *et al.*, 2011). Los 6 individuos positivos a la prueba de RT-PCR (1 coyote, 1 zorra del desierto, un zorrillo y 3 perros domésticos) se asociaron en un mismo grupo que está estrechamente relacionado a las 8 genovariantes reportadas para el Estado de México por Gámiz y colaboradores (2011), provenientes de cánidos domésticos por lo que es de vital importancia el cuidado y monitoreo de los perros domésticos cercanos a la reserva.

En diversos países se han encontrado altas densidades de perros al borde de las reservas naturales que han coincidido con la transmisión de enfermedades como el distemper y rabia hacia carnívoros silvestres amenazados. El caso mejor estudiado es el de las poblaciones de perros rurales en el Serengeti en África en donde se considera la especie que provocó los brotes de rabia y distemper en especies de carnívoros silvestres como el león africano (*Panthera leo*), lobo de Etiopia (*Canis simensis*) y perro salvaje africano (*Lycaon pictus*) (Gascoyne *et al.*, 1993; Roelke-Parker *et al.*, 1996; Laurenson *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La Reserva de la Biósfera Janos, Chihuahua alberga una gran diversidad y riqueza de especies, para ser un ecosistema árido y expuesto a factores como agricultura, ganadería y crecimiento urbano.

Se encontraron altas prevalencias contra los CPV y CDV tanto en carnívoros domésticos como en silvestres, así como la presencia de ambos virus en 21 y 5 individuos respectivamente, indicando la exposición a ambos agentes virales.

Como los CPV y CDV afectan a muchas especies de carnívoros, además de los domésticos, la Reserva de la biósfera Jano, Chihuahua con su gran riqueza y abundancia de especies, posee una población de hospederos suficientes para su mantenimiento. En esta región tanto los carnívoros silvestres como los perros domésticos pueden ser una fuente de contagio de moquillo y parvovirus canino, para las especies bajo alguna categoría de riesgo en esta zona como *Vulpes macrotis*, *Taxidea taxus* y *Lynx rufus*.

Se necesitan más estudios sobre la prevalencia de los CPV y CDV en los carnívoros domésticos y silvestres en esta región para saber si los coyotes, mapaches o los perros, especies reconocidas como reservorios de estos patógenos pudieran estar actuando como reservorios y transmisores de ambas enfermedades.

Es importante realizar investigaciones a una mayor escala espacial y temporal en los mismos sitios para evaluar el estado en que se encuentran estas enfermedades, si van en aumento, disminuyen o se mantienen, además de la estimación de valores ecológicos que determinen si los datos obtenidos en este estudio responden a transmisiones frecuentes dependientes o densodependientes y determinar si realmente en este sitio está ocurriendo un efecto de amplificación.

LITERATURA CITADA

ACOSTA-JAMETT, G.(2009). The Role of Domestic Dogs in Diseases of Significance to Human and Wildlife Health in Central Chile. *University of Edinburgh, Edinburgh*.

AGUIRRE , A.A.,E. E. STARKEY, y D.E. HANSEN (1995) Wildlife Diseases in National Park Ecosystems. *Wildlife Society Bulletin* 23(3): 415-419

ALMBERG, E. S., L. D. MECH, D. W. SMITH, J. W. SHELDON, y R. L. CRABTREE. (2009). A serological survey of infectious disease in Yellowstone National Park's canid community. *PLoS ONE* 4: e7042.

ALMBERG, E.S., CROSS, P.C. y SMITH, D.W. (2010) Persistence of canine distemper virus in the Greater Yellowstone Ecosystem's carnivore community. *Ecological Applications* 20: 2058-2074.

AN, D.J., YOON, S.H., PARK, J.Y., NO, I.S., PARK, B., (2008). Phylogenetic characterization of Canine Distemper Virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet. Microbiol.* 132, 389–395.

APPEL, M.J. y ROBSON, D.S. (1973) A microneutralization test for canine distempervirus. *American Journal of Veterinary Research* 34: 1459-1463.

APPEL, M.J. (1987) Canine distemper virus. En: Appel, M.J. (ed.) *Virus infections of carnivores*. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science Publishers. 28-47.

APPEL, M.J., REGGIARDO, C., SUMMERS, B.A., PEARCE-KELLING, S., MARE, C.J., NOON, T.H., REED, R.E., SHIVELY, J.N. y ORVELL, C. (1991) Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of Virology* 119:147–152.

APPEL, M.J., YATES, R.A., FOLEY, G.L., BERNSTEIN, J.J., SANTINELLI, S., SPELLMAN, L.H., MILLER, L.D., ARP, L.H., ANDERSON, M., BARR, M., PEARCEKELLING, S. y SUMMERS, B.A. (1994) Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 6: 277-278.

APPEL, M.J. y SUMMERS, B.A. (1995) Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary microbiology* 44: 187-191.

ARAIZA, M.A., CEBALLOS, G. y CHÁVEZ, C. (2007) Enfermedades del jaguar en

estado silvestre en el sureste de México. En: Ceballos, G., Chávez, C., List, R., Zarza, H.(eds.) *Conservación y manejo del jaguar en México: estudios de caso y perspectivas*. México D. F.: CONABIO – UNAM – Alianza WWF Telcel. 179-185.

BANGS EE, FRITTS SH (1996) Reintroducing the gray wolf to central Idaho and Yellowstone National Park. *Wildlife Society Bulletin* 24(3): 402–413.

BEKOFF, M., GESE, E.M., (2003). Coyote (*Canis latrans*). In: Feldhammer, G.A., Thompson, B.C., Chapman, J.A. (Eds.), *Wild mammals of North America: Biology, Management and Conservation*, 2nd ed. *John Hopkins University Press, Baltimore, MD*, pp. 467–481.

BERNS, K.I., BERGOIN, M., BLOOM, M., LEDERMAN, M., MUZYCZKA, N., SIEGL, G., TAL, J., TATTERSALL, P. (2000). Family Parvoviridae. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A.

BURLESON FG., CHAMBERS TM., WIEDRAUK DL. (1992). *Virology: a laboratory manual*. California Academic Press, 28, 135:138.

CALDERON, M.G., REMORINI, P., PERIOLO, O., IGLESIAS, M., MATTION, N. y LA TORRE, J. (2007) Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology* 125: 341–349

CARBONE C., G. M. MACE, S. C. ROBERTS, D. W. MACDONALD (2004) Energetic constraints on the diet of terrestrial carnivores. *Nature* 402, 286–288

CARMICHAEL, L. E., J. C. JOUBERT, AND R. V. H. POLLOCK. (1980). Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.* 41:784–791.

CARPENTER, M.A., APPEL, M.J., ROELKE-PARKER, M.E., MUNSON, L., HOFER, H., EAST, M. y O'BRIEN, S.J. (1998) Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65(2-4): 259-266

CARROL, C., NOSS, R., PAQUET, P.C., (2001). Carnivores as focal species for conservation planning in the Rocky Mountain region. *Ecological Applications* 11, 961–980.

CEBALLOS, G., E. MELLINK Y L. HANEBURY. (1993). Distribution and conservation status of prairie dogs (*Cynomys mexicanus* and *C. ludovicianus*) in Mexico. *Biological Conservation*, 63:115-112.

CEBALLOS G., Y J. PACHECO. (2000). Los perros llaneros de Chihuahua. Importancia Biológica y Conservación. *Biodiversitas (Boletín de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO)*, 31:1-5

CEBALLOS, G., CHÁVEZ, C., RIVERA, A. y MANTEROLA, C. (2002) Tamaño poblacional y conservación del jaguar en la Reserva de la Biosfera Calakmul, Campeche, México. En: Medellín, R.A., Equihua, C., Chetkiewics, C., Rabinowitz, A., Crawshaw, P., Redford, K., Robinson, J.G., Sanderson, E. y Taber, A. (eds.) *El Jaguar en el Nuevo Milenio: Una evaluación de su estado, detección de prioridades y recomendaciones para la conservación de los jaguares en América*. México D.F.: Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México y Wildlife Conservation Society. 403-417.

CHÁVEZ, C. (2010) *Ecología y conservación del jaguar (Panthera onca) y puma (Puma concolor) en la región de Calakmul y sus implicaciones para la conservación de la Península de Yucatán*. Tesis de Doctorado. Granada, España: Universidad de Granada.

CLEAVELAND, S; MLENGEYA, T; KAARE, M; HAYDON, D; LEMBO, T; LAURENSEN, M.K; PACKER, C. (2007). The conservation relevance of epidemiological research into carnivore viral diseases in Serengeti. *Conservation biology*. 21 (3); 612-622.

CLEAVELAND, S., APPEL, M.G.J., CHALMERS, W.S.K., CHILLINGWORTH, C., KAARE, M., DYE, C., (2000). Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology* 72, 217–227.

CLEAVELAND, S.F., X. MESLIN Y R.BREIMAN. (2006). Dogs can play useful role as sentinel host for disease. *Nature* 440:605

CRAFT, M., HAWTHORNE, P., PACKER C., DOBSON, A. (2008) Dynamics of a multihost pathogen in a carnivore community. *Journal of Animal Ecology* 77: 1257-1264.

COLIGAN J. (2005). Short protocols in immunology; John Wiley and Sons.

CUNNINGHAM (1971). Virología práctica, Acribia.

CROOKS, K.R., SOULÉ, M.E.,(1999). Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. *Nature* 400, 563–566.

Cypher, B.L., J. H. Scrivner, K. K. Hammer y T. PO´Farrel. (1998) Viral antibodies in coyotes from California.

- DANIELS, T.J. y BEKOFF, M. (1989) Population and social biology of free-ranging dogs, *Canis familiaris*. *Journal of Mammalogy* 70: 754-762.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A. y HYATT, A. D. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449.
- DAVIES, T.J. Y PEDERSEN, A.B. (2008). Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, 275, 1695–1701.
- DEEM, S. L., W.B, KARESH, Y W. WEISMAN. (2001). Putting theory into practice: Wildlife health in conservation. *Conservation Biology* 15.1224:1233.
- DESARIO, C., N. DECARO, M. CAMPOLO, A. CAVALLI, F. CIRONE, G. ELIA, V. MARTELLA, E. LORUSSO, M. CAMERO Y C. BUONAVOGLIA. (2005). Canine Parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods* 126:179-185.
- DOBSON, A., AND J. FOUFOPOULOS. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos. Transac. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 356:1001–1012.
- DOBSON, A. (2004) Population dynamics of pathogens with multiple host species. *The American Naturalist* 164: S64-S78
- DOBSON, A., LODGE, D., ALDER, J., CUMMING, G.S., KEYMER, J. & MCGLADE, J. ET AL. (2006). Habitat loss, trophic collapse, and the decline of ecosystem services. *Ecology*, 87, 1915–1924.
- DUKES, J.S., MOONEY, H.A., (1999). Does global change increase the success of biological invaders? *Trends Ecol. Evol.* 14, 135–139.
- FRÖLICH, K., O.CZUPALLA, L. HAAS, J. HENTSCHE, J. DEDEKC, Y J. FICKEL. (2000) Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores of Germany. *Veterinary microbiology* 74: 283-292-
- FUNK, S.M., FIORELLO, C.V., CLEAVELAND, S., GOMPPER, M.E., (2001). The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: *Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.*
- FURTADO, M.M. y FILONI, C. (2008). Diseases and their role for Jaguar conservation. *CAT News Special Issue 4 - The Jaguar in Brazil.* 35-40.

GÁMIZ, C., MARTELLA, V., ULLOA, R., FAJARDO, R., QUIJANO-HERNANDÉZ, I y MARTÍNEZ, S. (2011) Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Veterinary Research Communications* 35(6): 381-390.

GESE, E. M., R. D. SHULTZ, O. J. RONGSTAD, Y D. E. ANDERSEN. (1991). Prevalence of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in wild coyotes in southeastern Colorado. *Journal of Wildlife Diseases* 27(2): 320-323.

GESE , E. M., R. D. SCHULTZ ,M.R.JOHNSON,E.S.WILLIAMS,R.L.CRABTREE, AND R. L. RUFF. 1997. Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 47–56.

GEHRT, S.D., (2007). Ecology of coyotes in urban landscapes. In: Proceedings of the 12th Wildlife Damage Management Conference, *Lincoln, NE*, pp. 303–311.

GREENE, C.E., APPEL, M.J.(1998). Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, second ed. WB Saunders, Philadelphia, PA, pp. 9–22.

GREEN, A. (1993). Canine Distemper In *Infectious Disease of the dog and the cat.*, G. E Green editor. W. B Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 9-22 pp.

GORDON, J.C Y E.J. ANGRICK.(1986). Canine Parvovirus:. Environmental effects on infectivity. *American journal of Veterinary Research*. 47:1464-1467. Halpern, B.S., Borer, E.T., Seabloom, E.W. & Shurin, J.B. (2005). *Predator effects on herbivore and plant stability*. *Ecol. Lett.*, 8, 189–194.

GUERRERO, S.S. (2011) *Riesgo zoonótico y antropozoonótico en carnívoros silvestres pequeños y medianos en Calakmul, Campeche*. Tesis de Maestría. Campeche, Campeche, México: El Colegio de la Frontera Sur.

GUO, W, J. F. EVERMANN, W J. FORE'IT, F. F. KNOWLTON, AND L. A. WINDERG. (1986). Canine distemper virus in coyotes: A serologic' survey. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189: 1099-1100.

HARLOW E, LANE .D. (1999). Using antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

HAYDON DT, CLEAVELAND S, TAYLOR LH, LAURENSEN MK (2002a) Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* 8: 1468–1473.

HOFF, G. L. y BIGLER, W.J. (1974) Epizootic of canine distemper virus infection among urban raccoons and gray foxes. *Journal of Wildlife Diseases* 10: 423–428.

HOLZMAN, S., M. J. CONROY, Y W. R. DAVISON (1992) Diseases, parasites and survival of coyotes in south- central Georgia. *Journal of wildlife diseases* 28(4): 572-580.

JONH, T. J., Y R. SAMUEL. (2000). Herd Immunity and herd effect.: new insight and definition. *European journal of Epidemiology* 16:601:606.

JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J. L. & DASZAK, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-3.

KAPIL S, ALLISON RW, JOHNSTON L, ET AL. (2008) Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clin Vaccine Immunol* 15(4):707 12.

KAPIL, S. y YEARY, T.J. (2011) Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 41: 1069-1086.

KEESING, F., HOLT, R. D. & OSTFELD, R. S. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett*, 9, 485-98.

KREBS, C. J. (1999) Paramixoviridae: The Viruses and Their Replications in Fields Virology *Ecological Methodology*, Addison-Wesley Educational Lippincott Williams y Wilkins, 5ta. Ed

LAMB, R.A., PARKS, G.D (2007). Paramixoviridae: The Viruses and Their Replications in Fields Virology.

LAMB RA, PATERSON RG, JARDETZKY TS.(2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344:30–7.

.LAURENSEN, K., FEKADU SHIFERAW, SILLERO-ZUBIRI, C (1998). Disease, domestic dogs and the Ethiopian wolf: the current situation, Chapter 4. In: Sillero Zubiri, C., Macdonald, D.W. (Eds.), *The Ethiopian Wolf. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland, pp. 32–42.

LIST, R. (1997). *Ecology of the kit fox (Vulpes macrotis) and coyote (Canis latrans) and the conservation of the prairie dog ecosystem in northern Mexico*. Tesis de Doctorado, Universidad de Oxford, Inglaterra.

- LIST, R., Y D. W. MACDONALD. (1998). Carnivora and their larger mammalian prey: specie inventory and abundance in the Janos-Nuevo Casas Grandes prairie dog complex. *Revista Mexicana de Mastozoología* 3:95-112.
- LIST, R. Y D. W. MACDONALD. (2003). Home range and habitat use of the kit fox (*Vulpes macrotis*) in a prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) complex. *Journal of Zoology* 259:1-5.
- LINHART, S. B. AND F. F. KNOWLTON. (1975). Determining relative abundance of coyotes by scent station lines. *Wildlife Society Bulletin*, 3:119-124.
- MACHIDA, N., K, KIRYU, K. OISHI, E. KANDA, N. ISUMIZAWA Y T. NAKAMURA.(1993).Pathology and Epidemiology of Canine Distemper in Raccon Dogs (*Nyctereutes-Procyonoides*). *Journal of Comparative Pathology* 108:383-392.
- MARTELLA, V., CIRONE, F., ELIA, G., LORUSSO, E., DECARO, N., CAMPOLO, M., DESARIO, C., LUCENTE, M.S., BELLACICCO, A.L., BLIXENKRONE-MOLLER, M., CARMICHAEL, L.E., BUONAVOGLIA, C (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116, 301–309.
- MCCARTHY, A.J., SHAW, M. Y GOODMAN, S.J. (2007). Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 274, 3165–3174
- McFADDEN, K.W., WADE, S.E., DUBOVI, E.J. y GOMPPER, M.E. (2005) A serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of Wildlife Diseases* 41(3): 615–617.
- MECH, L.D., S.M. GOYAL. 1993., W. J. PAUL, AND W. E. NEWTON. (2008). demographic effects of canine parvovirus on a free-ranging wolf population over 30 years. *Journal of Wildlife Diseases* 44: 824–836.
- MENA, G.H. (2007) *Presencia de Leptospira spp. y moquillo canino en poblaciones de perros y carnívoros silvestres en la Isla Cozumel*. Tesis de Maestría. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México
- MILLS MGL, GORMAN ML (1997) Factors affecting the density and distribution of wild dogs in the Kruger National Park. *Conservation Biology* 11: 1397–1406.
- MILLS, J. N., AMMAN, B. R. & GLASS, G. E. 2009. Ecology of hantaviruses and their hosts in North America. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 9.

MONTALI, R. J. C. R BARTZ Y M. BUSH. (1987). Canine Distemper Virus *In virus Infection of carnivores*, M. J Appel editor. *Elsevier Science Publisher*, Amsterdam, The Netherland 437-443.

MORENO, C. E. (2001) Métodos para medir la biodiversidad. *M&T-Manuales y Tesis SEA*. Zaragoza.

MURRAY, D. L., C. A. KAPKE, J. F. EVERMANN, AND T.K. FULLER. (1999). infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *animal conservation* 2: 241–254.

NAKAMURA, M., TOHYA, Y., MIYAZAWA, T., MOCHIZUKI, M., PHUNG, H.T., NGUYEN, N.H., HUYNH, L.M., NGUYEN, L.T., NGUYEN, P.N., NGUYEN, P.V., NGUYEN, N.P., AKASHI, H.,(2004). A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261–2269.

PACHECO, J. G. CEBALLOS AND R. LIST. (2000). Los mamíferos de la región de Janos-Casas Grandes, Chihuahua, México. 1999-2000. *Revista Mexicana de Mastozoología* 4:71-85.

PATZ, J. A., DASZAK, P., TABOR, G. M., AGUIRRE, A. A., PEARL, M., EPSTEIN, J., WOLFE, N. D., KILPATRICK, A. M., FOUFOPOULOS, J., MOLYNEUX, D. & BRADLEY, D. J. (2004) Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1092-1098.

PEDERSEN, A.B., JONES, K.E., NUNN, C.L. y ALTIZER, S.A. (2007). Infectious disease and mammalian extinction risk. *Conserv. Biol.* 21, 1269–1279.

PRUGH., L. R. The rise of the mesopredator.(2009) *Bioscience* 59, 779–791

RADELOFF, V.C., HAMMER, R.B., STEWART, S.I., FRIED, J.S., HOLCOMB, S.S., MCKEEFRY, J.F (2005). The wildland–urban interface in the Unites States. *Ecol. Appl.* 15, 799– 805

READ, A. F., ALBON, S. D., ANTONOVICS, J., APANIUS, V., DWYER, G., AND HOLT, R. D. (1995). Genetics and evolution of infectious diseases in natural populations. In “Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations.” (Grenfell and Dobson, eds.), pp. 450–477. Cambridge University Press, Cambridge.

RENDÓN, F.E. (2009) Evaluación del efecto de la relación presa-depredador sobre la prevalencia de microparásitos a través de modelos matemáticos:

Toxoplasma gondii y *Leptospira* en ocelotes (*Leopardus pardalis*) como caso de estudio. Tesis de Maestría. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.

RIPPLE W. J., A. J. WIRSING, C. C. WILMERS, M. LETNIC (2013). Widespread mesopredator effects after wolf extirpation. *Biol. Conserv.* 160, 70–79.

RITCHIE E.G. (2009). Ecosystem restoration with teeth: What role for predators? *Trends Ecol. Evol.* 27, 265–271

ROELKE-PARKER ME, MUNSON L, PACKER C, KOCK R, CLEAVELAND S, CARPENTER M (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*;379(6564):441–5.

RUDOLF, V. & ANTONOVIC, J. (2005) Species coexistence and pathogens with frequency-dependent transmission. *The American Naturalist*, 166, 112-118.

SEPÚLVEDA, M.A., SINGER, R., SILVA-RODRÍGUEZ, E., STOWHAS, P. y PELICAN, K. (2014) Domestic dogs in rural communities around protected areas: conservation problem or conflict solution? *PLoS ONE* 9(1): 1-8.

SERPELL, J., (1995). *The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour and Interactions with People.* Cambridge University Press, UK.

SIMON-MARTÍNEZ, J., ULLOA-ARVIZU, R., SORIANO, V.E. y FAJARDO R. (2008) Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Veterinary Journal* 175(3): 423–6.

SOBERÓN J, LLORENTE J. (1993). The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conserv Biol.* 7(3):480–488.

SOL, D., LEFEBVRE, L., (2000) Behavioural flexibility predicts invasion success in birds introduced to New Zealand. *Oikos* 90, 599–605.

SUZÁN, G; CEBALLOS, G. (2005). The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico City limits. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 36 (3): 479-484.

SUSUKY, K. J. A, C. PEREIRA, R. LÓPEZ, G. MORALES, L. ROJAS, L.E MUTINELLI Y E. R PONS (2007). Descriptive and spatial and spatial-temporal analysis of the 2000-2005 canine rabies endemic in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Acta tropica* 2007.1006.1003.

TATTERSALL, P., BERGOIN, M., BLOOM, M.E., BROWN, K.E., LINDEN, R.M., MUZYCZKA, N., PARRISH, C.R., TIJSSEN, P (2005). Family Parvoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press.

TERBORGH J., K. FREELEY (2010) In *Trophic Cascades: Predators, Prey, and the Changing Dynamics of Nature*, J. Terborgh, J. A. Estes, Eds. (Island Press, Washington, DC, pp. 125–140.

THOMAS, N. J., W. J. FOREYT, J. F. EVEMAN, L.A, WINDBERG, Y F. F. KNOWLTON. (1984) Seroprevalence of canine Parvovirus in wild coyotes from Texas, Utah and Idaho (1972 -1983) *JAVMA* 185(11): 1283-1287.

TRUYEN, U. (2006). Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9–13.

VAN DE BILDT, M. W. G., T. KUIKEN, A. M. VISEE, S. LEMA, T. R. FITZJOHN, AND A. D. M. E. OSTERHAUS. (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg. Infect. Dis.* 8:212–213.

WILLIAMS, E. S., E. T. THORNE, M. J. C. APPEL. (1988) Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of Wildlife Disease*

WOODROFFE. R.(1999). Managing disease threats to wild mammals. *Anim Conserv*,2(3):185–93.

WOODROFFE, R., S. CLEVELAND, O. COURTENAY, M. K. LAURENSEN Y M. ARTOIS. (2004). Infectious disease in the management and conservation of wild canids. In D. W. MacDonald and C. Sillero-Zubiri (eds.). *Biology and conservation of wild canids*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 123–142.

WOMA, T.Y., VAN VUUREN, M., BOSMAN, A.M., QUAN, M., OOSTHUIZEN, M (2010). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143 (2-4), 126–132.

YOUNG, T.P. (1994). Natural die-off of large mammals: implication for conservation. *Conservation biology* 8:410-418.

YOUNG, J.K., OLSON, K.A., READING, R.P., AMGALANBAATAR, S., BERGER, J (2011). Is wildlife going to the dogs? Impacts of feral and free-roaming dogs on wildlife populations. *Bioscience* 61, 125–132.

