

Tesis doctoral

Conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*)

Implicaciones del Parvovirus de la enfermedad Aleutiana y relaciones demográficas con sus principales competidores potenciales



Sisco Mañas Prieto
2015



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultat de Veterinària
Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals
Programa de Doctorat de Medicina Veterinària**

Tesis doctoral

Conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*): implicaciones del Parvovirus de la enfermedad Aleutiana y relaciones demográficas con sus principales competidores potenciales

Memoria presentada por

Francesc Mañas Prieto

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona

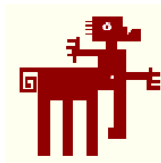
En Barcelona, a 20 de octubre de 2015

Dr. Jordi Casal i Fàbrega
Director

Dr. Jordi Ruiz Olmo
Director

Francesc Mañas Prieto
Autor

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals
Universitat Autònoma de Barcelona



Conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*): implicaciones del Parvovirus de la enfermedad Aleutiana y relaciones demográficas con sus principales competidores potenciales

Los **Dres. Jordi Casal i Fàbrega** y **Jordi Ruiz Olmo**, hacen constar que el trabajo “Conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*): implicaciones del Parvovirus de la enfermedad Aleutiana y relaciones demográficas con sus principales competidores potenciales” presentado por Francesc Mañas Prieto se ha realizado en la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona bajo nuestra dirección.

En Barcelona, a 20 de octubre de 2015

VºBº DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dr. Jordi Casal i Fàbrega

Fdo. Dr. Jordi Ruiz Olmo

Al meus pares, per tot

Agradecimientos

Tenia tantes, tantes ganes d'arribar fins aquí, i d'escriure aquest apartat ...

Us explico. Al 1991 vaig veure la meva primera llúdriga. Es tractava d'un cadell orfe que cuidaven uns particulars dins una casa perduda a l'Anglaterra profunda. Pocs dies després, en un simposium al zoològic de Londres es parlava d'una malaltia de visons americans, que no coneixia, i que potser podria afectar les llúdrigues. Des de llavors els mustèlids em van enamorar i, junt amb aquesta malaltia, han estat molt presents a la meua vida. Una part del fruit de tot això i de tots aquests anys son aquestes pàgines que, naturalment, també ho son de tots vosaltres, que m'heu acompanyat, ensenyat, ajudat i aguantat i als quals us vull, de tot cor, donar les gràcies.

En primer lloc, agrair als meus dos codirectors; al Jordi Ruiz-Olmo i al Jordi Casal i Fàbrega, per haver arribat fins aquí. Santa paciència la vostra;. Sense el vostre coneixement, la vostra feina, capacitat, consells, revisions, ànims, saber fer i un munt de coses més això no hagués estat possible. Gràcies per fer-vos sentir tant a prop. Es un plaer fer coses al costat de gent que estimes i admires i que t'ho donen tot sense cap interès ni esperar res a canvi.

Agrair al mateix Jordi Ruiz-Olmo, al Santiago Palazón i al Josep Maria López-Martín (te perdono) per haver-me acollit fa més de vint anys en el seu grup d'investigació i apassionats dels mustèlids. Gràcies a la seva feina em van fer descobrir el visó europeu, que ni sabia que existia.

A tota la gent que, gràcies als visons, he conegut i han entrat a la meua vida i que no els penso deixar escapar. Agradecer a mi nueva familia de Aranda de Duero: Asun Gómez, Madis Pödra, mi ahijado Sassu y a su hermana Astrid y al resto de su familia, por adoptarme y por compartir su vida conmigo, además de los visones. A Vicky Asensio, por su entusiasmo, alegría y por las horas que hemos pasado juntos haciendo necrópsias y explicándonos batallitas con música pachanguera de fondo. A Mirenka Ferrer y Maribel Pérez, de TRAGSATEC, por todo lo que me habéis ayudado y por haceros sentir tan cerca. A Mamen, a Javivi, a Irene, a Silvia y al resto de la jet-set malagueña, porque ellos saben del inicio y de todo lo que les debo.

Agrair a tots els companys del Servei de Biodiversitat i Protecció dels Animal y de la

Bodeguilla, en especial al David Camps i a la Núria Gázquez, pel dia a dia i pel seu recolzament. Al Toni Batet, al Josep Maria Olmo, al Richard Martín, a la Pilar Alonso, a l'Otto, a la Jabel Danot, a la Lola Alomà, a l'Olga López, a la Txell Mariné, a l'Anna Orriols, al Berto Minobis, a la Rosa Marsol, al Roger Fradera, la Marina Barquin, el Cristian Viladegut i a la resta de personal -veritables puntals- dels Centres de Fauna de Catalunya, que fan tant amb tant poc: la Maria Pifarré, el Jorge Garcia, el Joan Mayné, el Rafael Molina, l'Elena Obón, el Francesc Carbonell, la Conchi Millán, el Rubén Gutiérrez, la Raquel Larios, l'Emili Vallbuena, la Mònica Alonso, la Berta Balcells, el Gregori Conill, l'Ana Ledesma, la Laura Olid, l'Albert Petit, el Joan Alàs, l'Olga Nicolàs, el Cesar Piñol, el Julián Sánchez, l'Albert Porté, l'Anna Vila, el Lluís Culleré, la Susana Garcia, la Raquel Gómez, l'Angel Iborte, l'Antonio López, l'Ester Lamora, la Clara Martí, la Carolina Domínguez i a l'Anahí Bonilla així com a tots i totes els/les voluntaris/àries i gent de pràctiques dels propis centres.

A los técnicos de las Administraciones con presencia del visón europeo, especialmente a los que en su día impulsaron el programa de cría en cautividad de la especie: Luis Lopo, Juan Ignacio Ibañez, Marta Javares, Ignacio Gámez, Joseba Carreras de Bergareche, Andoni Díaz, Consuelo Temiño, Sara Brizuela, Olga Esther Alarcía, José Ignacio Molina, José Manuel Meneses, Manolo Alcántara, José Manuel González, Luis Lobo, Gorka Belamendía, Enrique Castián, Paloma Garzón y Luis Mariano González.

Agrair a l'Oriol Comas i a la Núria Vallés, d'ADEFFA, a la Cristina Fernández, a la Marga Genís i a la resta del Positive Team, a la Xesca Lobo, i al Paco Fernández així com a Javier López de Luzuriaga, Jorge Ferreira Sebastián, Patricia Lizarraga, Laura Elorza, Sonia Oreca, Cesar Aguilar, Mariana Balaguer, Esther Sánchez, y a todos los tramperos, guardas de fauna, agentes rurales y centros de recuperación de fauna del Estado.

A l'artista Toni Llobet pel dibuix de la portada i per donar-nos el seu talent, a Títit Maran, referente en la conservació del visón europeo y a Marshall E. Bloom del AMDV, por estar siempre ahí y contagiar su entusiasmo. También agradecer a Gary Matson y a todo el personal de Matson's Laboratory.

A Mariano Domingo, Vladimír Katchanovský, Polina Katchanovskaia, Natalia Katchanovský, Wolfgang Festl, Christian Seebas, Dmitri Skumatov, Jordi Torres, Joaquim Castellà, Andrés Illana, Alejandro Onrubia, Jorge González, Idoia Villate, Jabí Zabala, Íñigo Zuberogoitia, Javier Pinedo, Itziar Maiztegui, Carlos Bravo, Félix Bueno(†), Paloma Pérez, David Diez, Antonio Callejo, Marta Muñoz, Javier

Caldera, Carlos Davia, Fernando Jubete, Juan Jiménez, Martí Surroca, Jordi Colas, Mercè Corroto, Sonia López, Yolanda Melero, Laura Arjona, Mireia Plaza, Giúlia Santullí, Marina Rodríguez, Elena Rafart, Joana Martelo, Joan Barrull, Isabel Mate, Andrés García, Juan Sanz, Pablo Sierra, Miguel Delibes y a tod@s los que me he olvidado pero que deberían estar aquí.

Als meus fantàstics pares, l'Anita i el Sisco, als quals va dedicar aquest treball, a l'Antonio, la Carme, el Jesús, la Matí, el Marc, la Núria, la Júlia, la Clàudia i la Una, així com al meu estimat fill Daniel, per donar màgia a tot plegat. Sou una passada. Gràcies. Us estimo molt.

A la Rut, per aguantar-me el dia a dia i la seva paciència. Gràcies per tot. Ets la meva vida. Testimo molt. Així com als teus fills; l'Albert, l'Àlex i l'Andreu i a tota la teva família.

Y pedir perdón a una especie mágica, que entró por la puerta de atrás y que se marchará, sin pena ni gloria, de la Fauna Ibérica. Por no evitar su extinción, que está al caer entre discusiones, falta de decisiones, voluntades y pocos recursos. Investigadores rusos hacían referencia a la “batalla del Ebro” y al “no pasarán” republicano cuando se les hablaba de los esfuerzos de control de la especie americana en la Península Ibérica para salvar a su “visión ruso”. En la actualidad, la batalla del Ebro está prácticamente perdida y a los visones europeos ibéricos no les queda ni la posibilidad de exiliarse a Francia. Ojalá que los trabajos que se realizan actualmente en el marco de un proyecto LIFE puedan iluminar algo tan negro futuro. Como dice en su blog de la especie uno de los compañeros con más criterio y conocedores del problema: El último que apague la luz.

"You're a murderer" Arkady said (...)

"Open your eyes," Osborne said. "What do you see?"

"Furs"

"Not just furs. Blue mink, white mink, standard mink, blue fox, silver fox, red fox, ermine, lynx, kakakul. And Barguzin sables. Over two million dollars' worth of furs in this room, and there are fifty more like it along Seventh Avenue"

Martin Cruz Smith. Gorky Park. 1981

Resumen

El visón europeo *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) sufre un dramático proceso de extinción y es uno de los mamíferos más amenazados del Mundo. El visón americano *Neovison vison* (Schreber, 1777), especie exótica invasora, se considera actualmente su principal amenaza. Sin embargo, la introducción del visón americano y la concurrencia ecológica posterior de las dos especies no puede explicar, por si sola, la disminución o desaparición del visón europeo en diferentes épocas y lugares. El parvovirus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV) es el principal problema sanitario mundial en las granjas de visón americano, causante de diferentes síndromes clínicos dependiendo de la cepa vírica y de las características del animal. Se ha especulado que la infección por AMDV ha podido contribuir a la disminución del visón europeo pero no se ha realizado ningún estudio detallado. Para evaluar los efectos potenciales de la infección por AMDV en la conservación del visón europeo, se realizaron serologías frente al AMDV en muestras de 492 visones europeos y en 1.735 visones americanos durante un periodo de 16 años. Con la finalidad de investigar un posible efecto del AMDV en las estructuras demográficas, se realizó una determinación de las edades en tres especies de mustélidos. Caninos procedentes de 1.766 cadáveres de 1.661 visones americanos, 54 visones europeos y 51 turones europeos *Mustela putorius* (Linnaeus, 1758) se seccionaron y se utilizó el recuento de los anillos en el cemento dental para estimar la edad de los ejemplares. Las muestras de visones americanos procedían principalmente de las campañas de control de esta especie exótica invasora, mientras que los atropellos fueron la causa principal de muerte en las dos especie autóctonas. De forma paralela se realizó un análisis de las estructuras demográficas de tres poblaciones de visón americano sometidas a diferente intensidad de control con el objetivo de detectar posibles variaciones en estas estructuras causadas por la captura, así como identificar indicadores simples y eficientes del éxito de los esfuerzos de control.

La seroprevalencia del AMDV en el visón europeo fue del 32%. No se detectaron diferencias significativas en la seroprevalencia de anticuerpos entre sexos o entre años o pesos. La incidencia de seroconversión (negativo a positivo) en visones europeos recapturados fue de 0,46 casos por animal-año de riesgo. Para los animales positivos, la incidencia de seroconversión de un resultado positivo a uno de negativo fue de 0,18 casos por animal- año de riesgo. En 1.735 visones americanos, la prevalencia global fue del 32,4% y ésta varía entre las seis poblaciones silvestres estudiadas y se incrementa con la edad de los animales. Los resultados indican que la infección es endémica, distribuida por todas las poblaciones y no se

observaron efectos sobre la dinámica poblacional de ambas especies. ADN del AMDV se detectó mediante PCR y se secuenció y los resultados sugieren que al menos dos tipos de secuencias de AMDV circulan en España y que los AMDV presentes difieren de otros aislados en Norte América y Europa.

En relación a las estructuras demográficas, los individuos con edad anterior a su primera temporada de cría (clase 0+) representaron aproximadamente la mitad de todos los animales, sin diferencias significativas entre especies o causa de muerte. Se observaron diferencias en los porcentajes de sub-adultos entre los períodos pre- y post-reproductor, con una alta mortalidad durante el período de dispersión-invierno en las tres especies. Las frecuencias de mortalidad de los animales sub-adultos fueron de 0,46, 0,50 y 0,55 para el visón americano, el visón europeo y el turón europeo. Las tasas de supervivencia del visón americano fueron más altas que para las especies nativas. No se observaron diferencias en la edad media de los animales encontrados muertos en atropellos entre las tres especies ni entre visones americanos atropellados y capturados. En relación al efecto del control sobre la estructura poblacional de tres poblaciones de visón americano, no se detectaron evidencias de cambios en la estructura de edades en ninguna de las poblaciones. La proporción de individuos de cada sexo y clase de edad se mantuvieron constantes, lo que sugiere que a pesar de los trabajos de control del visón americano, la estructura de edades se mantuvo estable durante el período de estudio.

Abstract

The European mink (*Mustela lutreola*, Linnaeus, 1761) has undergone a dramatic decline and is one of the most endangered mammals in the world. The invasive American mink (*Neovison vison*, Schreber, 1777) is considered the main factor for this decline. However, the American mink's introduction and the subsequent ecological concurrence of the two species cannot solely explain the decline or disappearance of the European mink in different times and places. Aleutian mink disease parvovirus (AMDV) is the main health problem in fur farming worldwide, causing varied clinical syndromes that depend on the viral strain and host factors. Infection with AMDV has been speculated to contribute to the decline of the European mink, but a detailed study has not been performed. To assess the potential effects of AMDV infection on the conservation of the European mink, we surveyed AMDV antibody in samples from 492 native European mink and 1,735 feral American mink collected over 16 yr. In order to investigate a possible AMDV impact on demographic structures, age estimation of three mustelid species was performed. Canine samples of 1,766 carcasses from 1,661 American mink, 54 European mink and 51 European polecats (*Mustela putorius*, Linnaeus, 1758) were sectioned, and cementum annuli counts in tooth sections were used for age estimation. American mink samples consisted primarily of trap-captured animals, whereas road casualties were the principal origin of European mink and European polecat carcasses. Simultaneously, the demographic structures of three mink populations subjected to different culling intensities were studied with the aims to detect possible variations in these structures caused by trapping, and identify simple and efficient indicators of successful trapping efforts.

The antibody prevalence in European mink was 32%. There were no statistically significant differences in antibody prevalence between sexes, or among years or weight classes. For recaptured European mink, incidence of seroconversion (negative to positive) was 0.46 cases per animal-year at risk. For positive animals, the incidence of conversion from positive to negative was 0.18 cases per animal-year at risk. In 1,735 feral American minks, the overall prevalence was 32.4% and varied among the six wild populations studied. The prevalence increased with age. Infection with AMDV appears to be endemic, distributed across the entire ranges of both species, and no effects on the population dynamics of either species were observed. AMDV DNA was detected PCR and sequenced and the results suggested that two sequence types of AMDV were circulating in Spain, and that the Spanish AMDVs differed from other described isolates from North America and Europe.

In demographic structures, individuals prior to their first breeding season (class 0+) represented approximately half of all animals, with no significant differences between species or causes of death. Differences in sub-adult percentages were observed between the pre- and post-reproductive period, with a high mortality during the dispersal-winter period in all three species. Frequencies of mortality of the sub-adult age class were 0.46, 0.50 and 0.55 for American mink, European mink and European polecat, respectively. Survival rates of the American mink were higher than those of the native species. No differences were observed in mean age of animals found dead as road casualties in all three species or between captured American mink and road casualties. In relation with the culling effect over the studied populations, no evidence of age structure changes was detected in any population. The proportion of individuals in each sex and age class remained constant over time, suggesting that despite the control efforts, the age structure remained stable over the study period.

1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. EL VISÓN EUROPEO	19
1.2. CAUSAS RELACIONADAS CON EL DECLIVE DEL VISÓN EUROPEO	22
1.2.1. <i>El visón americano</i>	23
1.2.2. <i>Problemas sanitarios</i>	26
1.3. EL PARVOVIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN.....	26
1.3.1. <i>La enfermedad en visones americanos de granja</i>	28
1.3.2. <i>El control de la enfermedad en visones americanos de granja</i>	31
1.3.3. <i>Estudios sobre el AMDV en el visón americano en el medio natural</i>	31
1.3.4. <i>Estudios sobre el AMDV en el visón europeo</i>	32
1.3.5. <i>Posibles efectos del AMDV sobre el visón europeo</i>	36
2. OBJETIVOS	39
3. ESTUDIOS	41
3.1. ALEUTIAN MINK DISEASE PARVOVIRUS IN WILD RIPARIAN CARNIVORES IN SPAIN.....	45
3.2. PREVALENCE OF ANTIBODY TO ALEUTIAN MINK DISEASE VIRUS IN EUROPEAN MINK (<i>MUSTELA LUTREOLA</i>) AND AMERICAN MINK (<i>NEOVISON VISON</i>) IN SPAIN.....	53
3.3. DEMOGRAPHIC STRUCTURE OF THREE RIPARIAN MUSTELID SPECIES IN SPAIN	67
3.4. ARE WE ABLE TO DAMAGE THE POPULATION STRUCTURE OF INVASIVE SPECIES THROUGH CULLING? CASE STUDY OF AMERICAN MINK CONTROL IN THE NORTHERN IBERIAN PENINSULA.....	83
4. DISCUSIÓN	101
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	117

El visón europeo *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) ha sido hasta hace pocos años una de las especies más desconocidas de la fauna ibérica. Distribuido originariamente por gran parte de Europa, la especie ha sufrido una dramática disminución desde el siglo XIX. De forma paralela a este proceso de extinción, a mediados del siglo XX la especie entró en la Península Ibérica, procedente de Francia, expandiéndose hacia el sur en una particular huida hacia delante (Youngman, 1982; Palazón y Ruiz-Olmo, 1997; Gómez *et al.*, 2011).

Se han propuesto muchas hipótesis para intentar explicar su declive en toda Europa. La pérdida de hábitat, la caza excesiva y el impacto del visón americano *Neovison vison* (Schreber, 1777) son los factores aparentemente más directamente implicados (Maran, 2007), aunque ninguna causa de forma aislada puede explicar por si sola la extinción de la especie en diferentes épocas y lugares. La actuación de patologías, transmitidas o no por parte del visón americano, constituye otra hipótesis para explicar esta situación.

Tras la detección del Parvovirus de la Enfermedad Aleutiana del Visón (AMDV) en la especie (Mañas *et al.*, 2001), la monitorización de este parvovirus en la población de visón europeo se consideró como una de las líneas prioritarias de investigación dentro de los trabajos de conservación de la especie¹.

El presente estudio pretende determinar la prevalencia e incidencia del AMDV en la población ibérica de visón europeo durante un largo período de tiempo. Determinar las posibles repercusiones en su conservación así como el papel del visón americano, como posible transmisor del virus. El AMDV es una enfermedad principalmente crónica y podría haber un efecto acumulativo en su prevalencia al incrementar la edad de los animales. Por ello se ha realizado un estudio demográfico para determinar posibles efectos de patologías en las poblaciones así como determinar, en visón americano, la seroprevalencia del AMDV en las diferentes clases de edad. Esto ha permitido obtener datos básicos de las estructuras demográficas de tres especies similares de carnívoros semiacuáticos que comparten un mismo

¹ Conclusiones de la I Reunión del Grupo de Trabajo del Visón Europeo del Comité de Fauna y Flora (Vitoria-Gasteiz, marzo de 1999).

hábitat y poder determinar su efecto sobre las relaciones de competencia. De forma paralela, en el visón americano se ha utilizado para valorar la eficacia de los trabajos de control en tres poblaciones de la especie sometidas a diferente intensidad de control y objetivos e identificar un indicador simple y eficiente para valorar la evolución de estos trabajos. Todo ello en el marco de la conservación del visón europeo.

1.1. El visón europeo

El visón europeo pertenece a la familia de los Mustélidos. Tiene un pelaje de color marrón-chocolate, corto y brillante, con una mancha blanca característica en los labios superior e inferior y claro dimorfismo sexual. Los machos adultos ibéricos suelen pesar entre 750 y 950 gr., mientras que las hembras pesan entre 450 y 580 gr.². Tiene el cuerpo y la cola alargados, adaptados a la vida terrestre y acuática, con pequeñas membranas interdigitales para nadar con facilidad, aunque se trata de un animal que pasa más tiempo en tierra que en el agua.

Es un animal solitario, territorial y de hábitos nocturnos y crepusculares (Youngman, 1990; Palazón y Ruiz-Olmo, 1997). Vive en las zonas húmedas, lagos y ríos, con aguas de buena calidad y con una vegetación de ribera densa y extensa (Lodé, 2002), no encontrándose normalmente a más de 100 metros de masas de agua (Maran *et al.*, 2011). No es un animal especialista en la dieta, que está compuesta principalmente por presas ligadas al hábitat que ocupa: pequeños mamíferos, aves, peces, anfibios y cangrejos de río (Sidorovich *et al.*, 1998; Maran *et al.*, 1998a; Palazón, 1998; Palazón *et al.*, 2004).

Morfológicamente es similar al visón americano y al turón europeo (Lodé, 1995). Del visón americano está muy alejado desde un punto de vista genético (Sato *et al.*, 2003) diferenciándose de éste, entre otros aspectos, en la biometría y el patrón de pelaje. Sin embargo, es muy similar y próximo genéticamente al turón europeo *Mustela putorius* (Linnaeus, 1758) (Davison *et al.*, 2000) pudiéndose hibridar con él (Sidorovich, 2001a; Tumanov y Abramov, 2002; Lodé *et al.*, 2005). A pesar de ello, la hibridación y la introgresión genética ocurren en bajos niveles (3% y 0.9% respectivamente) (Cabria *et al.*, 2011). Las tres especies comparten hábitat, siendo el turón europeo el menos ligado a los ecosistemas riparios

² Media +/- SD en animales capturados de enero a junio (n=149 y 59 para machos y hembras, respectivamente). Datos propios inéditos.

(Sidorovich y Macdonald, 2001; Fournier *et al.*, 2008; Harrington y Macdonald, 2008).

El visón europeo se distribuía originalmente desde Finlandia hasta las montañas del Cáucaso y desde Francia hasta los Urales (ver revisiones sobre su área histórica de distribución en Youngman, 1982; Maran, 2007 y Maran *et al.*, 2011). La especie ha sufrido un gran declive en toda Europa a partir del siglo XIX, especialmente durante el siglo XX, sobreviviendo –en una valoración optimista y no actualizada- en menos del 15% de su área de distribución original (Maran *et al.*, 2011). La gran metapoblación original se ha fragmentado en tres núcleos poblacionales pequeños, aislados y en donde prosigue el declive: el primero en Rusia (población oriental), el segundo en los Deltas de los ríos Danubio y Dniester (Rumania y Ucrania) y el tercero, al que corresponde nuestra área de estudio, la población occidental compartida (aunque fragmentada entre sí) entre Francia y España (Maran, 2007; Maran *et al.*, 2011).

En la Fig.1 se muestra, de forma aproximada, su área de distribución original, con los períodos de mayor disminución poblacional (adaptado de Youngman, 1982; Saint-Girons, 1991; Maran, 2007 y Maran *et al.*, 2011), así como el área de distribución estimada en el año 2011 (adaptada de Maran *et al.*, 2011).

En la actualidad, sólo se conoce la presencia segura de poblaciones de la especie en España y en el delta del río Danubio, en Rumania. En Francia, desde el año 2007 no se han capturado visones europeos en los trampeos estandarizados y las pocas citas disponibles provienen de observaciones accidentales (SFEPM, 2014). En Rusia se disponen de citas puntuales en varios territorios históricos pero se desconoce si todavía existen poblaciones relevantes (D. Skumatov, com. pers.). Además, el área histórica de distribución de la especie en Rusia está ocupada en su totalidad por el visón americano.

A nivel genético la población occidental es la que presenta la más baja diversidad, con un solo haplotipo de mtDNA detectado, en comparación a los cuatro detectados en la población del delta del Danubio o los diez de la población oriental, que sería la población con una mayor diversidad genética (Michaux *et al.*, 2004; 2005; Cabria *et al.*, 2015).

La primera cita de la especie en la población occidental se obtuvo en 1831 en la costa atlántica

de Francia (Saint-Girons, 1991) mientras que en la Península Ibérica se citó por primera vez en 1951 -Guipúzcoa, País Vasco (Rodríguez de Ondarra, 1955). La presencia de la especie en España es reciente y fruto de una expansión hacia el sur por parte de la población francesa. La ausencia de citas históricas y la baja variabilidad genética detectada en la población occidental sugieren, aunque no existen datos científicos que lo avalen, una posible colonización reciente, ya sea debido a una expansión natural o debido a una liberación antrópica de unos pocos individuos (Youngman, 1990; Michaux *et al.*, 2005; Cabria *et al.*, 2015). La ausencia de registro fósil impide certificar que antiguamente la población occidental estuviera conectada con las otras poblaciones en un área de distribución continua.

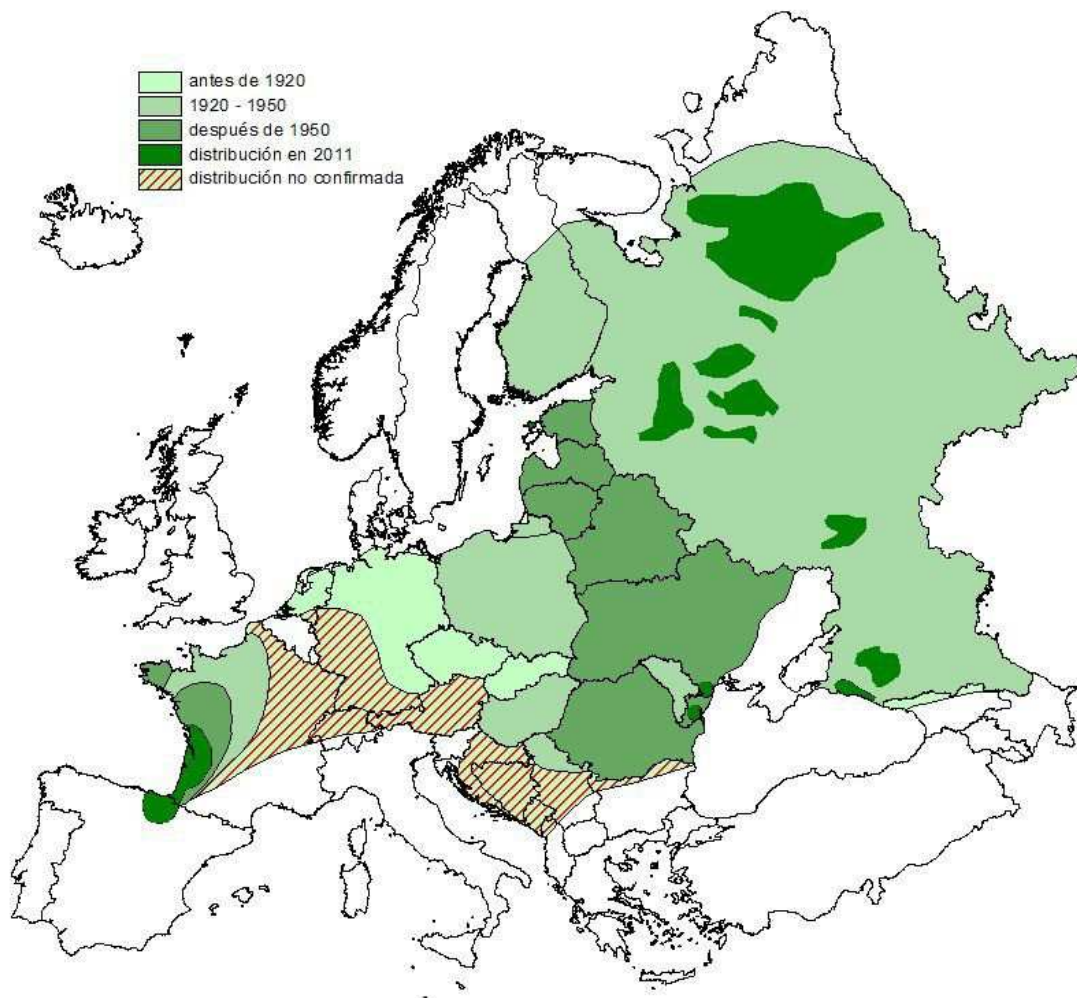


Fig. 1 Distribución original del visón europeo con los periodos principales de extinción en los diferentes países (adaptado de Youngman, 1982; Saint-Girons, 1991; Maran, 2007 y Maran *et al.*, 2011) y el área de distribución estimada en el año 2011 (adaptado de Maran *et al.*, 2011).

Desde su detección en España, la especie ha ido colonizando territorios hacia el sureste (Gómez *et al.*, 2013), al tiempo que se ha ido haciendo más escasa en la misma dirección. La población Ibérica se estimó, de forma aproximada, en menos de 500 individuos adultos en el año 2007 (Palazón y Ceña, 2007). Desde entonces el visón americano ha ocupado gran parte del área de distribución del visón europeo y actualmente la población de la especie autóctona es mucho más reducida. No se han realizado estimas poblacionales en los últimos años en el conjunto del área Ibérica de distribución, por lo que no se dispone de estimas poblacionales más actualizadas.

Actualmente está considerado como el mamífero europeo con más riesgo de extinción y una de las especies más amenazadas a nivel mundial. Está clasificado *En peligro de extinción* en el Catálogo Español de Especies Amenazada³ y *En peligro crítico* en el IUCN Red List of Threatened Species (Maran *et al.*, 2011). En España cuenta con una Estrategia de conservación (MAGRAMA, 2005) y un programa de cría en cautividad (MAGRAMA, 2009).

1.2. Causas relacionadas con el declive del visón europeo

Ninguna causa, de forma aislada, puede explicar el proceso de extinción que ha sufrido la especie desde el siglo XIX (Maran y Hentonen, 1995; Lodé *et al.*, 2001; Maran, 2007). Las causas aparentemente válidas para unas zonas no explican la desaparición de la especie en otras. La alteración del hábitat, la caza excesiva y la competencia del visón americano son posiblemente las principales causas (Camby, 1990; Saint-Girons, 1991; Rozhnov, 1993; Maran y Hentonen, 1995; Palazón y Ruiz-Olmo, 1997; Maran, 2007) y actuarían, con más o menos intensidad, según la zona y época.

La destrucción de los ecosistemas riparios en el centro y oeste y la caza excesiva en el norte y este de Europa serían causas importantes. Al disminuir sus poblaciones, y con el objetivo de mantener la industria peletera, en Rusia se intentó compensar la disminución del visón autóctono con la liberación masiva de visones americanos⁴, lo que provocó la desaparición de la especie nativa en donde no hubieran actuado las otras causas (Maran, 2007), ya sea por la

³ Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas.

⁴ Desde 1933 hasta 1971 se liberaron en Rusia 20.400 visones americanos (4.000 en el área de distribución del visón europeo) (Maran *et al.*, 2011).

competencia interespecífica o la posible introducción de enfermedades (Henttonen y Tolonen, 1983; Maran, 1989; Henttonen, 1992; Maran *et al.*, 1998b).

Aunque en muchas regiones de Europa el declive de la especie se detectó antes de la invasión del visón americano (Maran, 2007), actualmente esta especie invasora es su principal problema de conservación (Maran y Henttonen, 1995; Sidorovich, 2001b; Maran, 2007; Pödra *et al.*, 2013). No existe ningún dato que avale la coexistencia a largo plazo de las dos especies, habiendo desaparecido siempre la especie autóctona en presencia de la invasora (Maran *et al.*, 2011).

1.2.1. El visón americano

El visón americano es un mustélido semiacuático originario de Norteamérica (Larivière, 1999). Está considerado como una especie exótica invasora fuera de su área de distribución original y es la especie con más efectos negativos sobre la biodiversidad europea, afectando a 47 especies autóctonas (Genovesi *et al.*, 2012), especialmente al visón europeo, aves que crían en el suelo, roedores y anfibios (Maran *et al.*, 1998b; Sidorovich, 2001b; Macdonald y Harrington, 2003; Bonesi y Palazón, 2007; Pödra *et al.*, 2013). El Convenio de Berna recomienda su erradicación⁵ en regiones donde la especie tiene un comportamiento invasor y se realizan esfuerzos por parte de diferentes Administraciones para erradicar o controlar sus poblaciones.

El visón americano es de mayor tamaño y un 25-30% más pesado que el visón europeo. En la Península Ibérica, los machos adultos suelen pesar entre 965 y 1.500 gr. y las hembras entre 550 y 800 gr.⁶. Criado en cautividad en Estados Unidos desde 1866 con fines comerciales (Kellogg *et al.*, 1948), la especie se importó a Europa para la industria peletera desde el inicio del siglo XX (Dunstone, 1993). Desde 1920 hasta 1930 se pusieron en funcionamiento granjas peleteras de la especie en Alemania, Francia, Rusia, Suecia, Noruega, Dinamarca e Islandia. En Francia la primera granja peletera de visón americano se instaló en 1926 a partir de 15 reproductores -10 hembras y 5 machos- procedentes de Minnesota (Estados Unidos) (Henry, 1927) y en España se instalaron las dos primeras en 1958 y 1959 en Segovia y Pontevedra,

⁵ Recommendation No. 77 (1999) on the eradication of non-native terrestrial vertebrates, adopted by the Standing Committee on 3 December 1999.

⁶ Media +/- SD en animales capturados de enero a junio (n= 814 y 485 para machos y hembras, respectivamente). Datos propios inéditos.

respectivamente (Palazón y Ruiz-Olmo, 1997).

Debido a los escapes de las granjas peleteras y las liberaciones dirigidas, como las realizadas en Rusia, poblaciones salvajes de la especie invasora se establecieron en diferentes países europeos, incluyendo España (Dunstone, 1993; Ruiz-Olmo *et al.*, 1997; Bonesi y Palazón, 2007). La primera cita en España, como especie salvaje, se produjo en Segovia (Delibes y Amores, 1978) y en 1992 ya se describían cinco poblaciones aisladas (Ruiz Olmo *et al.*, 1997), que han ido incrementando su área de distribución hasta ocupar actualmente la mayor parte de la mitad norte de España (MAGRAMA, 2014). En la Fig. 2 se muestra la distribución actual aproximada de la especie así como las fechas de instalación de las primeras granjas peleteras en diferentes países.

En España diferentes administraciones públicas realizan trampeos en vivo y sacrificio de los ejemplares capturados para evitar su expansión y proteger las especies nativas (Bonesi y Palazón, 2007; Pödra *et al.*, 2013). A pesar del control iniciado hace más de 10 años, todas las poblaciones de la especie en España continúan en expansión (Bravo, 2007; MAGRAMA, 2014). Aunque existen casos en los que el control ha sido aparentemente satisfactorio (Bonesi y Palazón, 2007; Reynolds *et al.*, 2013), la especie es de muy difícil erradicación, especialmente de amplios territorios, de forma similar a lo que sucede con otros mustélidos invasores (King *et al.*, 2009).

En Europa se han descrito casos de disminuciones poblacionales de la especie invasora por causas desconocidas (Bonesi *et al.*, 2006a; Bonesi y Palazón, 2007) y en su área de distribución original se ha sugerido que los visones escapados de las granjas pueden contribuir al declive de la propia especie en la naturaleza mediante la depresión por exogamia o mediante la introducción de enfermedades (Bowman *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2009).

Actualmente se desarrolla un proyecto LIFE⁷ de conservación del visón europeo en donde uno de sus principales objetivos es mejorar el control-erradicación de esta especie exótica invasora.

⁷ Life Lutreola Spain LIFE13/NAT/ES/001171.

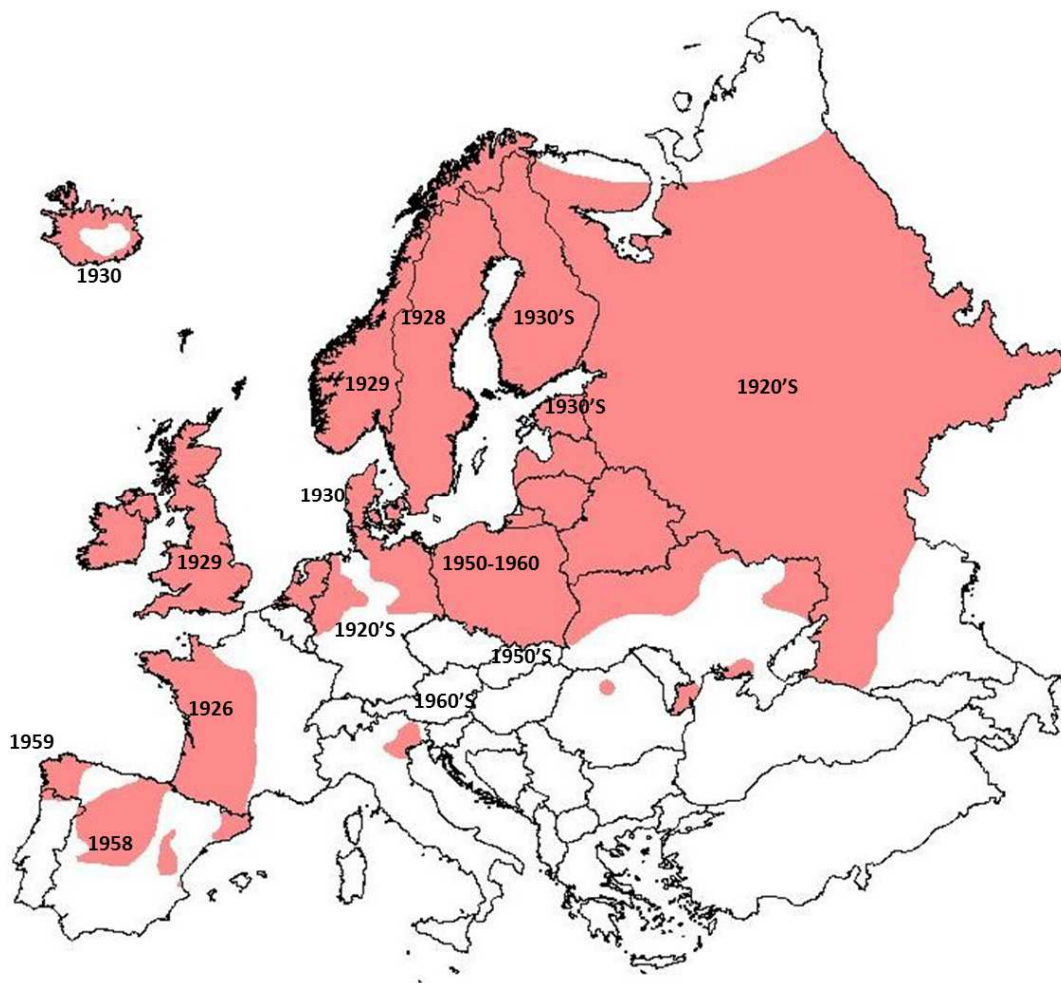


Fig. 2 Distribución del visón Americano en Europa. El año indica la primera granja de visón americano en cada territorio (adaptado de Larivière, 1999; Bonesi y Palazón, 2007; Khlyap *et al.*, 2011; Hegyeli y Kecskés, 2014; Zagorodniuk y Filienko *com. pers.*).

La especie figura en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras⁸, aunque se permite la instalación de nuevas granjas peleteras en el exterior del área de distribución del visón europeo (principalmente en Galicia, donde funcionan el 80% de las granjas peleteras Ibéricas). La especie no está incluida en la lista de especies exóticas invasoras del Reglamento Europeo 1143/2014⁹ debido a las presiones comerciales de Dinamarca y Finlandia, principales productores de visón americano (Genovesi *et al.*, 2015).

⁸ RD 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras.

⁹ Reglamento (UE) 1143/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2014 sobre la prevención y la gestión de la introducción y propagación de especies exóticas invasoras.

1.2.2. Problemas sanitarios

A excepción de los estudios parasitarios, la información relacionada con los problemas sanitarios en el visón europeo es muy limitada. En 1987 se produjo el primer y único estudio dirigido a determinar posibles problemas sanitarios transmitidos entre las dos especies de visón (Maran *et al.*, 1998b). El estudio, realizado en cautividad en el zoológico de Tallin (Estonia) y dentro de un trabajo de interacción interespecífica, pretendía detectar una posible transmisión de enfermedades entre las dos especies. El estudio consistió en alojar ejemplares de ambas especies en jaulas cercanas (51 visones europeos y 40 visones americanos, alojados en el zoológico de Tallin desde 1983) o en la misma instalación, por períodos de 15-75 minutos/día durante 34-62 días (contactos entre 8 visones europeos y 9 visones americanos). En este estudio se utilizaron animales que habían permanecido largo tiempo en cautividad y no se realizaron controles sanitarios anteriores ni posteriores. Los autores no detectaron aparentemente patologías transmitidas entre especies al no desarrollar los animales del estudio síntomas de enfermedad y al haberse reproducido posteriormente con éxito (Maran *et al.*, 1998b; Maran, 2007).

Diversos agentes patógenos se han sugerido como posibles factores de amenaza para la especie autóctona (Mañas *et al.*, 2001; Skumatov, 2001; Philippa *et al.*, 2008), siendo el Parvovirus de la Enfermedad Aleutiana del Visón (AMDV, Aleutian mink disease parvovirus) de especial interés, por su alta prevalencia en las granjas peleteras y por las características de la enfermedad: cronicidad, resistencia en el medio y múltiples vías de transmisión.

1.3. El Parvovirus de la Enfermedad Aleutiana del Visón

En 1941 se produjo en una granja peletera de Estados Unidos una mutación espontánea del color del pelaje en visones americanos. Estos visones, homocigóticos recesivos para un gen, presentaban un color similar al de los zorros de color aleutiano de las granjas peleteras y, debido a su interés comercial, fueron criados y exportados por todo el mundo.

La primera descripción del AMDV se produjo en 1956 en Estados Unidos (Hartsough y Gorham, 1956) como un síndrome crónico y mortal en visones americanos aleutianos. Pocos años después ya fue descrita en granjas peleteras de Gran Bretaña, Suecia, Dinamarca,

Alemania y Holanda (Obel, 1959; Møller y Heje, 1961).

En un primer momento se pensó que sólo los visones homocigóticos para el fenotipo aleutiano estaban afectados por la enfermedad, pero posteriores estudios comprobaron que afectaba a todos los visones (Porter y Larsen, 1964) y que el agente causal era un Parvovirus (Bloom *et al.*, 1980).

En 1982 se describió en Dinamarca un cuadro clínico diferente de la enfermedad, caracterizado por el desarrollo de una neumonía intersticial aguda con alta mortalidad en crías seronegativas infectadas durante las primeras semanas de vida (Larsen *et al.*, 1984).

El AMDV es un *Carnivore amdoparvovirus 1* incluido en la familia *Parvoviridae*¹⁰ (Cotmore *et al.*, 2014) causante de la enfermedad aleutiana (AD). Tiene un genoma de 4.8 kb con una cadena simple de ADN que codifica tres proteínas no estructurales (NS1, NS2 y NS3) y dos proteínas estructurales (VP1 y VP2). Es un virus muy alejado genéticamente de los otros parvovirus (Bloom *et al.*, 1988; Porter y Larsen, 1990; Steinel *et al.*, 2001) y, debido a sus características genéticas, puede tratarse de un virus viejo o en el que se producen alteraciones genéticas con mayor velocidad que en los otros parvovirus (Gottschalck *et al.*, 1994). Estudios realizados sobre este parvovirus demuestran que presenta un considerable grado de variabilidad y que pueden presentarse simultáneamente varios tipos de cepas víricas afectando a una granja o a un animal (Gottschalck *et al.*, 1991; Olofsson *et al.*, 1999). Existen cepas del AMDV muy virulentas (Utah, DK, Ontario) con alta mortalidad entre todos los fenotipos de visones americanos y otras (Pullman, Montana) sólo agresivas en los fenotipos de visones más sensibles. Por otro lado el visón de fenotipo similar a los animales salvajes es el más resistente a la infección mientras que el de fenotipo aleutiano es el más sensible.

En la actualidad es una enfermedad endémica en todos los países productores de visones (Aasted, 1985; Ellis, 1992; Knuutila *et al.*, 2009; 2014) y es la enfermedad infecciosa más importante en las granjas de visones de todo el mundo (Hossain-Farid *et al.*, 2010; Jahns *et al.*, 2010; Nituch *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2012).

¹⁰ <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

El virus presenta unas características que le permiten perpetuarse en la naturaleza: alta resistencia en el medio ambiente –zonas contaminadas pueden seguir siendo infectivas durante años- y múltiples vías de transmisión tanto horizontal –heces, saliva, sangre, orina - como vertical (Kenyon *et al.*, 1963b; Gorham *et al.*, 1964; 1976; Hussain *et al.*, 2014).

Además de afectar a los visones americanos se han descrito animales seropositivos, detección del virus mediante técnicas de PCR o lesiones compatibles con el AMDV en otras especies: hurones (*Mustela putorius furo*) (Kenyon *et al.*, 1966; 1978; Porter *et al.*, 1982), zorros (*Vulpes vulpes*) (Ingram y Cho, 1974), mapaches (*Procyon lotor*) (Ingram y Cho, 1974; Alexandersen *et al.*, 1985; Oie *et al.*, 1996; Hossain-Farid, 2012), armiños (*Mustela erminea*) (Kenyon *et al.*, 1978; Hossain-Farid, 2012), marta pescadora (*Martes pennanti*), marta americana (*Martes americana*) (Kenyon *et al.*, 1978), mofeta rayada (*Mephitis mephitis*) (Ingram y Cho, 1974; Kenyon *et al.*, 1978; Hossain-Farid, 2012; LaDouceur *et al.*, 2014), nutria de río norteamericana (*Lontra canadensis*), lince rojo (*Lynx rufus*) (Hossain-Farid, 2012), nutria euroasiática (*Lutra lutra*) (Wells *et al.*, 1989; Mañas *et al.*, 2001), visón europeo (*Mustela lutreola*) (Mañas *et al.*, 2001; Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004), turones (*Mustela putorius*) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004; Knuuttila *et al.*, 2015), garduñas (*Martes foina*), martas (*Martes martes*), ginetas (*Genetta genetta*) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004), comadreja (*Mustela nivalis*) (Loukopoulos *et al.*, 2012), tejones (*Meles meles*) (Knuuttila *et al.*, 2015) y humanos (Jepsen *et al.*, 2009).

1.3.1. La enfermedad en visones americanos de granja

El AMDV es el mayor problema de salud en visones americanos de granja, constituyendo la principal causa de disminución de la producción, pérdida del valor de la piel y muerte (Cho, 1978; Cho y Greenfield, 1978; Cho y Porter, 1978; Porter *et al.*, 1980; Wright y Wilkie, 1982; Ellis *et al.*, 1995; Dam-Tuxen *et al.*, 2014). Debido a las pérdidas económicas en la industria peletera se realizan campañas de saneamiento mediante serología y sacrificio de animales positivos en todos los países productores de visones, con la intención de reducir la prevalencia del AMDV (Jensen, 2011; Espregueira-Themudo *et al.*, 2012; Dam-Tuxen *et al.*, 2014). En Dinamarca, entre 3.5 y 4 millones de sueros son testados anualmente dentro del programa nacional de erradicación de la enfermedad (Dan-Tuxen *et al.*, 2014).

La gravedad de la enfermedad en animales de granja es muy variable y depende de la cepa del virus, el fenotipo del animal y de la edad en la que se produzca la infección (Hadlow *et al.*, 1983).

Existen dos formas clínicas de la enfermedad (ver Fig. 3):

a) Forma neumónica: presencia de sintomatología respiratoria con neumonía intersticial aguda y alta mortalidad. Se produce en crías sin anticuerpos maternos infectadas durante las primeras semanas de vida (Larsen *et al.*, 1984; Alexandersen, 1986; Alexandersen *et al.*, 1994) y consiste en un cuadro agudo caracterizado por una replicación viral en los pneumocitos tipo II, inclusiones virales intranucleares, edema intersticial y formación de membranas hialinas. Cepas muy patógenas producen un 90-100% de enfermedad y mortalidad en estas crías mientras que cepas poco virulentas inducen la enfermedad en el 50-70% de las crías, con una mortalidad menor (30-50%) (Alexandersen *et al.*, 1994) y,

b) Forma clásica o forma crónica: causada por una estimulación antigénica crónica con altos niveles de complejos antígeno-anticuerpo circulando que se depositan en los tejidos. Esta forma clínica presenta una evolución progresiva o no progresiva, y está caracterizada por una infección viral persistente, plasmacitosis, hipergammaglobulinemia, glomerulonefritis y arteritis mediadas por inmunocomplejos. Existen animales con un cuadro de infección inaparente (An *et al.*, 1978; Hadlow *et al.*, 1985) y otros pueden eliminar la infección (Larsen y Porter, 1975; Hadlow *et al.*, 1985), aunque, por lo general, la infección se mantiene de forma persistente hasta la muerte del animal (Eklund *et al.*, 1968; Porter *et al.*, 1969; Bloom *et al.*, 1994).

Una de las características de la forma clásica del AMDV es el incremento de las gammaglobulinas séricas (Henson *et al.*, 1961; Haas *et al.*, 1990). En visones americanos, valores superiores al 20% del total de proteínas son sugestivos de un cuadro progresivo de la enfermedad. El sistema inmune en visones infectados produce una gran cantidad de gammaglobulinas, principalmente anticuerpos específicos frente al AMDV (Porter *et al.*, 1965; Aasted y Bloom, 1984; Aasted *et al.*, 1984; Porter *et al.*, 1984; Aasted, 1985). El grado de infiltración de células plasmáticas, glomerulonefritis y arteritis es directamente proporcional a estos niveles de gammaglobulinas séricas (Kenyon *et al.*, 1963a; Porter y

Larsen, 1964). An e Ingram (1977) detectaron que todos los visones con concentraciones de gammaglobulinas superiores al 25% tenían cambios patológicos típicos del AMDV. Los tratamientos inmunosupresores previenen el desarrollo de lesiones mientras que la vacunación aumenta la gravedad de la infección.

Animales con un cuadro clínico no progresivo presentan títulos bajos de anticuerpos, no presentan hipergammaglobulinemia o es muy ligera y no presentan lesiones patológicas (Porter, 1986). Una reinfección en estos animales puede provocar el desarrollo de un cuadro progresivo (An *et al.*, 1978). Así mismo, animales con un cuadro no progresivo pueden también transmitir el virus tanto vertical como horizontalmente y producir un cuadro progresivo en otro animal (An e Ingram, 1978).

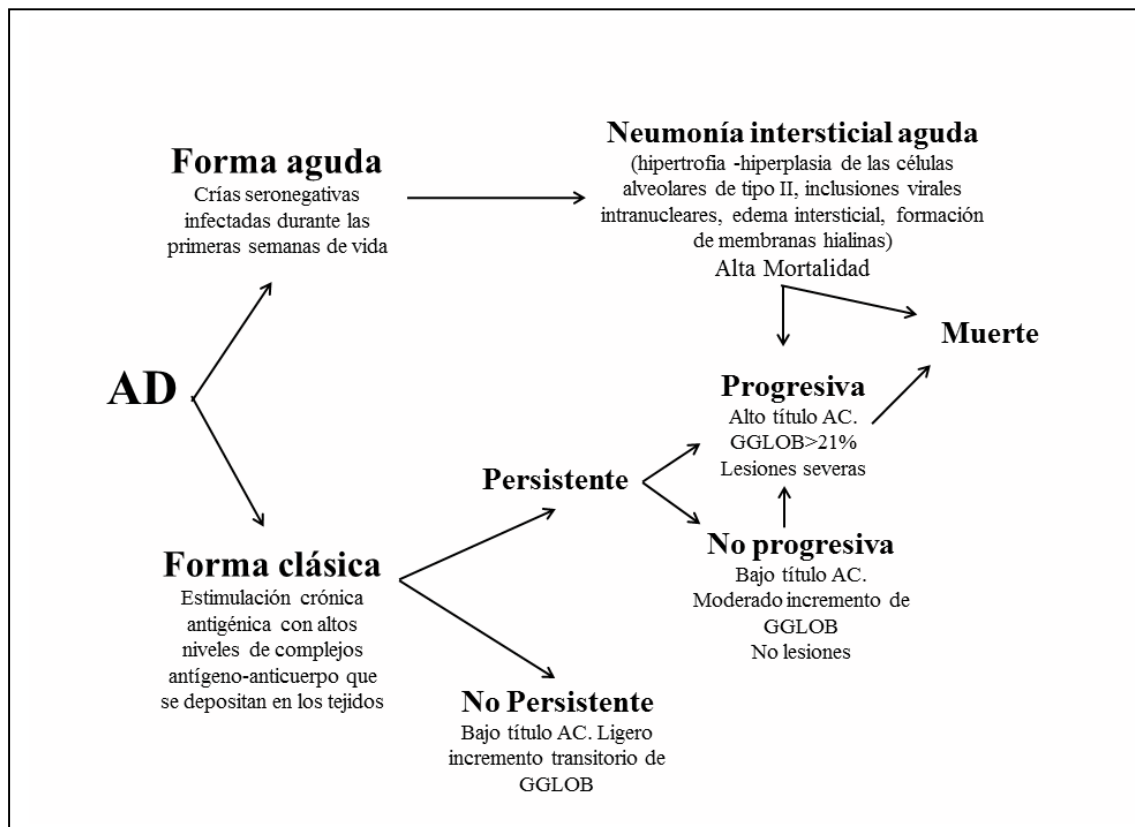


Fig. 3 Evolución clínica de la Enfermedad Aleutiana (AD) en visones americanos de granja.
AC: Anticuerpos; GGLOB: Gammaglobulinas.

En animales infectados experimentalmente, se ha recuperado el virus trascurridos más de siete años desde la infección (Porter y Larsen, 1974). El grado de hipergammaglobulinemia depende de la dosis de virus inoculada (Porter y Larsen, 1968) y, posiblemente, una carga baja de virus tendería a provocar una infección no progresiva (Aasted y Hauch, 1988).

Se ha descrito el papel de las granjas de visón americano como fuentes de transmisión del AMDV a los animales salvajes (Nituch *et al.*, 2011) mientras que en otro estudio esta correlación no está clara, ya que se detectó mayor prevalencia en visones americanos salvajes en zonas sin granjas peleteras que en zonas con granjas (Knuuttila *et al.*, 2015).

1.3.2. El control de la enfermedad en visones americanos de granja

El control del AMDV en las granjas de visones americanos es difícil al no producir, normalmente, mortalidades masivas en poco tiempo, presentar una sintomatología variable y poco específica, y por el sacrificio de los animales, para la obtención de pieles, antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad.

No existen tratamientos efectivos ni vacunas para prevenir la infección. Los programas de erradicación se basan en la realización de *screenings* serológicos y sacrificio de los animales positivos, medidas sanitarias estrictas, desinfección de instalaciones y equipos y obtener la reposición de granjas negativas (Cho e Ingram, 1972; Cho y Greenfield, 1978; Cho y Porter, 1978; Porter y Cho, 1980; Porter, 1986; Porter y Larsen, 1990; Ellis *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 2014; Hossain-Farid *et al.*, 2015).

La prueba diagnóstica de referencia es el *counter-current immunoelectrophoresis* (CIEP test), utilizado en las campañas de saneamiento desde la década de 1970 (Cho e Ingram, 1972). En visones de granja el CIEP test tiene una sensibilidad que varía del 78.7% al 98.9% y una especificidad del 86-100% (Bowman *et al.*, 2014; Knuuttila *et al.*, 2014; Dam-Tuxen *et al.*, 2014). Desde el año 2014 se tiende a sustituir el CIEP como test estándar por una técnica ELISA, que presenta sensibilidad y especificidad similar al CIEP test (valor kappa del 0.976), pero que permite un manejo de las muestras más sencillo, un tiempo de procesado menor y una disminución de los costes de laboratorio debido a que la técnica ELISA puede ser automatizada mientras que el CIEP test implica más trabajo manual y no es adecuada para automatizar (Dam-Tuxen *et al.*, 2014; Knuuttila *et al.*, 2014).

1.3.3. Estudios sobre el AMDV en el visón americano en el medio natural

Se han realizado estudios específicos sobre la prevalencia del AMDV en visones americanos

salvajes, tanto en su área de distribución original como en las zonas donde la especie no es nativa (ver citas en Tabla 2). El objetivo de estos estudios ha sido valorar el riesgo de reinfección de las granjas que realizan campañas de saneamiento, la interacción sanitaria entre poblaciones libres y cautivas, así como los estudios derivados de los programas de conservación del visón europeo.

Un resumen de los resultados obtenidos en visones americanos en el medio natural figura en la Tabla 2. En todas las zonas estudiadas se ha detectado la presencia del AMDV, con prevalencias muy diferentes según los territorios.

1.3.4. Estudios sobre el AMDV en el visón europeo

Desde la primera detección del AMDV en el visón europeo (Mañas *et al.*, 2001), la monitorización de la enfermedad en esta especie se consideró necesaria para su conservación y se incluyeron extracciones de muestras sanguíneas y serologías de rutina en los protocolos de los trabajos de campo que implicaran la captura y manejo de ejemplares.

El primer caso en visón europeo se detectó en una carcasa procedente de Álava. Mediante PCR y secuenciación genética se determinó que la cepa vírica no se correspondía con las otras cepas del virus descritas anteriormente: cepa denominada ADV-ES (Andres ML1) con número de sumisión en el GENBANK: AF 205380 (Mañas *et al.*, 2001). Por un lado era la primera vez que se detectaba el virus en la especie y por otro era la primera vez que se detectaba esta nueva cepa vírica. La ausencia de lesiones patológicas atribuibles al virus en la necropsia de este visón europeo hacía difícil extrapolar los posibles efectos del virus –y en concreto de esta cepa- sobre la especie.

Posteriormente, se determinó una seroprevalencia del AMDV en Francia del 12% (n=99) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004) y en un estudio realizado en Navarra no se detectaron animales seropositivos en 84 muestras procesadas (Sánchez-Migallón *et al.*, 2008). Así mismo se realizaron pruebas serológicas a cuatro visones europeos capturados en el delta del río Danubio (Rumanía), siendo todos ellos seronegativos (Mañas, 2005).

En relación a la detección del AMDV en visones europeos en cautividad se analizaron un total

de 36 ejemplares correspondientes a los animales del programa de cría de la población oriental de la especie (zoológico de Tallin, Estonia, principalmente) sin detectarse animales seropositivos en esta población (Mañas, 2005). En el programa de cría en cautividad de la población occidental se incluyó en el protocolo de cuarentena la realización de serologías, siendo necesario un resultado negativo al AMDV en dos controles para su incorporación como fundadores al programa de cría (Mañas *et al.*, 2003; MAGRAMA, 2009). Hasta la fecha no se ha detectado ningún visón europeo positivo en cautividad ni en el programa de cría de la población oriental ni en la occidental.

Respecto a la valoración de las lesiones compatibles con el AMDV en carcasas es difícil su estudio en animales salvajes por la escasez de muestras bien conservadas. En un trabajo realizado en 2001 para el Ministerio de Medio Ambiente (Mañas, 2001), se procesaron muestras de un total de 25 visones europeos procedentes de España (n=8), Francia (n=9) y Rusia (n=8). De todas ellas, sólo en cinco muestras procedentes de España se pudieron valorar las lesiones y en cuatro de ellas existían lesiones, compatibles en mayor o menor grado, con las producidas por el AMDV –hiperplasia de células plasmáticas, infiltraciones linfoplasmocitarias, nefritis linfoplasmocitarias, amiloidosis de órganos linfoides-. Sánchez-Migallón (2008) no detectó lesiones compatibles con AMDV en ninguna de las 23 carcasas de visón europeo procesadas procedentes de Navarra.

Se realizaron pruebas de PCR en un total de 153 muestras de carnívoros semiacuáticos (Mañas, 2001). De éstos, 111 procedentes de las áreas de distribución del visón europeo: 41 procedentes de España (8 visones europeos, 21 visones americanos, 8 turones europeos y 4 nutrias euroasiáticas *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758), 22 de Francia (9 visones europeos, 8 americanos y 5 turones) y 48 muestras de Rusia (8 visones europeos, 19 americanos y 21 turones) y 42 (14 visones americanos, 6 turones y 22 nutrias) procedentes del exterior del área Ibérica de distribución del visón europeo. Se detectó la presencia del virus por PCR en todas las especies y en todas las procedencias (Fig. 4).

En este estudio se realizó el análisis de la secuencia del DNA de todas las muestras positivas en PCR usando los primers 54.47 F y 68.49 R. Secuencias de pobre calidad o demasiado cortas imposibilitaron la obtención de secuencias en todos los animales. Para la realización de comparaciones, sólo se utilizaron secuencias con más de 200 amino ácidos.

Se obtuvieron secuencias de AMDV presentes en 25 animales: visón europeo (7), visón americano (13), turón europeo (4) y nutria euroasiática (1), no existiendo una segregación obvia de las cepas basada en las especies infectadas (Fig. 5).

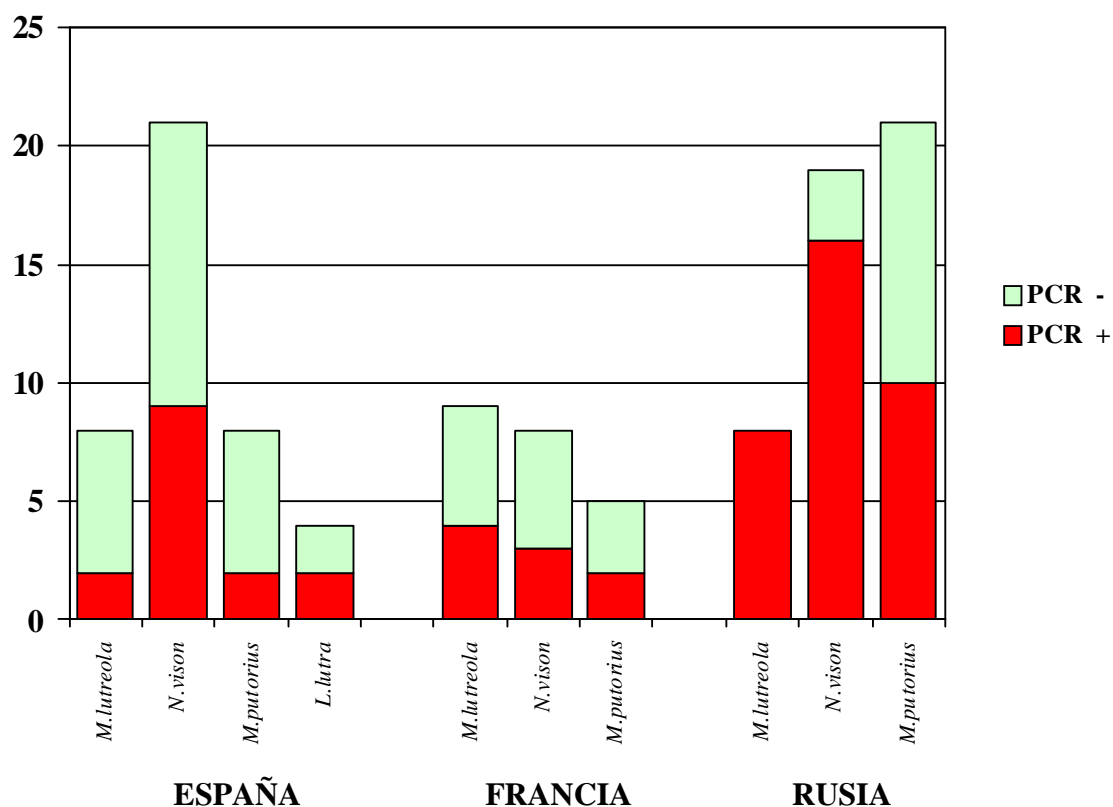


Fig. 4 Resultado de las PCR en las carcasas procedentes de las diferentes áreas de distribución del visón europeo (adaptado de Mañas, 2001).

Al comparar las secuencias obtenidas, parece existir varios grupos mayores (Fig. 6)

- Grupo 1: En él están las cepas españolas, francesas y algunas cepas rusas. Es el grupo con la distribución más amplia.
- Grupo 2: Incluye sólo cepas rusas.
- Grupo 3: Engloba PVP2ZK8 y la cepa ADV-ES (Andrés ML1), detectada en el visón europeo procesado anteriormente (Mañas *et al.*, 2001).
- ADV-Utah aparece en un grupo independiente.

Estos resultados limitados indican que existen al menos 3 Grupos principales de AMDV entre los Carnívoros riparios europeos y que las diferentes especies estudiadas presentan virus similares.

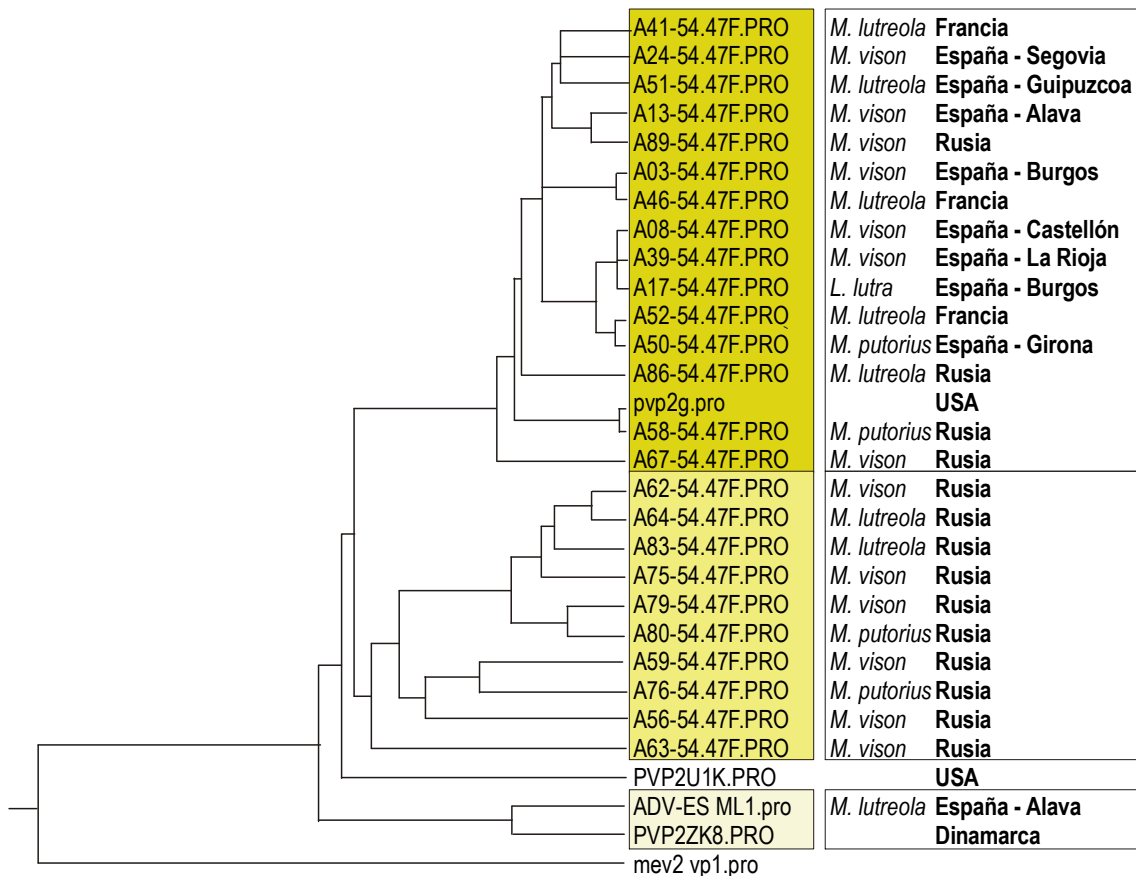


Fig. 6 Relaciones genéticas entre las diferentes cepas de AMDV obtenidas (adaptado de Mañas, 2001).

Las secuencias obtenidas permiten la clasificación pero no permiten predecir la virulencia específica de cada cepa de AMDV.

1.3.5. Posibles efectos del AMDV sobre el visón europeo

No existe información sobre los posibles efectos del AMDV en el visón europeo y éste es uno de los principales retos del presente estudio. En relación a la mortalidad directa, el AMDV podría provocar declives de las poblaciones de Mustélidos al disminuir la fertilidad y producir abortos (Padgett *et al.*, 1967; Haagsma, 1969; Gorham *et al.*, 1976; Hansen y Lund, 1988). Se desconoce si otras especies diferentes al visón americano pueden presentar el cuadro clínico agudo con alta mortalidad en crías no protegidas por anticuerpos maternos infectadas durante las primeras semanas de vida. También se puede especular con una posible mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas secundarias como ocurre en los visones americanos (Kenyon, 1966; Cho e Ingram, 1972; Martino y Martino, 1996) debido a la alteración del

sistema inmunitario. Extrapolando a los visones europeos unos efectos similares a los que presentan los visones americanos, existen diferentes vías por las cuales el AMDV puede afectar a la especie autóctona.

2. Objetivos

El principal reto del presente estudio es determinar posibles efectos negativos del AMDV sobre el visón europeo y su posible influencia en su estado de conservación, así como valorar las estructuras demográficas de tres especies de Carnívoros semiacuáticos similares en talla, peso, morfología, ecología y comportamiento, pero con diferente estado de conservación. Además, en el visón americano se utilizarán estas estructuras demográficas para monitorizar el éxito de los trabajos de control de esta especie exótica invasora.

En breve, los objetivos principales que pretende el presente estudio son:

-Determinar la presencia del Parvovirus de la Enfermedad Aleutiana del Visón (AMDV) en el visón europeo y sus posibles efectos en la conservación de la especie.

-Conocer la seroprevalencia del AMDV en las poblaciones Ibéricas de visón europeo y americano. En visón americano, determinar la seroprevalencia en las diferentes clases de edad.

-Establecer la incidencia de infección por AMDV en el visón europeo mediante el análisis de animales recapturados.

-Determinar la estructura demográfica del visón europeo, el visón americano y el turón europeo, para poder comparar sus estrategias demográficas y el impacto de éstas en su relación de competencia.

-Valorar si se produce un efecto en las estructuras demográficas en tres poblaciones diferentes de visón americano sometidas a diferentes intensidades de control, e identificar un indicador simple y eficiente para valorar el éxito de estos trabajos.

Área de estudio

El área de estudio comprende la totalidad de la Península Ibérica, si bien se ha priorizado la zona de distribución o influencia del visón europeo, a caballo entre la Europa atlántica y la mediterránea, que comprendería principalmente el cauce del río Ebro y sus afluentes, desde la desembocadura del río Oña, en Burgos, hasta su entrada en Aragón, así como las cuencas Cantábricas del País Vasco y las cabeceras de ríos de la cuenca del Duero en Burgos y Soria que limitan con La Rioja. Para consultar las características climáticas y de hábitat de la zona de estudio se puede consultar el estudio de Metzger *et al.*, (2005).

Estudios incluidos

En el presente trabajo se han estudiado dos especies de mustélidos que comparten un mismo hábitat ripario; el visón europeo, autóctono, en peligro de extinción y objeto de los esfuerzos de conservación, y el visón americano, especie exótica invasora fuera de su hábitat original y posible origen y transmisor del AMDV. Estas dos especies comparten hábitat y determinadas patologías con otras dos especies de Mustélidos; el turón europeo y la nutria euroasiática. El turón europeo es muy similar genéticamente al visón europeo y se puede hibridar con él y la nutria, debido a su mayor territorio vital y movimientos puede tener un papel destacado en la difusión de diferentes patologías. Por ello, en diferentes apartados se han incluido muestras de estos otros dos Mustélidos.

Todo el material analizado se ha obtenido de forma complementaria a los trabajos impulsados por las distintas administraciones en el marco de la Estrategia para la Conservación del Visón Europeo (MAGRAMA, 2005), por lo que no se han realizado trampeos específicos para la obtención de muestras. Se trata de un estudio oportunista en lo que a obtención de muestras se refiere, lo que implica una serie de limitaciones pero al mismo tiempo una serie de ventajas teniendo en cuenta el diferente estatus de protección y grado de amenaza del visón europeo.

El presente trabajo se apoya en cuatro estudios diferentes, dos relacionados principalmente con

el AMDV y dos basados en estudios demográficos.

El primer estudio (Apartado 3.1) hace referencia a la primera detección, mediante serología y técnicas de PCR, del AMDV en el visón europeo. La cepa vírica detectada en la especie no se correspondía a ninguna otra descrita anteriormente. Hasta la fecha no se habían realizado serologías ni estudios del AMDV en el visón europeo, ni en el medio natural ni en ejemplares cautivos. El segundo (Apartado 3.2) hace un análisis de las seroprevalencias obtenidas en visón europeo y americano durante el periodo 1997-2012 en España. La recaptura de ejemplares ha permitido determinar la incidencia del AMDV en el visón europeo y, en el visón americano, determinar la prevalencia en las diferentes clases de edad.

El tercer estudio (Apartado 3.3) describe la estructura demográfica básica de las dos especies de visón y del turón europeo para poder comparar sus estrategias demográficas y el impacto de éstas en su relación de competencia. La estructura de edades de poblaciones de visón americano sometidas a control puede variar en función del método, la intensidad y la duración de las capturas (Withman, 2003). En este contexto, el último estudio (Apartado 3.4) se centra en determinar los posibles cambios demográficos en tres poblaciones de visón americano sometidas a diferente intensidad de control para valorar el posible efecto del trampeo.

En breve, la determinación de las edades en carcasas de carnívoros semiacuáticos se ha utilizado para: a) realizar una correlación con el resultado serológico del AMDV en visón americano, b) determinar los parámetros demográficos básicos de tres especies de carnívoros semiacuáticos y c) en visón americano, determinar en tres poblaciones distintas los posibles efectos en la demografía en función de la presión de trampeo y determinar un método simple y eficiente para monitorizar los resultados obtenidos en el control de la especie invasora.

En la Tabla 1 figuran las muestras obtenidas y los estudios realizados con cada una de ellas. En los visones americanos se analizaron muestras sanguíneas obtenidas antes del sacrificio de los animales así como las muestras obtenidas durante las necrópsias de los mismos.

Especie	Tipología	Origen muestras	Estudios realizados
Visión Europeo	Animales vivos	Estudio distribución en toda su área. Estudios periódicos en ríos seleccionados. Trampeos captura fundadores programa de cría. Captura accidental en trampeos de visón americano.	492 serologías AMDV en 410 visones europeos diferentes. Estudio prevalencia (n= 475) e incidencia (59 animales recapturados)
	Animales muertos	Atropellos (37) Otras causas: Enfermedad (6), No determinado (6), Ahogado (3), Depredación (2)	Estructura demográfica (n=54)
Visión Americano	Animales vivos (pre sacrificio)	Captura en los programas de control como especie exótica invasora	Prevalencia AMDV (1.735 serologías)
	Animales muertos	Capturados (1.614) Atropellos (37) Otras causas: No determinado (6), Depredación (2), Enfermedad (2), Ahogado (1), Agresión (1)	Estructura demográfica (n=1.661) Valoración estado reproductivo en 27 hembras capturadas en abril Valorar la demografía en tres poblaciones bajo control (n= 1.306)
Turón europeo	Animales muertos	Atropellos (45) Otras causas: Perros (2), No determinado (2), Enfermedad (1), Ahogado (1)	Estructura demográfica (n=51)

Tabla 1 Resumen de las muestras incluidas en el presente estudio. Período 1997-2012.

3.1. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain

Introduction

The European mink (*Mustela lutreola*) is one of the most threatened terrestrial mammals in the world (Schreiber *et al.*, 1989; Camby, 1990; Saint-Girons, 1991). Although these animals were once widely distributed throughout Europe (Youngman, 1982), their distribution is now restricted to a small fraction of their historic range. The remaining populational nuclei, which are isolated and distant from each other, are situated in eastern Europe, southern France and northern Spain.

Several factors have been implicated in the dramatic decline of this mustelid throughout Europe (Camby, 1990; Saint-Girons, 1991; Rozhnov, 1993; Maran and Henttonen, 1995; Palazón and Ruiz-Olmo, 1997). These include the loss of habitat, excessive hunting and trapping, pollution, and interspecies competition by the larger American mink (*Mustela vison*). Nevertheless, according to currently available data, none of these factors alone can explain the decline of the native species (Maran and Henttonen, 1995).

With regard to the introduction of the American mink, both interspecies competition (Maran, 1989; Maran *et al.*, 1998b) and the possible introduction of exotic diseases have been cited as possible causes for declines (Henttonen and Tolonen, 1983; Henttonen, 1992). American mink have been raised on commercial European mink farms since the start of the twentieth century. Both accidental escape and deliberate release of these animals has led to substantial feral American mink populations throughout Europe (Dunstone, 1993). The American mink have negatively affected the European mink as a result of competition (Sidorovich, 1992; Maran *et al.*, 1998b), although in many areas the decline of native mink was evident prior to the arrival of the exotic species.

A similar situation exists in Spain. Since the first demonstration of American mink as a wild species in the Iberian Peninsula in 1978 (Ruiz-Olmo *et al.*, 1997), the number of existing wild American mink populations in Spain has expanded widely (Ruiz-Olmo *et al.*, 1997). Because the present range of the European mink is so limited, the presence of American mink farms and the abundance of these animals in the wild pose definite risks to continued

survival of the native species.

One risk that the exotic American mink poses is the introduction of infectious diseases or strains of infectious agents that are particularly deleterious to the European mink. Among these infections, Aleutian mink disease parvovirus (ADV) is of particular interest because of its high prevalence on fur farms and because of its characteristics. ADV is highly persistent in the environment (Hansen, 1985). Disease may be spread by asymptomatic carriers, and transmission can be both horizontally, by urine, feces, saliva and vertically (Kenyon *et al.*, 1963b; Gorham *et al.*, 1964; Gorham *et al.*, 1976).

In American mink, ADV can cause different syndromes, depending on host factors, such as age and genotype, and the virulence of the viral strain (Bloom *et al.*, 1994). It produces acute, usually fatal, interstitial pneumonia in seronegative neonatal American mink (Alexandersen *et al.*, 1994; Bloom *et al.*, 1994). The classic form of Aleutian disease is characterized by persistent viral infection, the development of plasmacytosis, hypergammaglobulinemia, and immune complex-mediated glomerulonephritis and arteritis in adult mink (Porter, 1986; Bloom *et al.*, 1994). In addition, some animals can have an inapparent infection (An *et al.*, 1978; Hadlow *et al.*, 1985) while others can clear the infection (Hadlow *et al.*, 1985), although it is uncertain if this is a consequence of host factors or the particular isolate of infecting virus (Fox *et al.*, 1999). In addition to direct mortality, ADV infections can lead to population declines by causing a decrease in fertility and spontaneous abortions (Padgett *et al.*, 1967; Haagsma, 1969; Gorham *et al.*, 1976; Hansen and Lund, 1997). In brief, there are a number of ways in which ADV could lead to population declines.

In spite of the fact that ADV infections are so widespread on mink ranches and in ferret populations worldwide (Hansen, 1985; Welchman *et al.*, 1993), information concerning the impact of ADV on related species is limited. It has been suggested that a number of mustelids, including short-tailed weasel (*Mustela erminea*), fishers (*Martes pennanti*), marten (*Martes americana*), and otters (*Lutra canadensis*) can be infected with ADV and serological evidence for infection in striped skunk (*Mephitis mephitis*), raccoons (*Procyon lotor*), wild American mink and foxes (*Vulpes vulpes*) has been detected (Ingram and Cho, 1974; Kenyon *et al.*, 1978; Alexandersen *et al.*, 1985). Furthermore, a role for American raccoons in the transmission of virus has been suggested (Oie *et al.*, 1996) and viral DNA

sequences have been identified in feral American raccoons and striped skunks (Oie *et al.*, 1996). To our knowledge, data does not exist on the prevalence of ADV in wild, riparian carnivores in the Palearctic region, although in one study its presence was suspected in a wild Eurasian otter (*Lutra lutra*) (Wells *et al.*, 1989). Therefore, the knowledge of the prevalence and effects of this disease in a threatened species like the European mink, and in other riparian carnivores such as the Eurasian otter and the European Polecat (*Mustela putorius*), may be of importance for their conservation.

Material and Methods

Serum samples were collected from 12 European mink (nine adults and three subadults) trapped at La Rioja (seven), Alava (two), Burgos (two) and Soria (one) and 16 American free-ranging mink (11 adults and five subadults) trapped at Segovia (nine), Alava (three), Madrid (one), A Coruña (one), Girona (one) and Castellón (one). The animals were captured between November 1997 and November 1999 in 20 x 20 x 60 cm wire cage traps (home-made), and injected intramuscularly with an anesthetic combination of Ketamine hydrochloride (Imalgène 1000, Merial, Lyon, France) with xylazine hydrochloride (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Germany) or medetomidine hydrochloride (Domtor, Orion Corporation, Espoo, Finland). Blood samples were collected by jugular venipuncture or by toenail cutting into heparinized and non-heparinized capillary tubes. After the animals had recovered from anesthesia, they were released. Serological evidence of ADV infection was evaluated by counter immune electrophoresis (CEP) using a commercial test antigen (United Vaccines, Inc. Madison, Wisconsin, USA) (Bloom *et al.*, 1975; Oie *et al.*, 1996). The presence of elevated serum gamma globulins was assayed by serum protein electrophoresis (Bloom *et al.*, 1975). Technical considerations (small volume of serum, broken capillary tubes, serum hemolysis) made it impossible to perform CEP endpoint determinations by testing serial dilutions or to do both CEP and serum protein electrophoresis in every case. Nevertheless, the presence of a positive CEP reaction under the conditions we have employed is considered diagnostic of ADV infection (Bloom *et al.*, 1975; Oie *et al.*, 1996). No samples of blood or tissue from live captured animals were available for DNA studies.

Carcasses from one adult Eurasian otter from Lugo, one adult European mink from Alava and five American mink (four adults and one subadult) from Madrid (two), Burgos (one),

Segovia (one) and A Coruña (one) were available for study. Serological analysis had previously been completed on two of the American mink. Organ samples from kidney, lungs, spleen, mesenteric lymph node, liver, heart, intestine and muscle were submitted for pathological study to determine if lesions characteristic of ADV infection were present.

Samples of spleen, mesenteric lymph node, liver and kidney from each animal were pooled and whole cell DNA was isolated (Oie *et al.*, 1996). Polymerase chain reaction (PCR) was done on an aliquot of DNA from each animal as previously noted (Oie *et al.*, 1996; Bloom *et al.*, 1997). The ADV DNA product from positive PCR reactions was sequenced; this segment contains the hypervariable region of the VP2 capsid protein gene (Oie *et al.*, 1996). Because the overall length of VP2 for the Spanish ADV samples was not known, it was not possible to assign residue numbers that correspond to the other sequences. Therefore, the first amino acid is numbered "1". The predicted amino acid sequences were compared with that published for other American and European ADV isolates (Oie *et al.*, 1996; Schuierer *et al.*, 1997), as well as an isolate of ADV derived from ferrets (ADV-Ferret) (Saifuddin and Fox, 1996). We have denoted the Spanish ADV as ADV-ES. The GENBANK Submission numbers for the ADV-ES sequences are AF 205380, AF 205381, AF 205382.

Results

Counterimmunoelectrophoresis (CEP) was performed on 14 of the 16 serum samples obtained from American mink. None of these sera gave a positive reaction for antibody to ADV. In addition, 15 of 16 of these animals had gamma globulin levels <20% of the total serum proteins (mean=6%, range = 3-15%).

One American mink, captured near Segovia in August, 1999, had a gamma globulin level of 27%. This value is consistent with progressive ADV infection (Bloom *et al.*, 1975; Oie *et al.*, 1996); however, there was insufficient serum to perform CEP on this animal. Consequently, it was not possible to state with certainty if this animal were infected with ADV.

CEP also was performed on nine of 12 serum samples obtained from free-ranging European mink. Three of these samples were positive for antibody to ADV (one adult and two subadult) trapped at La Rioja (two) and Burgos (one).

None of 11 European mink serum samples performed had gamma globulin levels suggestive of progressive ADV infection (mean= 13%, range=6–20%). The ADV positive mink all had levels < 13%.

Carcasses from seven animals were available for study: five American mink, one European mink and one Eurasian otter. Two of the American mink had previously tested negative for ADV by CEP. Microscopic lesions consistent with AD were observed only in a solitary feral American mink (Colas MV2), road-killed near Madrid in September, 1998. This animal had glomerulonephritis and plasma cell proliferation with infiltration into liver, spleen, kidney and mesenteric lymph node. None of the other animals had pathological evidence of AD.

ADV sequences were detected by PCR in whole cell DNA from four animals: two American mink (ADV-ES(MV1) and ADV-ES(Colas MV2)), including the one with microscopic changes consistent with AD, one European mink (ADV-ES(Andres ML1)) and a Eurasian otter (ADV-ES(LL6)) (Oie *et al.*, 1996). Thus, four of the animals were infected with ADV but only a single mink had microscopic changes of typical disease.

In order to compare the sequence of the VP2 capsid gene of the Spanish ADV (ADV-ES) with the corresponding segment of other ADV isolates, PCR products were purified and DNA sequenced. The amplified portion of the gene contains sequence encoding the hypervariable region of the VP2 capsid protein (Bloom *et al.*, 1988). Although the hypervariable region sequence does not correlate with virulence or pathogenicity, it is a useful tool in identifying different isolates of ADV (Oie *et al.*, 1996; Saifuddin and Fox, 1996; Bloom *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 1999). Sequence information was obtained for virus from three animals: a European mink (Andres ML1), an American mink (Colas MV2), and the Eurasian otter (LL6); the Colas MV2 mink had lesions characteristic of ADV on pathological study. Comparison of the predicted amino acid sequences suggested that the Eurasian otter (LL6) and the American mink (Colas MV2) were infected with the same virus. However, the sequence of the ADV-ES obtained from the European mink (Andres ML1) was different (Fig. 7).

The ADV-ES sequences also were compared with the corresponding sequences from a

number of American ADV isolates (ADV-G, ADV-TR, ADV-Utah, ADV-Pullman), a Danish isolate (ADV-DK(zk8)), and ADV-Ferret (Gottschalk et al., 1991; Oie et al., 1996; Saifuddin and Fox, 1996). The ADV-SL3 isolate from Germany has a sequence identical to ADV-G in this study (Schuierer et al., 1997). None of the Spanish sequences were identical to those reported for other ADV isolates. However, the LL6 and the Colas MV2 ADV-ES sequences shared a ---QXQLEWTGT--- motif present in the hypervariable region of the Danish isolate of ADV and most pathogenic American isolates (Oie et al., 1996). The Andres ML1 shared only four residues in the hypervariable region, and thus appeared distantly related to any of the described isolates. None of these ADV appeared similar to the ADV-Ferret sequence (Saifuddin and Fox, 1996).

Discussion

In this study we have identified the presence of ADV in free-ranging, riparian carnivores in Spain. It was not possible to define a role for ADV infections in the population declines of the European mink. However, our results suggested that ADV infections are present among free-ranging riparian carnivores in Spain. Consequently, continued investigations are warranted on both European and American mink, Eurasian otters, and also related species like the European polecat (*Mustela putorius*). Additional surveys on both live captured and dead animals will provide a more accurate assessment of ADV infection in the wild populations at risk.

Neither of the two different sequences types of ADV in Spain appeared identical to other isolates reported in Europe or in North America (Fig. 7) (Gottschalk et al., 1991; Oie et al., 1996; Saifuddin and Fox, 1996; Schuierer et al., 1997). This finding suggested that the Spanish ADV did not derive from a previously described isolate. We plan to obtain ADV samples from other areas of Europe and make comparisons of the DNA sequences. This information will enable us to assess the spectrum of ADV in Europe and perhaps to derive a phylogenetic tree.

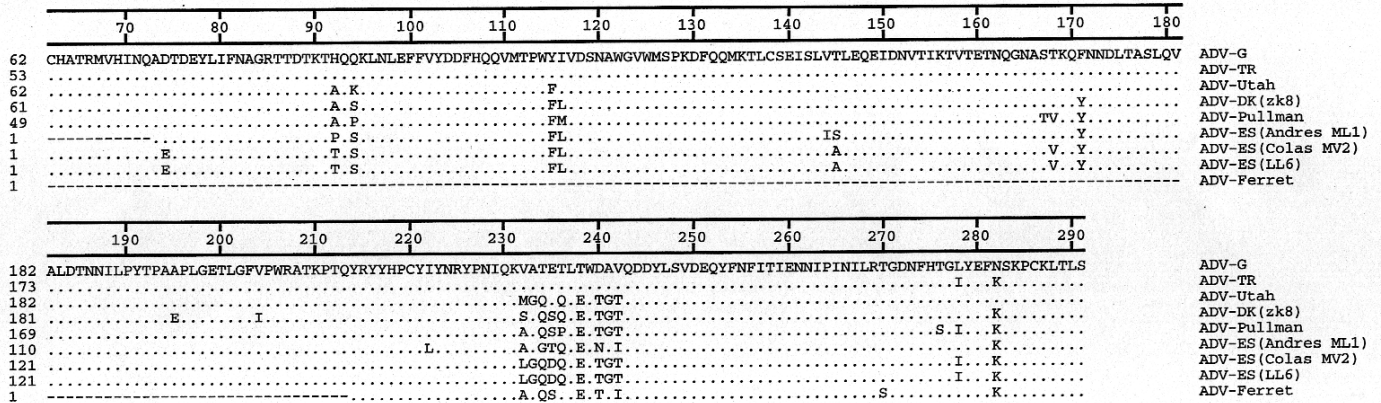


Fig. 7 Comparison of Spanish Aleutian mink disease parvovirus (ADV) VP2 capsid gene sequences with American and European ADV isolates. The translated amino acid sequences from ADV-ES (Colas MV2), ADV-ES (Andres ML1), and ADV-ES (LL6), were aligned with the corresponding VP2 regions from ADV-G, ADV-TR, ADV-Utah, ADV-Pullman, ADV-DK (zk8) and ADV-Ferret using the Megalign module of DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). The residue numbers above the alignment refer to the ADV-G VP2 coordinates and hypervariable region comprises ADV-G VP2 residues 231 to 242.

Recent studies have shown that the pathogenicity of ADV is in part determined by virally encoded determinants in the capsid protein between amino acids 341 and 590 of VP2 (Bloom et al., 1998; Fox et al., 1999). The limited sequence obtained for the two Spanish viruses did not include this region of VP2 (Fig. 7). Consequently, it was not possible to speculate upon their pathogenicity based on the DNA sequence. However, the animal infected with ADV-ES (Colas MV2) had pathology consistent with progressive Aleutian disease, suggesting that this virus had pathogenic potential.

Adult mink can be persistently infected with certain types of ADV, develop anti-viral antibody, and still not develop evidence of progressive disease (An et al., 1978; Hadlow et al., 1984; Bloom et al., 1998; Fox et al., 1999). It is unknown if subtle infections like this lead to reduced reproductive success, interstitial pneumonitis in mink kits, or could cause population declines.

The origin of the ADV infecting the animals is uncertain. Since ADV is common on commercial mink farms, diligence is required to insure that infectious virus does not enter the environment from these operations (Hansen, 1985). Therefore, it is imperative to institute adequate ADV sanitation programs on fur farms and also to establish measures to prevent animals from escaping. In addition, procedures should be developed to disinfect animal remains after pelting.

Finally, a major goal of conservation programs is the restoration and reintroduction of threatened native species. This will necessitate use of captive breeding or translocation. In order to avoid contamination of these facilities and subsequent introduction or spread of infection, strict protocols will have to be developed and monitored.

3.2. Prevalence of antibody to Aleutian mink disease virus in European mink (*Mustela lutreola*) and American mink (*Neovison vison*) in Spain

Introduction

The European mink (*Mustela lutreola*) is a riparian mustelid species that has suffered a dramatic population decline during the 20th Century (Youngman 1982; Maran 2007). This native species is considered one of the most endangered mammals and is listed as critically endangered in the International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species (Maran et al. 2011). The species survives in less than 15% of its original range in three isolated populations: NW Russia, Romania/Ukraine, and France/Spain (Maran et al. 2011). The Spanish population was estimated at <500 adults (Palazón and Ceña 2007).

The American mink (*Neovison vison*) is a semiaquatic mustelid native to North America, with a similar body size. In Europe, the species became established and widespread during the 20th Century after accidental and deliberate releases from fur farms (Dunstone 1993; Bonesi and Palazón 2007). The introduction and expansion of the feral North American mink has had negative effects on the European mink and other native animals (Maran et al. 1998b; Sidorovich 2001; Macdonald and Harrington 2003; Pödra et al. 2013).

American mink were first recorded as a feral species in Spain by M. Delibes and F. Amores in 1978 in Segovia (central Spain) (Unpubl.). Now there are five large, widely distributed populations in Spain, all of which are expanding (Ruiz-Olmo et al. 1997; MAGRAMA 2014). As an invasive species, American mink are subject to routine culling in an attempt to control their population (Bonesi and Palazón 2007).

The expansion of American mink into the range of the native species is considered the main threat for the endangered European mink (Maran and Henttonen 1995; Sidorovich 2001; Maran 2007; Pödra et al. 2013). Long-term sympatric coexistence of both mink species has not been documented (Maran et al. 2011). However, this co-occurrence of European and North American mink alone is not sufficient to explain the decline of the European mink because, in many areas, the decline of the native mink was evident prior to the arrival of the exotic species (Lodé et al. 2001; Maran 2007). Others have suggested that the decline of the

European mink may be attributed to habitat loss, over-hunting, or pollution (Youngman 1982; Lodé et al. 2001; Maran 2007). Aleutian mink disease (AMD) and other viral infections have also been suggested as factors in the decline of the European mink population (Mañas et al. 2001; Skumatov 2001; Philippa et al. 2008).

Infection with Aleutian mink disease virus (AMDV; *Parvoviridae*) is widespread and AMDV is the most significant infectious agent affecting farmed American mink worldwide (Hossain-Farid et al. 2010; Jahns et al. 2010; Nituch et al. 2011; Sang et al. 2012). Due to the severe economic losses to the fur industry in all mink-breeding countries, there have been attempts to reduce AMDV prevalence in mink farms by implementing serologic screening programs and culling positive animals (Jensen et al. 2011; Espregueira-Themudo et al. 2012). In spite of these efforts, AMDV continues to be a significant problem. Several studies have been conducted to determine the prevalence of AMDV antibodies and virus detection by PCR in free-ranging American mink within its original North American range and the introduced distribution area. The results are summarized in Table 2.

Infection with AMDV causes acute or chronic disease in farmed American mink and other mustelids, depending on host factors such as age, genotype, and the virulence of the viral strain (Bloom et al. 1980, 1994). These syndromes span from acute progressing interstitial pneumonia with high mortality in newborn mink kits, which are not protected by maternal antibodies (Larsen et al. 1984; Alexandersen et al. 1994), to a chronic, usually persistent, immune complex-mediated disease with hypergammaglobulinemia, infiltration of tissues with lymphocytes and plasma cells, glomerulonephritis, nonsuppurative meningoencephalitis, decreased fertility/abortion, and severe chronic immune dysfunction with increasing susceptibility to other diseases (Ingram and Cho 1974; Bloom et al. 1980; Hansen and Lund 1988; Bloom et al. 1994; Broll and Alexandersen 1996).

The Aleutian mink disease virus is highly stable and persistent in the environment. Furthermore, transmission can be demonstrated both horizontally by blood, urine, feces, saliva, and insect vectors or vertically by the infection of kits by infected dams during the perinatal period (Kenyon et al. 1963b; Gorham et al. 1964; Ingram and Cho 1974; Porter and Larsen 1974; Hansen 1985; Keven-Jackson et al. 1996a; 1996b).

Geographic area	Animals tested	Prevalence	Test ¹	Reference
Ontario (Canada)	29	55.2%	CIEP test	Ingram and Cho 1974
Ontario (Canada)	120	61.7%	CIEP test	Cho and Greenfield 1978
Iceland	394	3.5%	CIEP test	Skirnisson et al. 1990
Spain	14	0%	CIEP test	Mañas et al. 2001
Spain	5	40%	PCR	Mañas et al. 2001
Kirov (Russia)	19	61%	CIEP test	Skumatov 2001
Thames region (England)	27	52%	CIEP test	Yamaguchi and Macdonald 2001
France	75	23%	CIEP test	Fournier-Chambrillon et al. 2004
Ontario (Canada)	208	29%	CIEP test	Nituch et al. 2011
Denmark (mainland)	396	3%	CIEP test	Jensen et al. 2012
Denmark (Bornholm)	142	45%	CIEP test	Jensen et al. 2012
Ontario (Canada)	183	25%	PCR	Nituch et al. 2012
Southern England	12	66.7%	CIEP test	Harrington et al. 2012
Nova Scotia (Canada)	60	93.3%	CIEP/PCR	Hossain-Farid 2013
Estonia	27	14.8%	PCR	Leimann et al. 2015
Finland	57	54%	CIEP/PCR	Knuutila et al. 2015
Sweden	142	46.1%	ELISA	Persson et al. 2015
Sweden	139	57.6%	PCR	Persson et al. 2015
Spain	1.735	32.4%	CIEP test	This study

¹CIEP = counter-current immunoelectrophoresis

Table 2 The summary data for studies on Aleutian mink disease virus in free-ranging American mink (*Neovison vison*).

Since the first detection of AMDV in European mink in 2001 (Mañas et al. 2001), disease monitoring in this endangered species has been considered a priority in the conservation effort. Routine serologic tests have been included in all field studies where animals are captured. In France, an AMDV antibody prevalence of 12% (n=99) has been reported (Fournier-Chambrillon et al. 2004), and no antibody-positive animals were detected in 84 samples from Navarra (Spain) (Sánchez-Migallón et al. 2008). Our objective in this study was to describe the role of AMDV infection in both mink species (native and introduced) in their distribution areas in Spain over a 16-yr period.

Material and Methods

Blood samples from native European mink were obtained by: (a) surveys of European mink

in the Spanish distribution areas, (b) periodic population studies conducted in specific river drainages, (c) campaigns to capture founders for the European mink breeding program in Spain (2004) (MAGRAMA 2009), and (d) animals captured accidentally during the culling and trapping of feral American mink (MAGRAMA 2014). The management protocol for all captured European mink included blood extraction for AMDV antibody tests (MAGRAMA 2005).

Samples from feral American mink were collected during the population control operations (MAGRAMA 2014), which were conducted by several governmental authorities and performed by rangers and biologists acting as trappers. The captured animals were transported to an official wildlife center for clinical examination and euthanasia following the standards of animal welfare and legal procedures (MAGRAMA 2014). Both species were captured in single entry 15x15x60-cm homemade wire cage traps.

Captured European mink were anesthetized intramuscularly with a combination of 5 mg/kg Ketamine hydrochloride (Imalgène 1000, Merial, Lyon, France) and 0.10 mg/kg Medetomidine hydrochloride (Domtor, Orion Corporation, Espoo, Finland). Atipamezole (Antisedans, Orion Corporation, Espoo, Finland) was used for reversal at five times the Medetomidine dose. All European mink were clinically examined and bled by jugular puncture; sex and weight were recorded, and they were marked with subcutaneous passive transponder tags for identification. After recovery from anesthesia, they were released at their capture locations. Sera were stored at -20 C until tested.

American mink were also anesthetized, and blood samples were collected from the jugular vein or by cardiac puncture. After data collection and while still under anesthesia, animals were sacrificed following the welfare legal standards and submitted for postmortem examination (MAGRAMA 2014). Necropsies included reproductive examination and extraction of a canine tooth for age determination. Only 2% of these samples were obtained at sites within a 50 km radius of active fur farms. Figure 8 shows the American mink distribution in Spain (Bravo 2007) with the six populations included in this study.

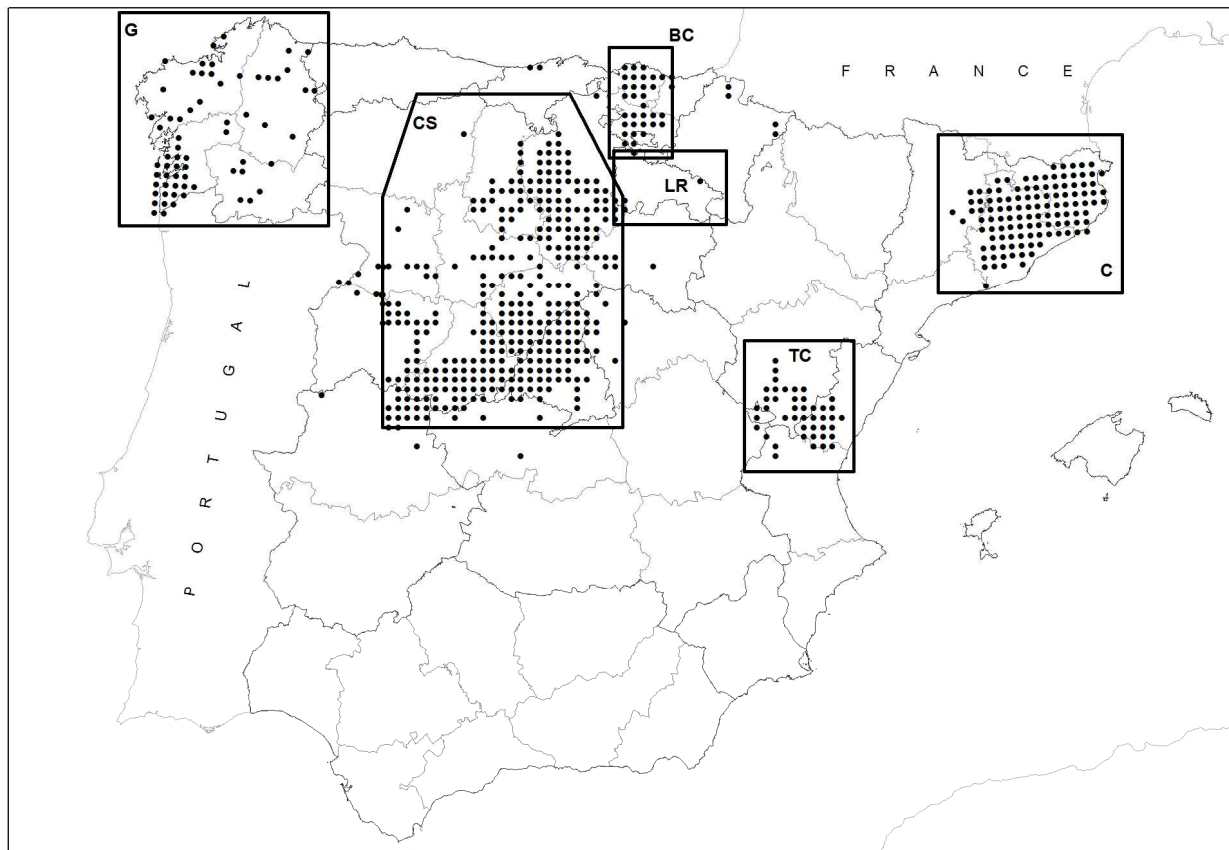


Fig. 8 The distribution of American mink (*Neovison vison*) in Spain (adapted from Bravo 2007) with the six populations included in this study; BC: Basque Country (n=231); CS: Central Spain (n=1,125); C: Catalonia (n=265); TC: Teruel-Castellon (n=53); G: Galicia (n=34) and LR: La Rioja (n=27). Each dots represents presence of the species.

Testing for AMDV antibody was performed in serum samples by counter-current immunoelectrophoresis (CIEP; Bloom et al. 1975; Oie et al. 1996) using the same procedure performed in mink farms for serologic screening (Jensen et al. 2011; Espregueira-Themudo et al. 2012).

To avoid disturbance during the reproductive period, trapping was halted between May and August in the European mink distribution area. Animals captured between January and April were assigned to the prereproductive period, and those captured between September and December were assigned to the postreproductive period. Only animals captured during the prereproductive period were included in the weight analysis to avoid the smaller size of subadult animals and difficulties in separating subadult and adult animals.

The prevalence of AMDV antibody was defined as the percentage of individuals with a positive CIEP test. For animals recaptured more than once per year, the latest result was used. Animals recaptured during the 45 d following a previous capture were not subjected to anesthesia or blood extraction. The true incidence of AMDV infection was calculated by dividing the number of animals that seroconverted by the period at risk (days between two negative tests or days between a negative and a positive test divided by two). For this purpose, one animal that showed a negative result between two positive tests was considered a false negative result.

Necropsies of the American mink included the routine extraction of one canine tooth from each specimen for age determination. Annuli in the dental cementum were counted and the age was estimated using the standardized, species-specific age analysis models of Matson's Laboratory (Milltown, Montana, USA) following their own internal protocol (Matson 1981). Individuals were divided into age classes at 1-yr intervals. Animals without cementum annuli and with open apical foramen were classified as a subadult or in the 0+ group (animals <1 yr old) and samples with one or more cementum annuli were classified as adult. We assumed a fixed date of birth of 1 May, based on bibliography (Sidorovich 1993; Bravo and Bueno 1999; García-Díaz and Lizana 2013).

American mink mating takes place in the first 3 wk of March and kits are born by late April or early May, with an average litter size of six kits (Espregueira-Themudo et al. 2011). Considering these dates, the uteri from 27 American mink (4+ yr or less age class) trapped in April were examined for embryos by eye and microscopically.

EpiCalc 2000 (<http://www.brixtonhealth.com/epicalc.html>) was used to estimate the 95 % confidence intervals (CI). A chi-square analysis was used to test for significance of differences in AMDV antibody prevalence between sexes. A one sample Z-test was used to estimate the proportion of prevalence between periods, and analysis of variance was used to compare weight differences between positive and negative European mink using IBM SPSS Statistics 19 software (New York, USA).

Results

European mink

From 1997 to 2012, 410 individual European mink were captured (245 males and 165 females, $p < 0.01$) in the Spanish distribution area, and 492 serum samples were obtained. For animals recaptured more than once during the same year, the prevalence was calculated using the latest sample obtained (475 serum samples, 278 males and 197 females). One hundred fifty-two samples were antibody positive (32%, 95% CI : 27.8-36.4%). There were no statistically significant differences between females and males (33.5% and 30.93%, respectively) or between prereproductive and postreproductive periods (34.8%, $n=181$ and 30.9%, $n=288$) ($p > 0.05$ in all cases). Figure 9 shows the locations where positive and negative European mink were captured and the two active American mink farms present in the area (MAGRAMA 2014).

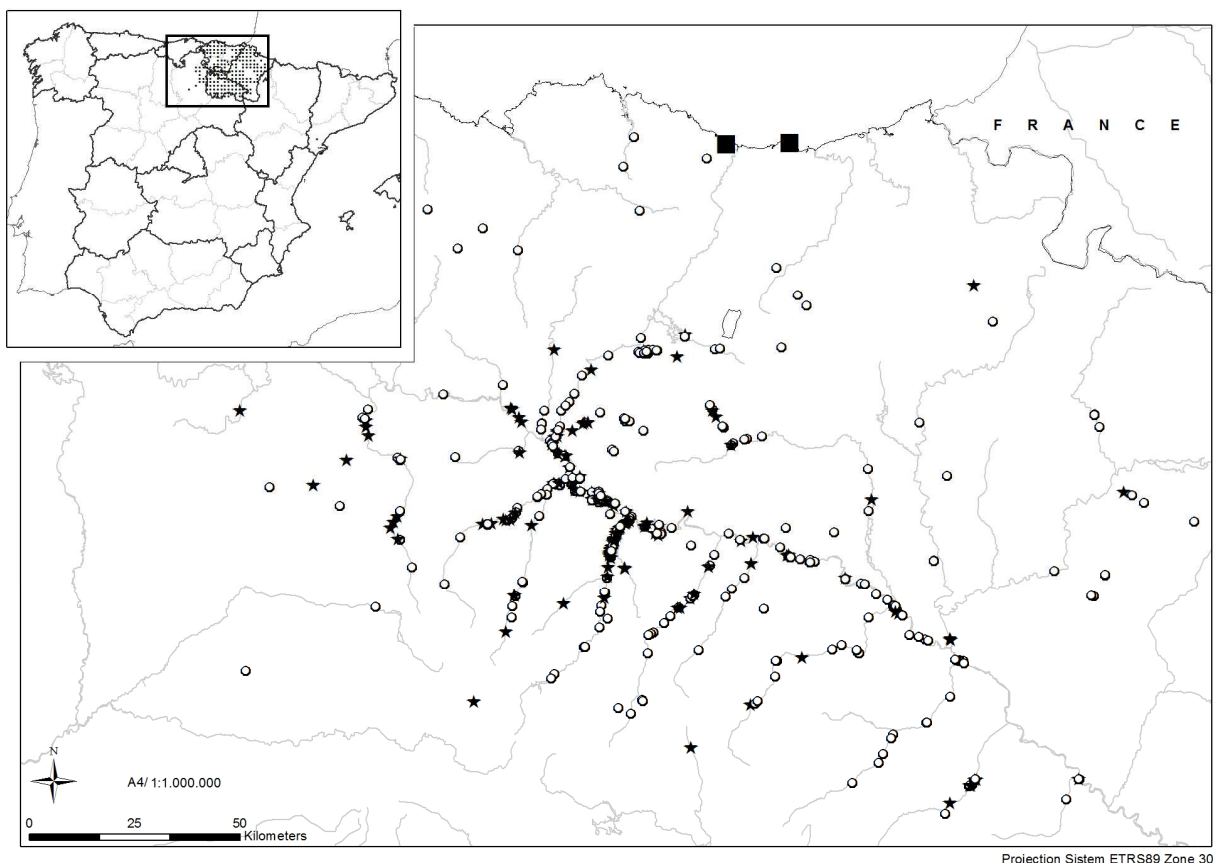


Fig. 9 The distribution of European mink in whole Spain (adapted from Palazón and Ceña 2007 –upper left corner- and locations where Aleutian Mink Disease Parvovirus-positive (black stars) and -negative (white circles) European mink were captured (prevalence=32%; $n=475$). The location of two active American mink farms are shown (black square).

The prevalence of AMDV antibody by year is summarized in Figure 10. Samples obtained between years 1997-2000, 2004-2005 and 2006-2007 were combined to avoid collection intervals with <10 samples. The total number of samples processed in each period ranged from 16 to 60. The prevalence estimates suggested an increase during the study period, but the differences were not significant ($R=0.551$; $p=0.79$).

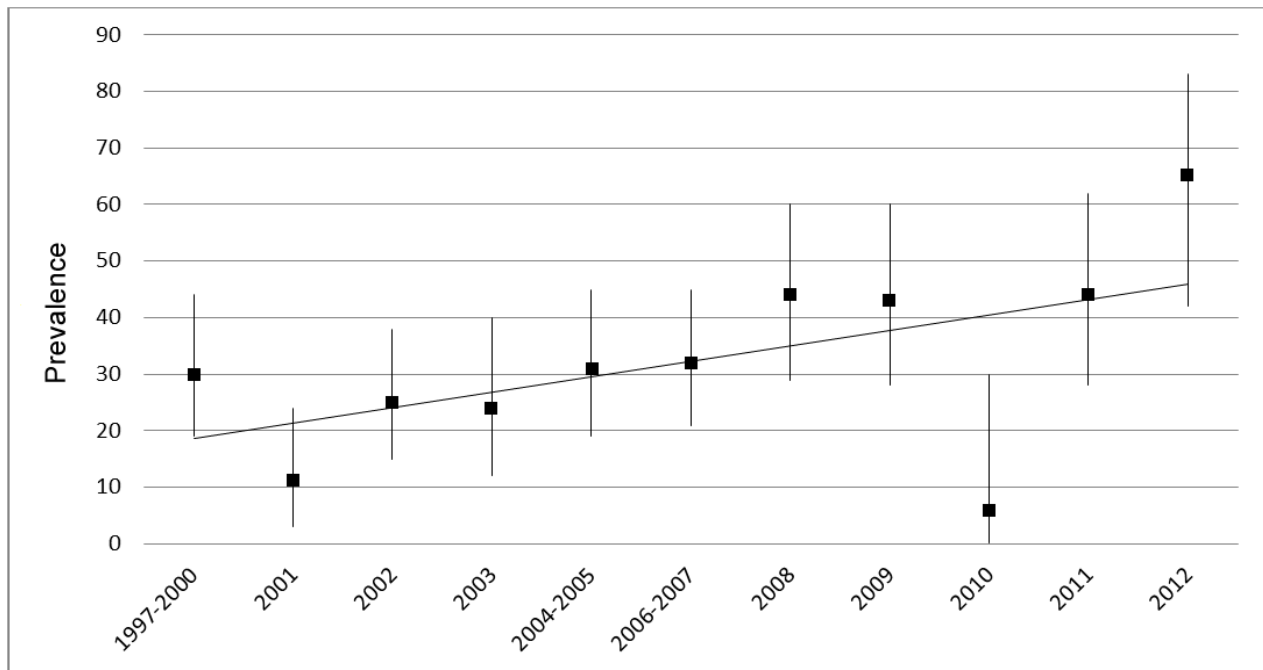


Fig. 10 The prevalence of antibody to Aleutian mink disease virus in European mink in Spain by year with 95% confidence intervals. The samples obtained between 1997 and 2000 and those from 2004-2005 and 2006-2007 were combined (overall prevalence=32%; $n=475$).

Body weights of antibody-positive and negative European mink during the prereproductive period were similar. The mean weights for female mink were 513 g for positive ($n=17$; $SD=72$) and 508 g for negative animals ($n=33$; $SD=62$). The mean weights for male mink were 863 g for positive ($n=42$; $SD=103$) and 856 g for negative animals ($n=83$; $SD=108$). These differences were not statistically significant ($F=0.063$, $p=0.8$ for females and $F=0.122$, $p=0.7$ for males).

Fifty-nine mink (14.4% of the sampled animals) were recaptured during the study period: 42 were captured twice, 12 captured three times, 4 captured four times, and one was captured five times. The AMDV antibody results from the first sample were negative in 41 animals

(70%) and positive in 18 (30%). The antibody prevalence in recaptured animals was similar to the prevalence in the overall population (z -score= 0.23; p =0.8).

The mean number of days between consecutive captures was 326 (range: 45-1,076). The mean distance between consecutive captures was 3,780 m (n =82, range: 0-39,727 m). Six recaptures (7%) were more than 10,000 m from the previous capture site and only three (4%) of the animals were recaptured more than 30,000 m from the previous capture site. Of the 82 recaptures, 55 animals maintained the previous serology result (34 negative and 21 positive in the two controls), while 20 animals seroconverted from negative to positive and seven positive animals became negative by CIEP. Thus, recaptured mink during the study period showed an incidence of AMDV infection of 0.46 per animal-year at risk, while the incidence of loss of detectable antibody was 0.18 per animal-year at risk.

American mink

We analyzed 1,735 American mink serum samples. These mink were captured in the five Spanish distribution areas of the species and the range expansion area between two of these populations (La Rioja population; Fig. 8). The majority of sampled animals were males (61.5%). The prevalence of AMDV antibody in this species was almost identical to that obtained for European mink: 32.4% (n =1,735, 95% CI: 30.2-34.6%). The prevalence in females was 33.2% (n =668, 95% CI: 29.6-37.0%), and in males it was 31.9% (n =1,067, 95% CI: 29.0-34.7%).

However, prevalence varied geographically. Significant differences were detected between Catalonia and all of the other regions. The prevalences from Basque Country and La Rioja populations were also different from the prevalences in Central Spain and Galicia (Table 3). Subadult animals (0+ age class) represented 52.5% of all animals (551 samples, subadult:adult ratio = 1.1). The prevalence in subadults was lower than in adults (22.3%, CI 95%: 19-26 vs 35.5%, CI 95%: 31.3-40, z -score= -4.73, p < 0.001). The prevalence increased with age (R =0.88; p <0.05) (Table 4).

		<i>n</i>	Positive animals	Prevalence (%)	95% CI	BC	CS	C	TC	G	LR
European mink		475	152	32.0	27.8-36.4						
American mink	All samples:	1,735	562	32.4	30.2-34.6						
	Basque Country (BC):	231	55	23.8	18.6-30	--	***	***	NS	**	NS
	Central Spain (CS):	1,125	454	40.3	37.4-43.2	***	--	***	NS	NS	*
	Catalonia (C):	265	15	5.6	3.27-9.28	***	***	--	***	***	*
	Teruel-Castellon (TC):	53	17	32.0	20.2-46.3	NS	NS	***	--	NS	NS
	Galicia (G):	34	16	47.0	30.1-64.5	**	NS	***	NS	--	*
	La Rioja (LR):	27	5	18.5	7-38.7	NS	*	*	NS	*	--

NS= not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Table 3 The Aleutian mink disease virus antibody prevalence and 95% confidence intervals (CI) measured in European mink (*Mustela lutreola*) overall and for American mink (*Neovison vison*) in the six areas in Spain with American mink populations, 1997-2012. Asterisks in the last 5 columns indicate significant differences in prevalence between areas.

Age class	<i>n</i>	Positive animals	Prevalence (%)	95% CI
0+	551	123	22.3	19.0-26.0
1+	281	98	34.8	29.4-40.8
2+	122	33	27.0	19.6-36.0
3+	53	22	41.5	28.4-55.8
4-7+	42	24	57.1	41.0-72.0

Table 4 Aleutian mink disease virus antibody prevalence and 95% confidence intervals (CI) by age class of captured American mink (*Neovison vison*) in Spain, 1997-2012. See Materials and Methods for explanation of age classes.

Of 27 females captured in April 15 were AMDV antibody negative and 12 were positive. Age determination suggested that 50% of females were in their first reproductive period in both cases. No pregnant females were detected in three (20%) of the antibody negative and in six (50%) of the antibody positive animals ($p=0.05$). There was no significant difference in the mean number of embryos per pregnant female between the positive (mean = 6.0) and negative (mean = 5.6) animals.

Discussion

Aleutian mink disease virus is currently endemic, highly prevalent and widely distributed in the Spanish population of European and American mink. The observed AMDV antibody prevalence in European mink (32%) was higher than that reported in France (18%, n=99; Fournier-Chambrillon et al. 2004) or in a previous study from Navarra, Spain (0 of 84 tested animals; Sanchez-Migallon et al. 2008). Our study included 30 serum samples from Navarra that were obtained before the study by Sanchez-Migallon et al. (2008); in these samples, we identified six antibody-positive animals (20% prevalence, 95% CI: 8.4-39.1%). Our results and the virus characteristics (highly stable and persistent in the environment) suggest that the presence of AMDV in Navarra should be re-evaluated.

The year 2010 was a notable exception to the trend of increasing prevalence with time in the European mink population (Fig. 10). Samples from 2010 were primarily from Zaragoza and were collected shortly after the colonization of this area by European mink (Gómez et al. 2011). The variation in antibody prevalence in American mink populations among regions may be related to time since introduction of AMDV. The highest prevalence was in Galicia (Table 3), which has 80% of the active mink farms in Spain (MAGRAMA 2014). The two areas with the lowest prevalence were Catalonia, where the virus was recently introduced (the first antibody-positive animal was detected in 2005, after >70 mink had been investigated) and La Rioja, an area recently colonized by American mink invading from the Basque Country and Central Spain populations.

Our finding of a bias towards males in the sampling, supports results of Buskirk and Lindstedt (1989) who attributed the male bias in sampled mustelid species to differences in capturability resulting from sex-specific home-range sizes and higher mobility in males. The home range sizes of European and American male mink are larger than those of females (Palazón and Ruiz-Olmo 1993; Garin et al. 2002; Zabala et al. 2007). An absence of differences in the prevalence of AMDV antibody between sexes was also reported in European and American mink by other investigators (Yamaguchi and Macdonald 2001; Fournier-Chambrillon et al. 2004; Hossain-Farid 2013). Mink are solitary species, especially European mink. This behavior may increase the relative importance of vertical or perinatal transmission and infection during mating contacts, which equally affects both sexes,

minimizing other transmission modes related to other social behaviors.

As expected for a chronic infection, the prevalence in American mink increased with the age of the animal. Similar results have been previously described (Yamaguchi and Macdonalds 2001; Persson et al. 2015).

Low reproductive parameters were detected in infected American mink females reared in captivity (Jahns et al. 2010). This supports our finding of a higher proportion of nonpregnant females in the antibody-positive group (50%, n=12) versus the antibody-negative animals (20%, n=15), although the mean number of embryos per pregnant female was similar.

Our finding of no differences in weight between positive and negative animals in the prereproductive period suggests that infection has no detectable effect on mink body weight. Animals with progressive AMD may have low trapability or, alternatively, this effect cannot be appreciated until progressive AMD ensues.

Since our study began, AMDV-positive European mink have been found throughout the distribution area and not only in areas where there are fur farms. Fournier-Chambrillon et al. (2004) also found antibody-positive animals outside of the areas where American mink are found. These findings also suggest that infection from the invasive American mink is not currently affecting the transmission of AMDV to native mink. Nevertheless, mink farms can act as sources of AMDV transmission to the wild (Nituch et al. 2011).

European mink have linear territories along watercourses with maximum ranges of 17 km for males and 6 km for females (Palazón and Ruiz-Olmo 1993; Garin et al. 2002; Palazón and Ceña 2007). In the 82 recaptures that occurred for 59 minks, the mean distance between captures was 3.7 km, but some animals were recaptured nearly 40 km from the previous capture site (linear distance, much longer following watercourses).

Due to the critical status of the European mink, any factor that negatively affects the population may have severe repercussions on the conservation of the species. Despite that we have not observed any obvious negative effects of AMDV among the antibody-positive animals in this study, AMD can potentially affect the survival of the species and serious

efforts should be undertaken to reduce the transmission of AMDV in the European mink population. Thus, it would be advisable to use biosecurity protocols in American mink farms and in captured European mink to avoid the spread of infection. Only antibody-negative European mink should be incorporated into captive breeding programs. Determination of the specific viral strains present in populations and pathology studies need further attention in the endangered European mink.

3.3. Demographic structure of three riparian mustelid species in Spain

Introduction

The European mink (*Mustela lutreola*) and European polecat (*Mustela putorius*) are small-size mustelids endemic to Europe. The first species is one of the most threatened species in the world, is classified by the International Union for Conservation of Nature as “critically endangered” and is distributed in a few small isolated populations in Northern Spain, Western France, Romania, Ukraine and Russia (Maran et al. 2011). Habitat loss, pollution, over-hunting and diseases have been reported as possible causes of this decline (Camby 1990; Saint-Girons 1991; Rozhnov 1993; Maran and Henttonen 1995; Palazón and Ruiz-Olmo 1997; Mañas et al. 2001). Competition with the alien and invasive American mink (*Neovison vison*) is currently the major conservation problem for this species (Maran and Henttonen 1995; Ruiz-Olmo et al. 1997; Maran et al. 1998b; Sidorovich 2001; Maran 2007; Pödra et al. 2013).

The European polecat is widespread in the western Palaearctic up to the Ural Mountains in Russia (absent from such areas as Ireland, northern Scandinavia and much of the Balkans and eastern Adriatic coast). This population appears to be stable in the eastern portions of its range but is decreasing in the Central and Western regions of Europe (Fernandes et al. 2008).

The two species are native in Spain and share conservation problems (Palazón and Ceña 2007; Virgos 2007). The European mink's Spanish population was roughly estimated at less than 500 adult individuals (Palazón and Ceña 2007), whereas the status of the European polecat varies widely across Spain but with a common decreasing trend in the population (Virgos 2007).

The American mink is native to North America. The species was imported into Europe for fur farming at the beginning of the 20th century, and after deliberate or accidental escape, this invasive species became established and widespread in the natural environments of many European countries (Dunstone 1993; Bonesi and Palazón 2007), including Spain (Ruiz-Olmo et al. 1997).

All three species are generalist predators within riparian habitats and have similar body sizes (range of 0.4-2.2 kg, including both sexes and age categories; Palazon and Ceña 2007; Bravo 2007; Virgos 2007; Melero et al. 2012; Zalewski and Bartoszewicz 2012) and similar seasonal breeding patterns. Females breed in their first year of life and have a single litter per year (Pilbeam et al. 1979; Dunstone 1993; Amstislavsky and Ternovskaya 2000; Amstislavsky et al. 2009). Their feeding habits are similar, and food sources primarily include amphibians, fish, crayfish, small mammals and birds (Lodé 1997; Maran et al. 1998a; Sidorovich 2000; Sidorovich et al. 2001; Palazón et al. 2004). Habitat use is similar for both mink species, whereas that of the polecat appears to be somewhat less specialized in semi-aquatic life and riparian ecosystems than the other species (Sidorovich and Macdonald 2001; Harrington and Macdonald 2008). All of these findings make all three species good candidates for establishing a competence relationship in riparian habitats, and according to the literature, the American species is the one that benefits most because it is more aggressive and versatile (Maran et al. 1998b; Sidorovich 2001; Sidorovich and Macdonald 2001; Macdonald and Harrington 2003; Pödra et al. 2013).

Management actions in Spain involve control of invasive species, particularly to protect the endangered species (Bonesi and Palazon 2007; Pödra et al. 2013). These control efforts are undertaken via administrative permissions and care of animal welfare. Despite this control, which has been established for more than 10 years, the American mink population is still expanding in Spain (Bravo 2007; MAGRAMA 2014). The animals collected during these operations gave us an opportunity to obtain a large sample to study the demography of the American mink and subsequently compare these results with the demography of the native species obtained primarily from road casualties.

Age estimation of free-ranging animals is an important tool for wildlife management and studies (Alexander 1958; Morris 1972). In a previous study, Whitman (2003) stated that age determination in American mink is a simple and efficient indicator of harvest pressures. Age determination also can be useful for creating epidemiologic models for chronic disease, as recently used for Aleutian mink disease parvovirus (Persson et al. 2015).

In our study species, age is impossible to determine visually in adults, and sub-adult animals

older than eight months are difficult to distinguish from adults (Whitman 2003).

Counting of the annual *cementum* lines in teeth sections is a method widely applied in carnivores because it is an accurate method for estimating age in years (Morris 1972; Grue and Jensen 1979). *Cementum* analysis in our study species was previously performed with success and currently is the only accurate method of age determination for these species (Danilov and Tumanov 1976; Matson 1981; Dunstone 1993; Sidorovich 1997; Ansorge and Suchentrunk 2001).

During the last decades, several investigations into the three species studied in this work were performed in Europe. However, the population structure was scarcely assessed in specific areas and often for a single species (Danilov and Tumanov 1976; Sidorovich 1997; Ansorge and Suchentrunk 2001; Whitman 2003; Hammershøj 2004; Bonesi et al. 2006; Kristiansen et al. 2007; Persson et al. 2011). Thus, the lack of such information affects the ability to construct precise demographic models, viability analyses, competition assessments, or evaluations on the effectiveness of culling programs. Availability of information on the age structure in populations of the three species is especially scarce for the Southern European ecosystems, despite its importance in control operations or conservation programs for the endangered species. For these reasons, our main goal was to fill this gap and improve knowledge on the population demographic structures of the three species in Spain.

Material and methods

Between 1998 and 2012, a total of 1,661 American mink, 54 European mink, and 51 European polecats originating from Northern Spain were collected year-round for post-mortem analysis. American mink were obtained primarily from live-trapping campaigns included in a government endangered species conservation programs (97%), whereas the origins of the European mink and European polecat were primarily road casualties (68.5 and 88%, respectively). Other death causes include disease, predation, drowning, or unknown causes (Table 5). Geographic origin and information on samples collected per year are shown in Fig. 11 and Table 6, respectively. American mink were captured in wire mesh traps (60x15x15 cm), as authorized by the Autonomous authorities, and transferred to

official wildlife rehabilitation centers for euthanasia following the legal requirements for animal welfare. American mink samples were obtained from the five wild Spanish populations (Bravo 2007). Only 1.3% of these samples were obtained from Provinces with active fur farms. We assumed that no ranch-raised mink were included in this study.

Species	n	Sex M/F/ND ^a	Body mass ^b (Mean±SD) (g)				Death cause		
			Sub-adult Male	Adult Male	Sub-adult Female	Adult Female	Capture – euthanasia	Road casualties	Other
<i>N. vison</i>	1661	1027/634/0	1,125 (±283) n=533	1,227 (±265) n=448	626 (±131) n=291	679 (±127) n=326	1.614	35	12 ^c
<i>M. lutreola</i>	54	35/16/3	771 (±230) n=8	768 (±215) n=9	361 (±51) n=4	470 (±63) n=7	0	37	17 ^d
<i>M. putorius</i>	51	31/16/4	1,145 (±254) n=8	1,349 (±262) n=4	936 (±210) n=5	726 (±91) n=3	0	45	6 ^e

^a M.F.ND: Male. Female. Not determined

^b 63 American mink, 26 European mink and 31 European polecat with non-valuable weight

^c Not determined (6), predation (2), disease (2), drowned (1), injury (1)

^d Disease (6), not determined (6), drowned (3), predation (2)

^e Dogs (2), not determined (2), disease (1), drowned (1)

Table 5 Species, number of samples, sex, body mass and cause of death for all animals included in the current study.

Period	American mink <i>N. vison</i> (n=1644 ^a)	European mink <i>M. lutreola</i> (n=54)	European polecat <i>M. putorius</i> (n=51)
1998-2001	56	17	12
2002	168	5	7
2003	265	6	8
2004	254	3	6
2005	224	3	7
2006	220	1	3
2007	296	2	0
2008	130	2	0
2009-2012	31	15	8

^a Seventeen American mink without exact dates of death

Table 6 Animals collected for study during the different periods.

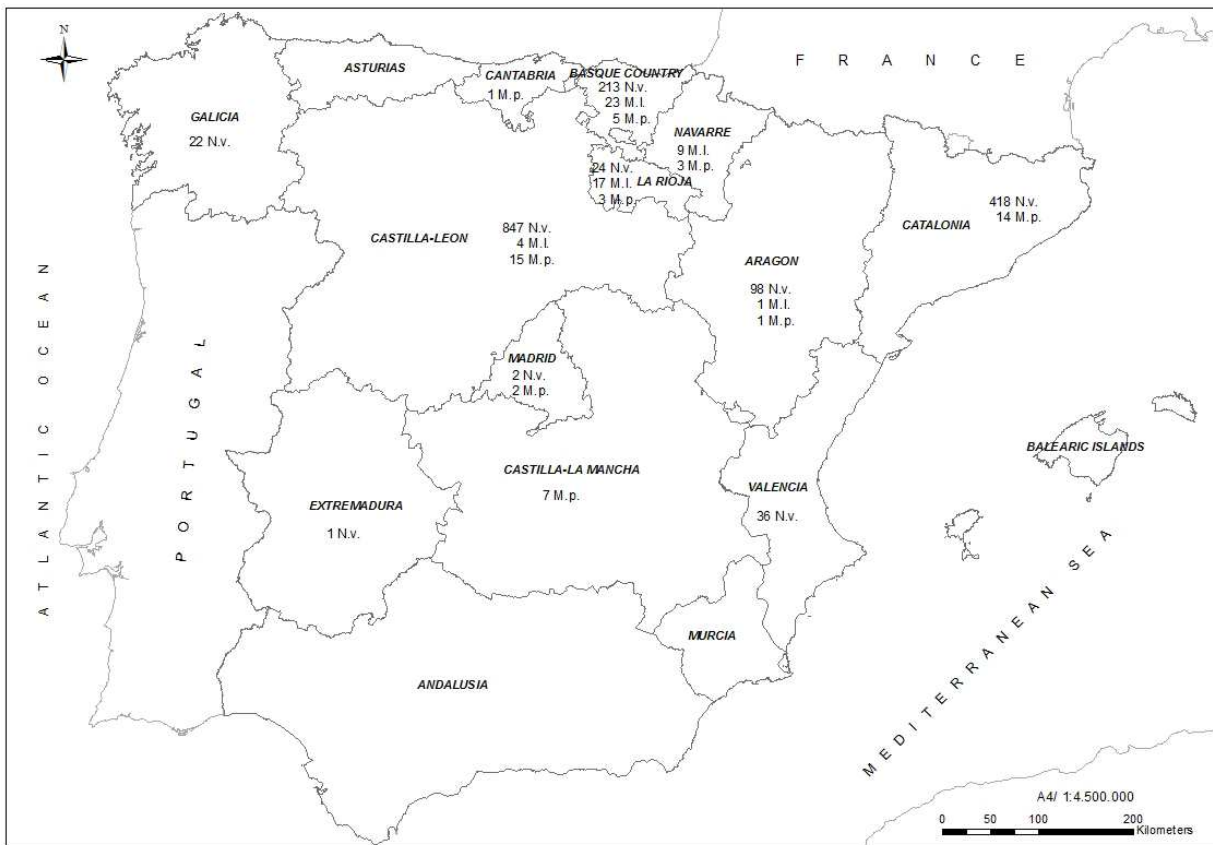


Fig. 11 Geographic origin of all animals included in the current study. N.v.: American mink (n=1,661); M.l.: European mink (n=54); M.p.: European polecat (n=51).

Twenty-three European mink samples (42.6%) were obtained from decreasing population areas with a presence of American mink (Basque Country), whereas the remainder of the samples (n=31) were obtained from areas prior to the expansion of the American mink over its distribution range (La Rioja, Navarre, Castilla-Leon and Aragon).

In brief, samples were obtained from a decreasing population with different intensity, depending on the zone (European mink), decreasing species (European polecat), and a species in expansion (American mink).

In all cases, carcasses were frozen at -20°C as soon as possible after death and thawed immediately before the post-mortem was performed. A canine tooth was removed from each specimen during the post-mortem and sent to Matson's Laboratory (Montana, U.S.A.) for age determination following a standard procedure (Matson 1981). Microscope slides were produced from decalcified sections of the teeth. Annuli in the dental cementum were

interpreted using the Matson Laboratory's standardized and species-specific analysis models, and the annulus count was used to estimate the age of each individual. For static life history analysis, we use the parameters from Caughley (1977), assuming a stable age distribution and a zero rate of increase for this analysis, where frequency (f_x) is the number of animals still surviving in the different years after birth. Survival (l_x) is calculated by dividing each value of f_x by its original value ($l_x = f_x/f_0$), which gives the proportion of animals still surviving at a given age. Frequency of mortality (d_x) is calculated as the difference between two consecutive values of l_x ($d_x = l_x - l_{x+1}$) and gives the probability of death during the age interval. Mortality rate (q_x) is calculated as d_x/l_x and shows the proportion of animals alive at age x that will die before age $x+1$, and the survival rates (p_x) are the complement of their respective q_x values ($p_x = 1 - q_x$) and reflect the proportion of animals alive at age x that survive to age $x+1$.

The individuals were divided into age classes at one-year intervals. Animals without *cementum annuli* and those with open apical foramen were classified as "sub-adult" or 0+ group (animals less than one year old). Samples with one or more *cementum annuli* were classified as "adult". We assumed a fixed date of birth of 1st May for American mink and 1st June for the European mink and European polecat samples based on the wild animal literature and breeding results of European mink captive breeding in Spain (Pilbeam et al. 1979; Sidorovich 1993; Bravo and Bueno 1999; Amstislavsky and Ternovskaya 2000; Lodé 2001; MAGRAMA 2009; Persson et al. 2011; García-Díaz and Lizana 2013). The sex ratio was defined as male number divided by female number, and the sub-adult ratio was defined as sub-adult number divided by adult number.

Age reliability was rated as "A" (result nearly certain), "B" (error possible), and "C" (error probable) following a standard laboratory procedure corresponding to estimated accuracies of +/- 0, 1, and 2 years, respectively (Matson 1981). The accuracy of the estimated age for all samples processed were 92.02% for A, 7.92% for B and 0.06% for C.

Following the work of García-Perea and Baquero (1999) for Iberian wildcats (*Felis silvestris*), we proposed a formula used to calculate the absolute age of adult animals in days (A) as the result of the sum of days between 1st May (American mink) or 1st June (European mink and European polecat) to 31st December (D_1), number of *cementum lines*

(L) x 365 and sum of days from 1st January to death date (D₂).

$$A = D_1 + (L \times 365) + D_2$$

For sub-adult animals, the age in days was calculated as the sum of days between the estimated birth date and death date.

Each year was divided into two periods:

- a) Animals obtained between 1st January and 30th June were assigned to the *Pre-reproductive period*. No cubs (animals with deciduous incisor teeth) were included in the study. For this reason, no animals born in the year were included in the Pre-reproductive period.
- b) The *Post-reproductive period* included animals obtained between 1st July and 31st December.

Animals were also classified according to cause of death in three groups (Table 5)

- a) “*Capture - euthanasia*” group included American mink captured during culling operations and euthanized in a wildlife care center,
- b) “*Road Casualties*” group included animals found dead as a result of a traffic accident, and
- c) “*Other*” group included animals with death by another cause (mainly diseases and predation).

The Chi-square test was used to compare differences between sexes. The one-sample Z-test was used to test for differences in proportions, and ANOVA was used to test for differences between groups.

Results

Species, number of samples, sex, body mass and death cause of all animals are shown in Table 5.

Sex ratio

The sex ratios were 1.62, 2.19, and 1.94 for American mink, European mink and European polecat, respectively. A significantly high male proportion was found within the sample (American mink: $x^2 = 91.57$; $p < 0.001$; European mink: $x^2 = 7.07$; $p < 0.01$; European polecat: $x^2 = 4.78$; $p < 0.05$). For the study periods, male biases were detected in the sex ratio in both the pre- (1.69, 4.00, and 3.40) and post-reproductive periods (1.53, 1.36, and 1.27) for American mink, European mink and European polecat, respectively. Significant differences were detected in the pre-reproductive period for all three species (American mink: $x^2 = 62.53$; $p < 0.001$; European mink: $x^2 = 9$; $p < 0.01$; European polecat: $x^2 = 6.54$; $p < 0.05$) and in the post-reproductive period for American mink ($x^2 = 31.31$; $p < 0.001$).

Age and demographic structure

The static life history table and the pyramid-age structure of the samples (separate for each species) are presented in Table 7 and Fig. 12. The sub-adult ratio and age analysis of the different species separated by sex, periods and cause of death are shown in Table 8.

The sub-adult ratios were highly similar for all species, with values of 1.07 for the American mink, 1.07 for the European mink, and 1.32 for the European polecat (One sample Z-test, $p > 0.5$ in all cases). In the case of European mink, we detected a lower sub-adult ratio in the region with a decreasing population (Basque Country) compared with those regions with stable populations (La Rioja, Navarre, Castilla-Leon and Aragon), i.e., 0.64 and 1.58, respectively, but the differences were not significant (One sample Z-test, z-score= -1.61, $p=0.053$).

For the pre-reproductive period, the sub-adult ratios were 0.63, 0.53, and 0.46, whereas in the post-reproductive period, these values were 2.31, 2.11, and 3.14 for the American mink, European mink, and European polecat, respectively. The differences among periods were significant in all three species (One sample Z-test, z-score= -12.43, $p < 0.001$ for the American mink, z-score= -2.44, $p < 0.01$ for the European mink, and z-score= -3.15, $p < 0.001$ for the European polecat).

In the age structure, significant differences were noted between age and sex for American mink. A higher male percentage in the 0+ class was observed compared with the female group (One sample Z-test, z-score= 2.96, $p < 0.01$), and more females were obtained in the $\geq 3+$ class group (z-score= -4.18, $p < 0.001$). No significant differences were detected for the other two species ($p > 0.05$ for both species).

The median age-days were 327, 294, and 275, and the maximum estimated ages were 7+, 5+, and 3+ years old for the American mink, European mink and European polecat, respectively.

<i>N. vison all</i>						<i>Males</i>					<i>Females</i>				
<i>x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>
0+	860	1.00	0.463	0.463	0.537	561	1.00	0.496	0.496	0.504	299	1.00	0.402	0.402	0.598
1+	462	0.537	0.318	0.592	0.408	283	0.504	0.301	0.597	0.403	179	0.598	0.348	0.582	0.418
2+	189	0.219	0.115	0.525	0.475	114	0.203	0.121	0.596	0.404	75	0.250	0.103	0.412	0.588
3+	90	0.104	0.060	0.576	0.424	46	0.082	0.054	0.658	0.342	44	0.147	0.074	0.503	0.497
4+	38	0.044	0.028	0.636	0.364	16	0.028	0.019	0.678	0.322	22	0.073	0.043	0.589	0.411
5+	14	0.016	0.008	0.5	0.5	5	0.009	0.008	0.888	0.112	9	0.030	0.01	0.333	0.667
6+	7	0.008	0.007	0.875	0.125	1	0.001	0	0	0	6	0.020			
7+	1	0.001				1	0.001								

<i>M. lutreola all</i>						<i>Males</i>					<i>Females</i>				
<i>x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>
0+	28	1.00	0.5	0.5	0.5	21	1.00	0.524	0.524	0.476	7	1.00	0.429	0.429	0.571
1+	14	0.5	0.215	0.43	0.57	10	0.476	0.334	0.701	0.299	4	0.571	0.143	0.250	0.750
2+	8	0.285	0.214	0.75	0.25	3	0.142	0.095	0.669	0.331	3	0.428	0.286	0.668	0.332
3+	2	0.071	0.036	0.507	0.493	1	0.047				1	0.142	0.142	1	0
4+	1	0.035	0	0	0						0	0	0		
5+	1	0.035									1	0.142			

<i>M. putorius all</i>						<i>Males</i>					<i>Females</i>				
<i>x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>	<i>f_x</i>	<i>l_x</i>	<i>d_x</i>	<i>q_x</i>	<i>p_x</i>
0+	29	1.00	0.552	0.552	0.448	18	1.00	0.667	0.667	0.333	8	1.00	0.25	0.25	0.75
1+	13	0.448	0.242	0.540	0.46	6	0.333	0.056	0.168	0.832	6	0.75	0.625	0.06	0.94
2+	6	0.206	0.103	0.5	0.5	5	0.277	0.166	0.599	0.401	1	0.125	0	0	1
3+	3	0.103				2	0.111				1	0.125			

x : age class; *f_x*: frequency; *l_x*: survival; *d_x*: mortality; *q_x*: mortality rate; *p_x*: survival rate

Table 7 Static life history table of the three species according to Caughley (1977).

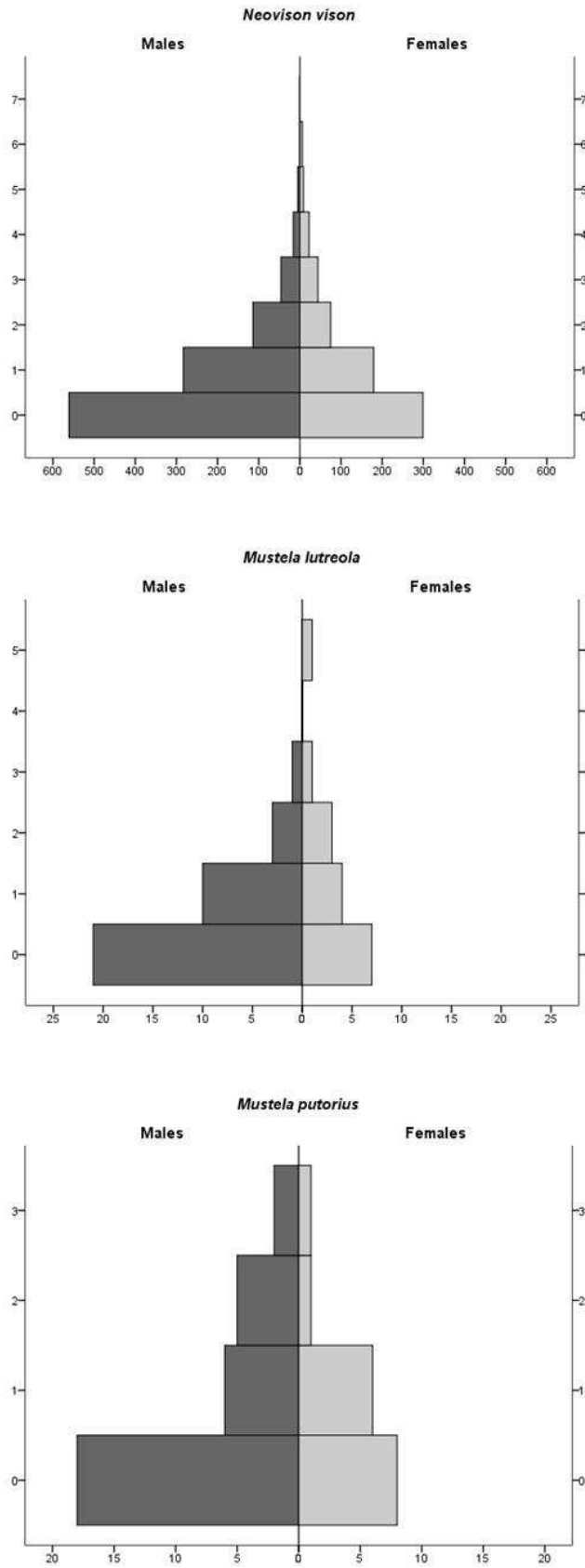


Fig. 12 Pyramid population structure of the three mustelids species studied.

		n	Number 0+ (sub-adult ratio) ^a	Day-old at death date (Mean (±SD))
<i>Neovison vison</i>				
All samples:	All	1644	852 (1.07)	535 (± 440)
	Male	1016	554 (1.2)	503 (± 394)
	Female	628	298 (0.9)	587 (± 500)
Period:	Pre-reproductive	952	369 (0.63)	673 (± 453)
	Post-reproductive	692	483 (2.31)	345 (± 337)
Death cause: Capture-euthanasia:	All	1598	827 (1.07)	537 (± 440)
	Male	981	535 (1.2)	505 (± 397)
	Female	617	292 (0.9)	588 (± 498)
Road casualties:	All	34	17 (1)	501 (± 436)
	Male	26	13 (1)	467 (± 310)
	Female	8	4 (1)	610 (± 731)
<i>Mustela lutreola</i>				
All samples:	All ^b	54	28 (1.07)	487 (± 430)
	Male	35	21 (1.5)	402 (± 319)
	Female	16	7 (0.77)	547 (± 534)
Period:	Pre-reproductive	26	9 (0.53)	601 (± 334)
	Post-reproductive	28	19 (2.11)	382 (± 485)
Death cause: Road casualties:	All ^b	37	18 (0.95)	483 (± 398)
	Male	28	15 (1.15)	438 (± 341)
	Female	6	3 (1)	354 (± 367)
<i>Mustela putorius</i>				
All samples:	All ^c	51	29 (1.32)	435 (± 381)
	Male	31	18 (1.38)	475 (± 415)
	Female	16	8 (1)	420 (± 332)
Period:	Pre-reproductive	22	7 (0.46)	663 (± 366)
	Post-reproductive	29	22 (3.14)	263 (± 295)
Death cause: Road casualties:	All ^c	45	24 (1.14)	438 (± 383)
	Male	27	15 (1.25)	493 (± 421)
	Female	14	7 (1)	403 (± 325)

^a Number 0+ (sub-adult ratio): number of animals less than one-year-old and ratio of this group

^b three animals with not determined sex

^c four animals with not determined sex

Table 8 Sub-adult ratio (0+ class) and day-old analysis of the different species separated by sex, period and cause of death. Only animals with a known date of death are included.

Mortality

Frequencies of mortality (dx) in the 0+ age class were 0.46, 0.50 and 0.55 for American mink, European mink and European polecat, respectively. In all three species, mortality was higher in the male group than in the female group, with significant differences in the American mink ($p < 0.01$) and European polecat ($p < 0.05$) (Table 7).

In road casualties, no differences were detected between species or sex of animals, except in the case of the American mink. In this species, male deaths by road casualty were significantly younger (mean of 467 days old) than females (mean of 610 days old) ($F_1=7.392$, $p = 0.01$). No significant differences were detected in the other two species ($p > 0.05$). No age differences were observed between captured and road casualties in American mink ($F_1=0.380$, $p = 0.54$).

Discussion

In this study, we describe the demographic structure of three mustelid species in Spain based on the collection and analysis of wild carcasses. The sample sources in demographic studies often contain origin biases, and males and sub-adult animals are often over-represented (Buskirk and Lindstedt 1989; Kristiansen et al. 2007). The causes involve sexual behavioral differences due to reproduction, care of young, searching for females or patrolling of home range boundaries. Sub-adults animals because they are dispersal animals with higher locomotor activity (Melero et al. 2011; Harrington et al. 2014), are likely more susceptible to road casualties or capture. The different sample origins between species in this study (trapping versus road casualties) should be considered carefully. The results might not reflect the true demographic structure of the population but will be useful to consider as a baseline for future studies with the same types of samples.

Male biases in samples

Higher proportions of males than females were recorded in both the pre- and post-reproductive periods for all three species. The differences are more noticeable in the pre-reproductive period, especially in the European mink and European polecat. The different

female behavior patterns prior to reproduction might be the cause of these differences. In the post-reproductive period, the sex-ratio differences are less remarkable, with significant differences only in the American mink.

The male bias observed is in accordance with that of other studies (Sidorovich and Macdonald 2001; Kristiansen et al. 2007). Buskirk and Lindstedt (1989) interpreted such results as differences in capture probabilities resulting from sex-specific home range sizes and higher locomotor activity and capacity in males. Similar behaviour also has been described in the European mink (Palazón 1998) and European polecat (Weber 1989).

Longevity

The maximum estimated ages were 7+, 5+, and 3+ years old for the American mink, European mink and European polecat, respectively. These differences can be attributed to the different sample sizes for the different species. The major sample size in the American mink could facilitate detection of extreme age values, but at the same time, the median age is also higher for the invasive species.

For the American mink, Bonesi et al. (2006) reported a maximum of six years of age from Estonian and UK samples (n=117). Persson et al. (2011) reported five years old as the oldest mink hunted in Sweden (n=117), and Whitman (2003) reported a single four-year-old in two American mink populations from Alaska and Idaho, USA (n=123). Therefore, our results on longevity presented a higher value than found in the literature, probably due to the larger sample size in our study.

The oldest age of the European mink (five years old) was in accordance with field observations from re-captured animals obtained in Spain since 2001 (M. Pödra, com. pers.). However, these values were lower than those recorded in specimens kept in captivity during the European mink breeding program in Spain in which certain animals reached ten years of age (our personal obsv.).

Adult European mink in the $\geq 4+$ age group represent 3.7% of all animals. This proportion is lower than that reported for Russia (15.4%) and Belarus (5.6% for males and 12.5% for

females) (Danilov and Tumanov 1976; Sidorovich 1997). These differences could be due to the declining status of this species in Russia and Belarus (Sidorovich 2001), a historical distribution area in which it is currently extinct (Maran et al. 2011).

In our study, as reported in Belarus (Sidorovich 1997) or in the Spanish captive breeding program, a higher proportion of females was detected in the older age group. The possible causes are unclear. In zones with American mink, the influence of this species must be taken in consideration. In other areas, the major mortality rate in males or poor adaptation to captivity are possible responsible factors.

In the European polecat, the oldest animals were adults 3+ years old, which was lower than the value observed in other studies. Ansorge and Suchentrunk (2001) reported a 6+ year-old European polecat from Austria and Germany (n=249), and Kristiansen et al. (2007) presented a single 5+ year-old female from Denmark (n=239). These differences could be related to the lower number of samples, but high mortality in the species due to unknown causes cannot be not fully discounted.

Demographic structure

Demographic patterns were highly similar for the three species, with a high percentage of the sub-adult population. As a whole, our results show a sub-adult ratio of 1.07 for the American and European mink and 1.32 for the European polecat. Differences in the sub-adult ratios were detected between the post- and pre-reproduction periods in all three species, mainly in the case of the European polecat. The relative weight of this age class varied from 75.8% in the post-reproductive period to 31.8% in the pre-reproductive period. In all three species, a high mortality was detected in this age group during the dispersal-winter period.

Alexander (1958) and Whitman (2003) used sub-adult ratios to analyze the population trends and culling effects. A high percentage of young individuals usually indicates a rapidly increasing population, and a low percentage denotes a decreasing population. The American mink is expanding in Spain and presents an intermediate sub-adult ratio compared with other expanding American mink populations. Sidorovich (1997) found a sub-adult ratio of

4.88 in the Belarusian American mink population during the period of expansion. However, in our study area, which also contains an expanding American mink population, the sub-adult ratios were much lower: 0.63 during the pre-reproductive period and 2.31 during the post-reproductive period (1.07 in the entire population). This result indicates that the species could be expanding with an intermediate sub-adult ratio. The sub-adult American mink survival rate is higher than that of the other two species and is likely related to the invasive process.

The sub-adult ratio of the European mink in our study area was higher (1.07) than those observed in Russia and Belarus (Danilov and Tumanov 1976; Sidorovich 1997), where the sub-adult ratio of both sexes ranged from 0.33 to 0.64. In Spain, the European mink presented a different demographic pattern in zones with or without the presence of American mink. In the Basque Country (American mink present), the European mink showed a sub-adult ratio of 0.64, and the population is currently in decline, whereas in other distribution areas (La Rioja, Navarre, Castilla-Leon and Aragon), where samples were obtained before arrival of the invasive species, the sub-adult ratio was higher (1.58). Similar results were obtained in Belarus (Sidorovich 2001), where the sub-adult ratio decreased during coexistence of both mink species and prior to the extinction of the European mink. Currently, the American mink is expanding and colonizing new areas inside the European mink distribution area (MAGRAMA 2014). For the European mink demographic structure, considering the Belarus and Russia results, we expect a decrease in the sub-adult ratio and an increase in the older age class and in the male:female ratio, all as a previous step in the total extinction of the native species (Maran 2007).

In the European polecat, the mean sub-adult ratio of 1.32 was less than values obtained by Ansorge and Suchentrunk (2001) in two stable European polecat populations from Austria and Germany (2.46 and 1.39). We found the highest percentage of young animals in this species in the post-reproductive period (3.14) and the lowest value in the pre-reproductive period (0.46) compared with the other two species. This species shows the highest mortality during the dispersal-winter period due to unknown causes. In our study, this species is also the species with lower longevity. The European polecat shows a decreasing population in Spain (Virgos 2007), and studies on mortality causes in this species require further attention. No differences were detected between species when the ages of animal death by road

casualties were compared. We did not find significant differences in the demographic structure of the American mink for comparison of age of animal death by road casualties versus the captured/euthanized group. This observation might indicate that the ages of American mink that are captured and killed on the road are similar. Kristiansen et al (2007) found age differences between death causes in the European polecat. The sub-adult group was over-represented among road casualties, whereas older individuals were more likely to be trapped/shot. The same results were not found in our study in the American mink, but this could be a result of a relatively small sample size in our American mink road casualty group.

Population structures appear different if the samples are obtained in the pre- or post-reproduction period. Exact information and details on the origin date of the samples are required in future age population studies to avoid the influence of seasonal mortality and for detection of mortalities in different age groups. Because the age class distribution in the pre- and post-reproductive period shows significant differences, it should be taken into consideration if comparing studies with different sampling periods.

The American mink is more aggressive, versatile and it displays more efficient reproduction than the European mink and European polecat (Maran and Henttonen 1995; Maran et al. 1998b; Amstislavsky and Ternovskaya 2000; Sidorovich 2001; Pödra et al. 2013). We obtained a higher longevity-median age in American mink and a higher survival rate compared with those of the native species. These demographic parameters likely are also involved in the expansion of this invasive species.

The Spanish American mink population is subject to culling pressure to protect native species (MAGRAMA 2014). The overall results could be a useful tool in making management decisions and evaluating population trends.

3.4. Are we able to damage the population structure of invasive species through culling? Case study of American mink control in the Northern Iberian Peninsula.

Introduction

Invasive non-native species are recognized as one of the major drivers of biodiversity change across the world (IUCN 2000; Keller et al. 2011). The American mink (*Neovison vison*) was reported as the alien mammal with the highest impact on European biodiversity, affecting 47 native species (Genovesi et al. 2012). This species was imported into Europe for fur farming at the beginning of the 20th century (Dunstone 1993) and due to massive escape, farm damage, and deliberate release, feral mink populations were established in many European countries, including Spain (Dunstone 1993; Ruiz-Olmo et al. 1997). This mustelid was first recorded as a feral species in Spain by Delibes and Amores (1978) in Segovia in central Spain, and a few years later, several different populations were detected (Ruiz-Olmo et al. 1997), all still in the process of expanding (Bravo 2007; MAGRAMA 2014). Conservation management of endangered species often involves control of the American mink via trapping, as in the case of the critically endangered European mink (*Mustela lutreola*) (Bonesi and Palazon 2007; Pödra et al. 2013), and different removal strategies have been suggested to control or to eradicate this species at local level in continental or in island areas (Sidorovich and Polozov 2002; Bonesi et al. 2007; Harrington et al. 2009; Melero et al. 2010; Zabala et al. 2010; Porteus et al. 2012).

The American mink is a yearly seasonal breeder with facultative delayed implantation (Hansson 1947). Females breed in their first year of life and have a single litter per year. In Spain, the mating season begins in March, parturition occurs between the end of April and beginning of May with a mean litter size of 4-6 cubs (our unpublished data), and cub dispersion occurs between July and September (Larivière 1999; Amstislavsky and Ternovskaya 2000; Bravo 2007).

The sex and age structure of animals in culled populations can vary according to the method used, trapping efforts, trapping duration and species (Whitman 2003). For this reason, the methods and culling effects can result in different success levels, which may or may not achieve the intended goals. Correct age determination of free ranging animals is an

important tool in wildlife studies (Alexander 1958; Morris 1972). Age is impossible to determine visually in adult mink. In sub-adult mink, the baculum and selected osteological characteristics offer certain clues (Elder 1951; Lechleitner 1954; Greer 1957), but animals over eight months of age are difficult to distinguish from adults (Whitman 2003). In our experience, in field conditions and without the possibility of baculum and/or osteological characteristic examination, problems in separating sub-adult from adult animals begin at six months of age. Counting of cementum lines in teeth for age determination is a method widely applied in carnivores; currently, it is the only accurate method for estimating the age in years (Morris 1972; Dunstone 1993) and has been used in previous studies (Danilov and Tumanov 1976; Sidorovich 1997; Whitman 2003; Hammershøj 2004; Bonesi et al. 2006).

We studied the sex and age structure for three mink populations subjected to different trapping efforts during a long-term period. All three populations were in a period of expansion, and the carrying capacities of the habitats were considered much higher than required by the present populations. According to our hypothesis, if trapping efforts were successful in reducing population density, we would expect an unstable structure, an age reduction in individuals, and an increased sub-adult:adult ratio (Whitman 2003).

The aims of the study were to a) assess whether the populations react in a different manner according to the different culling procedures and intensities and whether these strategies result in changes in the demographic structure and b) identify simple and efficient indicators of successful trapping efforts.

Material and methods

In Spain, management actions of American mink populations vary according to the different administrative bodies, and as a consequence, the goals and methods are slightly different. In these different areas, controls consist of live trapping and culling. No private trappers are involved in such controls, and all efforts are enacted by government campaigns using their own personnel, rangers or specific professional trappers from the research teams.

The Spanish American mink distribution in 2007 (adapted from Bravo 2007) and the three different study areas are shown in Fig.13. The samples were obtained from the Basque

Country (Alava Province), Central Spain (Burgos Province) and Catalonian populations. The riparian habitats in these three areas are quite similar and consist mainly of small-medium rivers.

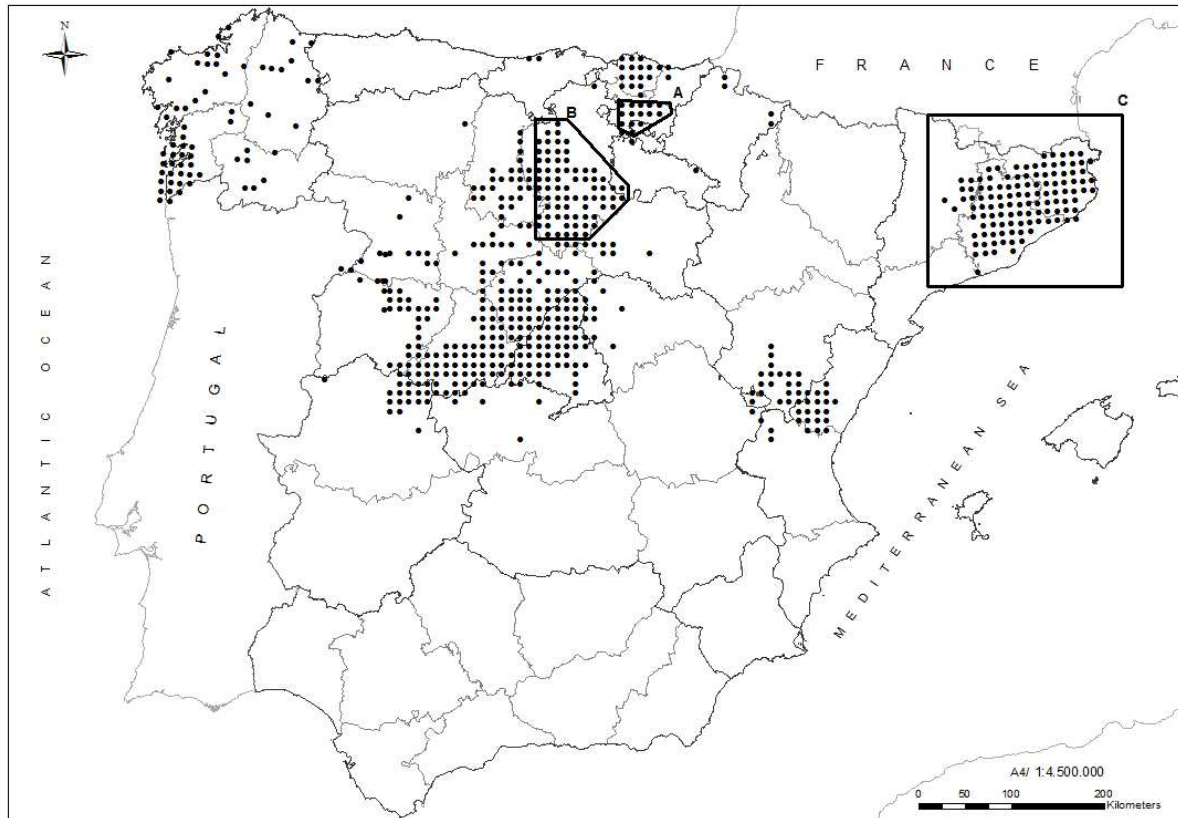


Fig. 13 The American mink (*Neovison vison*) distribution in Spain (adapted from Bravo 2007) with the three wild populations included in this study; A: Alava, B: Burgos and C: Catalonia. Distribution of the species in France and Portugal are not shown.

In Catalonia and in Burgos Province, culling is undertaken over large territories (11,400 and 7,800 km², respectively) based on the American mink distribution in 2007 (Bravo 2007). Eradication is a difficult task in these populations, according to the efforts applied, and the aims of culling are a reduction of the density and a halt to the expansion. The Catalonian population is not connected with other populations, and immigration is not possible. No presence of populations of this species in the French frontier was detected during the study period (Bonesi and Palazón 2007; Léger 2008). The Burgos population is a component of the Central Spain population.

In the case of Alava Province, the aim of trapping is the elimination of this isolated population, which covers a relatively small area (1,300 km²) and is considered an

independent population (Melero et al. 2012). The origin of this population and the associated river drainages are different than those of the rest of the Basque Country population (in the North side). The Alava rivers are included in the Ebro river basin (Mediterranean basin), whereas the remainder of the Basque Country rivers belongs to the Cantabric Sea. However, as the expansion process continues, we cannot discard occasional immigration to the Alava nucleus from the surrounding areas. Nevertheless, we assumed this group to be an isolated population. Table 9 shows information on the study areas. No controls on the invasive species were performed in the three areas prior to the current study.

Population	First recorded as a feral species ^a	Distribution area in 2007 (km ²) ^b	Official Goal	Number of traps-night Period 2002-2008 ^c (traps-night/km ² /year)	Mink trapped	Mink sent for age analysis
Alava	1991	1,300	Eradication	35,949 (3.95)	227	214
Burgos	1992	7,800	Containment - Control	51,221 (0.94)	753	674
Catalonia	1983	11,400	Control	39,440 (0.49)	747	418

^a A. Illana pers.com., Sancho 1995, and Ruiz Olmo et al. 1997

^b Bravo 2007

^c Trap-night is one trap out for one night checked dairy (MAGRAMA 2014). Regional Governments com. (unpublished)

Table 9 The American mink (*Neovison vison*) populations studied, including their size, official goals, capture effort, mink captured and mink sent for age analysis.

The last active mink farm in Alava was closed in 1998 (before the current study), no active farms were reported in Burgos, and only a small mink farm with good and effective measures for prevention of escaped animals was present in Catalonia during the study period. Therefore, we discarded the effect of new releases or escapes in our study.

The different goals for the trapping effort in the three study areas were:

a) Alava population: Eradication of the small and isolated population via an intensive trapping operation within the distribution area of European mink.

b) Burgos population: Reduction of the American mink density to avoid its expansion and prevent this species reaching the European mink distribution in the surrounding areas. The

goal is to keep the American mink away from the European mink population.

c) Catalanian population: Conservation of other native endangered species potentially predated by the American mink and potential conflict with fishing activities. Conservation of European mink is not the principal goal because this species is located 200 km away (Palazón and Ceña 2007).

In all three cases, mink were live trapped in single-entry 15x15x60 cm homemade wire cage traps authorized by the Autonomous authorities, and trapped animals were transported to official wildlife rehabilitation centers for euthanasia, following the legal requirements for the animal welfare. A trap night is defined as one trap out for one night that is checked daily in the morning (MAGRAMA 2014). No homogeneous trapping activities were performed among the different years and populations. During the 2002-2008 period, the mean trap-nights/year were 5,135 (SD=2,610; range= 2,275-9,889) in Alava, 7,317 (SD=3,188; range= 3,759-13,203) in Burgos and 5,634 (SD=3,681; range= 1,807-11,997) in Catalonia, and for the same period, the mean of trap-nights/km²/year were 3.95, 0.94 and 0.49, respectively. The trapping efforts were 4x and 8x higher for the Alava area than for the Burgos and Catalonia areas, respectively.

A total of 1,727 American mink were captured year-round during the described culling operation performed in the three populations, and a total of 1,306 samples were submitted for post-mortem analysis (Table 9).

Carcasses were frozen at -20°C as soon as possible after death and thawed immediately prior to the post-mortem examination. A canine tooth was removed from each specimen during the post-mortem and sent to the Matson Laboratory (Montana, USA) for age determination following standardized species-specific age analysis models (Matson 1981). Age reliability was rated as “A” (result nearly certain), “B” (error possible) or “C” (error probable) following a standard laboratory procedure corresponding to estimated accuracies of +/- 0, 1 and 2 years, respectively (Matson 1981). The accuracies of the estimated age for all samples processed were 92% for class A and 8% for class B. Only one case (0.08%) was classified as class C. Animals without cementum annuli and those with open apical foramen were classified as “*subadult*” or 0+ group (animals less than one-year-old), and samples with one

or more cementum annuli were classified as “*adult*”. We assumed a fixed date of birth of May 1st based on bibliography (Pilbeam et al. 1979; Sidorovich 1993; Bravo and Bueno 1999; Amstislavsky and Ternovskaya 2000; García-Díaz and Lizana 2013). For static life history analysis, we use the parameters from Caughley (1977).

The sex ratio, age and sub-adult ratio were studied in two types of periods:

a) Animals captured each year. In this case, animals captured between 1998-2001 and between 2005-2011 in Alava, between 1999-2001 in Burgos and between 1999-2002 and 2008-2009 in Catalonia were combined to avoid a low number of samples (Table 10), and

b) Animals in pre- and post-reproductive periods. Animals obtained between January 1st and June 30th were assigned to the “*Pre-reproductive period*”, and the “*Post-reproductive period*” included animals trapped between July 1st and December 31st.

We also determined the sub-adult ratio for the period between July 1st and October 31st, corresponding to a maximum sub-adult age of six months. No cubs were included in the study.

Alava				Burgos				Catalonia			
Period	N	male:fem (ratio)	SA:A (ratio)	Period	n	male:fem (ratio)	SA:A (ratio)	Period	n	male:fem (ratio)	SA:A (ratio)
1998-2001	17	14:3 (4.6)	10:7 (1.4)	1999-2001	15	12:3 (4)	4:11 (0.3)	1999-2002	38	26:12 (2.1)	25:13 (1.9)
2002	60	38:22 (1.7)	40:20 (2)	2002	54	40:14 (2.8)	24:30 (0.8)	2003	48	29:19 (1.5)	29:19 (1.5)
2003	65	42:23 (1.8)	39:26 (1.5)	2003	117	82:35 (2.3)	63:54 (1.1)	2004	66	39:27 (1.4)	27:39 (0.7)
2004	15	8:7 (1.1)	3:12 (0.2)	2004	135	77:58 (1.3)	31:104 (0.3)	2005	84	50:34 (1.4)	36:48 (0.7)
2005-2011	57	32:25 (1.2)	37:20 (1.8)	2005	105	64:41 (1.5)	64:41 (1.5)	2006	54	37:17 (2.1)	33:21 (1.5)
				2006	95	57:38 (1.5)	52:43 (1.2)	2007	81	54:27 (2)	43:38 (1.1)
				2007	77	56:21 (2.6)	58:19 (3)	2008-2009	37	20:17 (1.1)	24:13 (1.8)
				2008	76	48:28 (1.7)	33:43 (0.7)				

n: sample size
male:fem: male:female
SA:A: sub-adult:adult

Table 10 Total American mink (*Neovison vison*) studied in the different periods from the three defined populations.

Following the work of García-Perea and Baquero (1999) for Iberian wildcats (*Felis silvestris*), we propose a formula used to calculate the absolute age of adult mink in days (A)

as the result of the sum of days between May 1st to December 31st (245) plus the number of cementum lines (L) x 365 and the sum of days from January 1st to the death date (D).

$$A = 245 + (L \times 365) + D$$

For sub-adult animals, age in days was calculated as the sum of days between the estimated birth date and death date.

Sub-adults represent a high proportion of the overall populations and could be influenced by the trapping season, with maximum values occurring during the post-reproductive period. In our case, 70% of samples submitted to the study from Burgos were from the pre-reproductive period, and the samples from Alava and Catalonia represented 44% and 54%, respectively. To avoid influencing the results, we analyzed the age structure (measured in days) only for the adult mink.

A chi-square analysis was used to compare differences between sexes and periods. A one-sample Z-test was used to estimate differences in proportions, and ANOVA and the post-hoc Bonferroni test were used to compare differences between groups using IBM SPSS Statistics 19 software.

Results

From 1998 to 2011, a total of 1,306 American mink collected during official culling operations were submitted for study. For the populations, the numbers of animals sent for age analysis were 674, 418 and 214 for Burgos, Catalonia and Alava, respectively.

In comparing the number of trap nights used each year for a homogeneous distribution, significant differences in the yearly trapping efforts were found in all populations during the 2002-2008 period ($\chi^2 = 7,958$; 6 d.f.; $p < 0.001$ for Alava, $\chi^2 = 9,335$; 6 d.f.; $p < 0.001$ for Burgos and $\chi^2 = 14,431$; 6 d.f.; $p < 0.001$ for Catalonia). The mean numbers of mink captured during the same period were 0.63, 1.47 and 1.89 for each 100 trap/nights for Alava, Burgos and Catalonia, respectively. After 2004, this value remains under 0.5 in the case of Alava population. Evolution of the mink captured related to the trapping effort is shown in

Fig. 14.

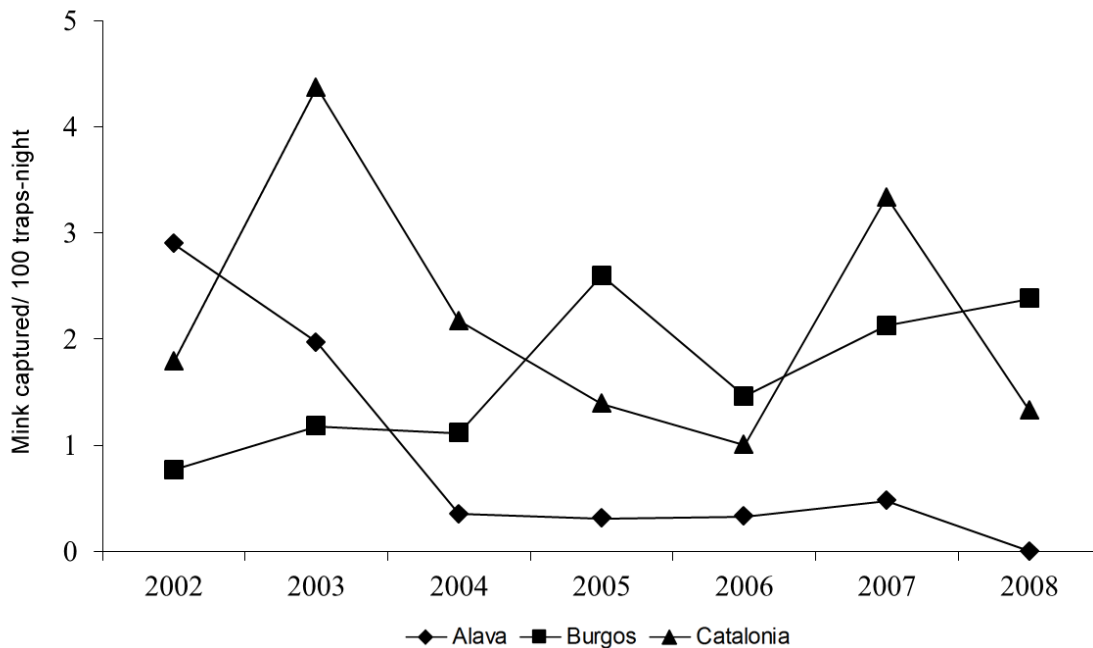


Fig. 14 Evolution of American mink (Neovison vison) captured for 100 traps/night in the three populations studied.

Sex ratio

We found significantly more males than females for all three studied populations. The ratio of male:female was 1.69 in Alava ($\chi^2 = 13.69$; $p < 0.01$), 1.82 in Burgos ($\chi^2 = 56.42$; $p < 0.01$) and 1.66 in Catalonia ($\chi^2 = 24.88$; $p < 0.01$) (1.75 males per female in the entire population, $\chi^2 = 95.50$; $p < 0.01$). No significant differences were found among the three populations ($\chi^2 = 0.580$; 2 d.f.; $p > 0.05$).

The female percentage was 36.8% (291/789) for the pre-reproductive period and 35.5% (180/507) for the post-reproductive period. No significant differences were obtained in comparison of the female percentage in the two periods for each population or differences among the three study areas (One sample Z-test; $p > 0.05$ in all cases).

In comparison of the female proportion in the yearly periods for each population, no significant differences were found and no variations were observed in this proportion during the study period (linear regression; $R=0.45, 0.543, 0.294$ for Alava, Burgos and Catalonia, $p > 0.05$ in all cases). No differences were detected from comparison of the proportion between the first and last year period for each population (before and after culling) (One

sample Z-test; $p > 0.05$ in all cases).

Age structure

Table 11 and Fig. 15 present the static life history table and the age-sex structures of all samples split by population. The oldest animals found were seven, five and four years old for Burgos, Catalonia and Alava, respectively and P_{75} (75% percentile) values for the adult animals were 2.93, 2.86 and 2.77 years, respectively.

Mortality rates (dx) for the 0+ age class were 0.40, 0.54 and 0.58 for Burgos, Catalonia and Alava, respectively. Significant differences were found between Burgos and the other two populations (Burgos vs. Catalonia, z-score= 3.22, $p < 0.01$; Burgos vs. Alava, z-score=3.49, $p < 0.001$). No differences were found between the mortality rates of Alava and Catalonia.

In the age-sex structures (Fig. 15), we found significant differences in the age structures between Burgos and Catalonia ($\chi^2 = 14.889$; 6 d.f.; $p < 0.05$) but not between Burgos and Alava ($\chi^2 = 4.799$; 6 d.f.; $p = 0.570$) or between Alava and Catalonia ($\chi^2 = 5.985$; 4 d.f.; $p = 0.200$). Differences between Burgos and Catalonia were caused by the significantly higher percentage of 2+ individuals in Catalonia (33.2% of adults) than in Burgos (20.6%) (One sample Z-test, z-score= -3.24, $p < 0.01$). However, for animals $\geq 2+$, the differences were not significant ($p > 0.05$).

X	Alava					Burgos					Catalonia				
	f_x	l_x	dx	qx	px	f_x	l_x	dx	qx	px	f_x	l_x	dx	qx	px
0+	129	1	0.582	0.582	0.418	329	1	0.402	0.402	0.598	222	1	0.541	0.541	0.459
1+	54	0.418	0.71	0.648	0.352	197	0.598	0.383	0.640	0.36	102	0.459	0.167	0.363	0.637
2+	19	0.147	0.085	0.578	0.422	71	0.215	0.079	0.367	0.633	65	0.292	0.198	0.678	0.322
3+	8	0.062	0.031	0.5	0.5	45	0.136	0.082	0.602	0.398	21	0.094	0.072	0.765	0.235
4+	4	0.031				18	0.054	0.03	0.555	0.445	5	0.022	0.009	0.409	0.59
5+						8	0.024	0.009	0.375	0.625	3	0.013			
6+						5	0.015	0.012	0.8	0.2					
7+						1	0.003								

x : age class; f_x : frequency; l_x : survival; dx : mortality; qx : mortality rate; px : survival rate

Table 11 Static life history table of the three studied populations of American mink (*Neovison vison*).

As a whole, the absolute age in days for captured mink (sub-adult and adult) varied from 603 in Burgos to 450 in Alava (Table 12), and the differences were significant between

Burgos and the other two populations ($F_2=13,324$; $p<0.01$). The mean absolute age in days were 688, 648 and 637 for the pre-reproductive periods and 401, 335 and 302 for the post-reproductive periods in Burgos, Catalonia and Alava, respectively.

For adult animals only, differences were significant between Burgos and the other two populations ($F_2=6,020$; $p<0.01$; post-hoc Bonferroni test). Significant differences in absolute age in days for adult animals only were obtained for the post-reproductive period ($F_2=3,226$; $p<0.05$) but not for the pre-reproductive period. No differences were detected for comparison of adult age between the first and last period of capture ($F=3,719$, 0.001 and 2.145; $p>0.05$ in all cases for Alava, Burgos and Catalonia, respectively).

In comparison of adult absolute age in days during the study period for the three populations (Fig. 16, 17 and 18), we did not find significant differences. In Alava, an increasing trend was noted for the absolute adult age during the study period, but no significant differences were observed (linear regression; $R=0.867$, 0.036, 0.621 for Alava, Burgos and Catalonia, $p > 0.05$ in all cases). However, for the yearly period, we found two exceptions for comparison between 2002 and 2004 in the case of the Alava population ($F_2= 3.510$; $p<0.05$) and 2002 and 2008 in the case of the Burgos population ($F_6= 2.277$; $p<0.05$).

Sub-adult ratio

Sub-adult animals represented 71% of the total population during the post-reproductive period for the three study areas (range 69-76%) and approximately 40% during the pre-reproductive period (range 39-40%) (Table 12). Differences were significant between the two periods for each population (One sample Z-test $p<0.05$ in all cases). No significant differences were found for comparison of sub-adult percentages in each reproductive period for the three studied populations (One sample Z-test, $p>0.05$ in all cases).

For the period between July 1st and October 31st, the sub-adult animal percentages were 80%, 76% and 74% in Alava ($n=56$), Burgos ($n=71$) and Catalonia ($n=123$). The sub-adult:adult ratios for the same period and populations were 4.09, 3.17 and 2.84, respectively.

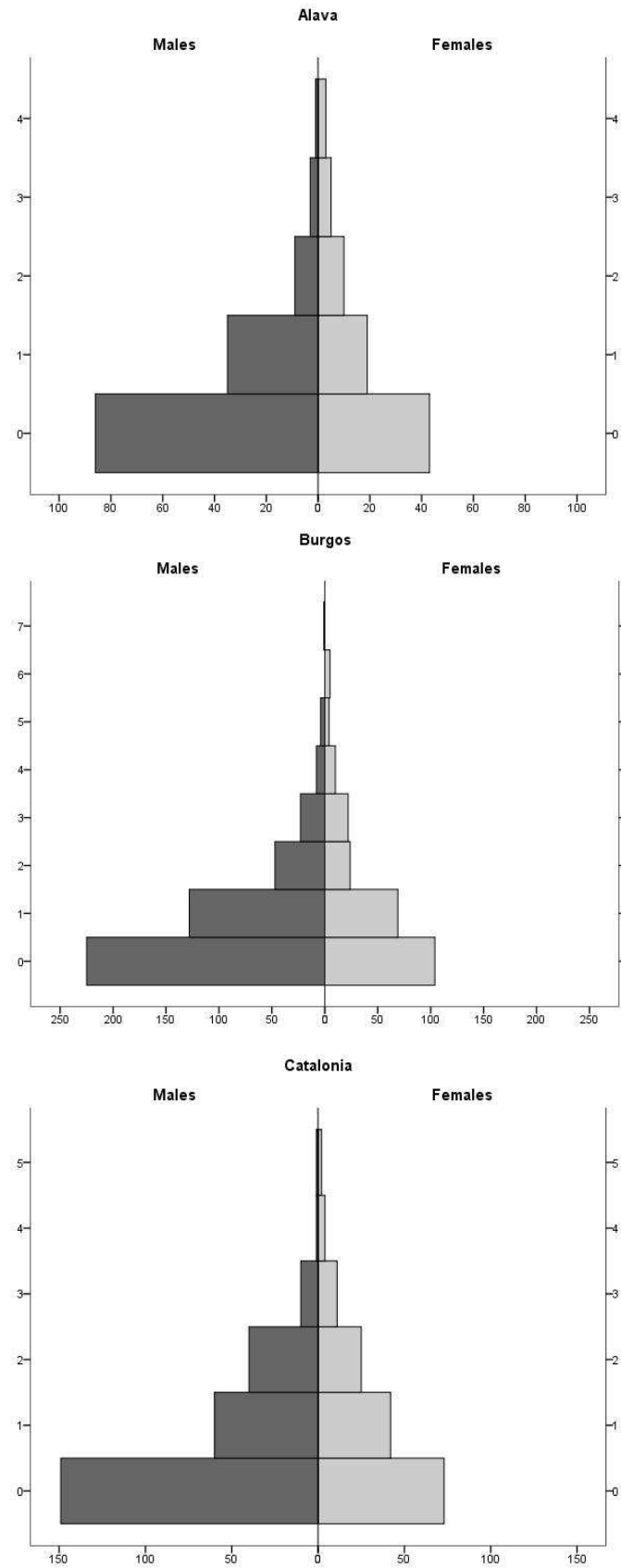


Fig. 15 Age-sex structures of the three American mink (Neovison vison) population studied.

	n	Mean	Range	SD	0+ (%)	Subadult:adult ratio
ALAVA						
All	214	450	70-1770	359	129 (60.3%)	1.51
Pre-reproductive period	94	637	249-1770	375	38 (40.4%)	0.67
Post-reproductive period	120	302	70-1313	267	91 (75.8%)	3.13
BURGOS						
All	674	603	90-2808	467	329 (48.8%)	0.95
Pre-reproductive period	475	688	248-2808	468	191 (40.2%)	0.67
Post-reproductive period	199	401	90-2030	399	138 (69.3%)	2.26
CATALONIA						
All*	408	504	55-2165	401	217 (53.2%)	1.13
Pre-reproductive period	220	648	55-2165	411	86 (39.1%)	0.64
Post-reproductive period	188	335	62-1671	314	131 (69.7%)	2.30

* Ten animals with unknown dates of death were not included in day-old analysis.

Table 12 Absolute age in days and sub-adult percentage of American mink (*Neovison vison*) studied from the three populations (n): sample size; (mean): mean age in days; (SD): Standard deviation; (0+ (%)): number of animals less than one-year-old and percentage of this group (in brackets).

In comparison of the sub-adult proportion in the yearly periods for each population, no significant differences were found and no variations were observed in this proportion during the study period (linear regression; R= -0.280, 0.525, 0.021 for Alava, Burgos and Catalonia, $p > 0.05$ in all cases). No differences were detected when the proportion between the first and last year period for each population were compared (One sample Z-test, $p > 0.05$ in all cases).

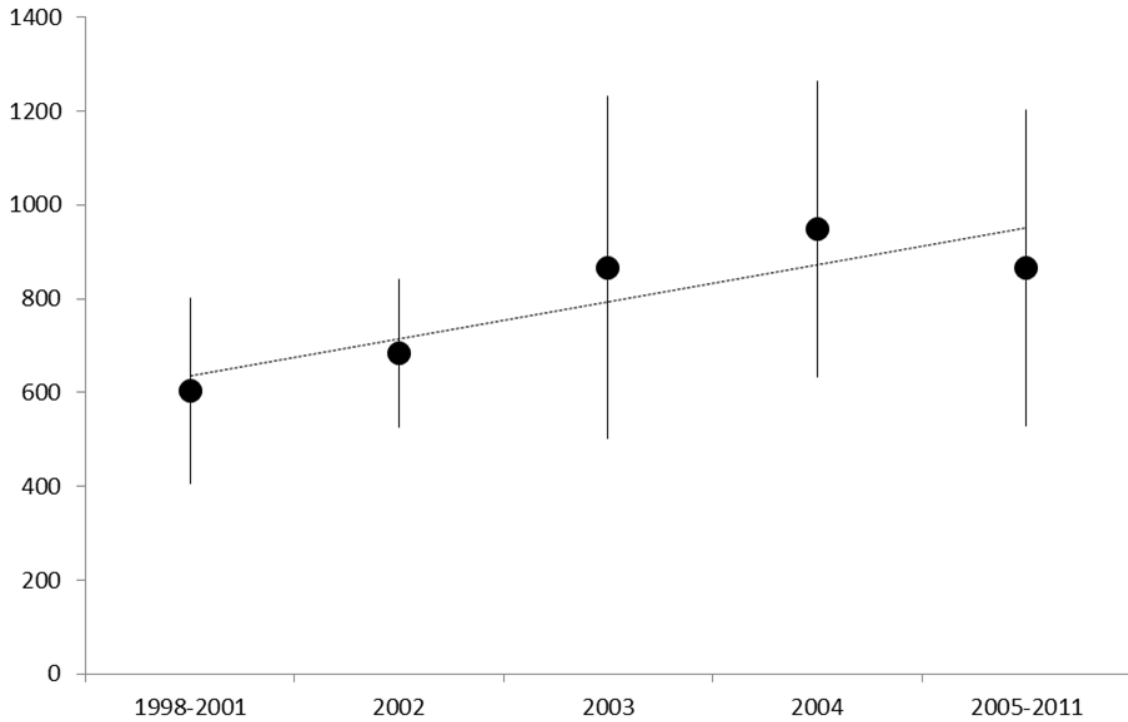


Fig. 16 The mean age in days and standard deviation evolution of adult American mink (*Neovison vison*) captured in Alava ($n=85$). Sub-adult animals were not included. The samples obtained between 1998 and 2001 and those from 2005 and 2011 were combined due to a small number of sample ($R=0.867$; $p=0.057$).

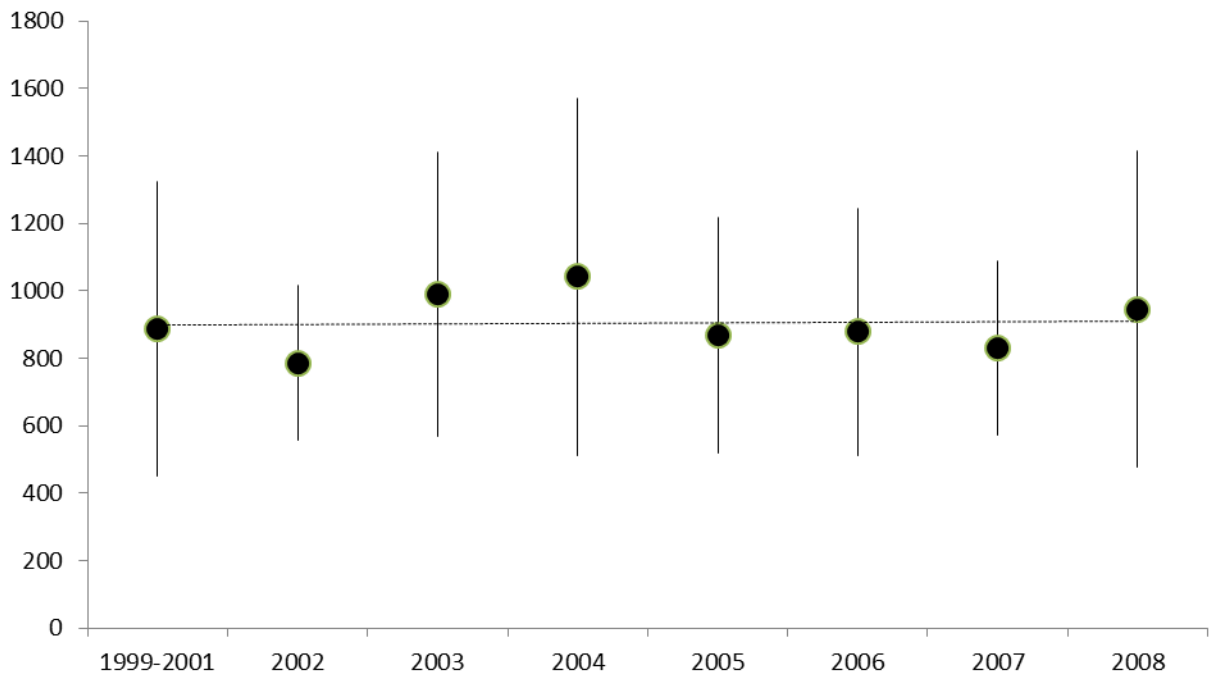


Fig. 17 The mean age in days and standard deviation evolution of adult American mink (*Neovison vison*) captured in Burgos ($n=343$). Sub-adult animals were not included. The samples obtained between 1999 and 2001 were combined due to a small number of samples ($R=0.036$; $p>0.05$).

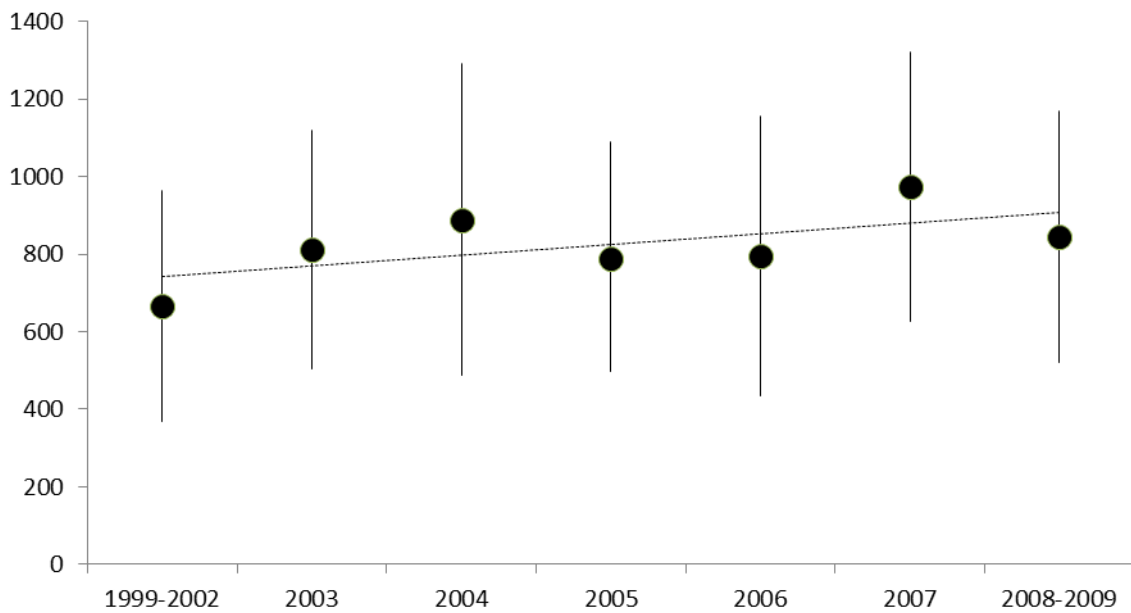


Fig. 18 The mean age in days and standard deviation evolution of adult American mink (*Neovison vison*) captured in Catalonia ($n= 191$). Sub-adult animals were not included. The samples obtained between 1999 and 2002 and those from 2008 and 2009 were combined due to a small number of samples ($R=0.621$; $p>0.05$).

Discussion

We studied the demographic structure of three American mink populations subjected to different trapping intensities in North Spain. One of the objectives was to assess whether the populations reacted in a different manner according to the different culling procedures and intensities and whether these efforts resulted in changes in the demographic structure. The other objective was to identify simple and efficient indicators of successful trapping efforts.

Three parameters were analyzed to determine whether culling had any effects in the three studied populations: sex ratios, absolute adult age in days, and sub-adult ratio. We expected a decreased age and an increased sub-adult ratio if culling had an effect on the populations.

Sex ratio

A male bias was detected for the trapping method used in all three study areas. Nevertheless, the percentage of females captured remained constant in all three populations during the study period, and no differences were detected for comparison of the female ratio between

the first and last yearly period. Male bias due to trapping does not result in modification of the captured sex ratio. Male biases in samples of various mustelid species were described by Buskirk and Lindstedt (1989) and interpreted as resulting from sex-specific home range sizes, higher locomotor activity and different behavior in the case of males. Such mechanisms might explain the high percentage of males trapped in all three studied populations, but no effects on the sex ratio were detected as caused by this bias.

Age structure

The static life history tables show a high mortality rate for animals within their first year of life. The sub-adult mortality was lower in Burgos (0.402) and higher in Alava (0.582), but in all cases, the values were lower than the results reported by Bonesi et al. (2006) from South Harris Island, UK, where the mortality of juveniles collected year-round was 0.65. The relatively high mortality rate among sub-adults might be especially influenced by culling, but natural causes, habitat quality, prey availability and diseases are also factors to be considered in a more detailed analysis to explain such values. Burgos is one of the Spanish mink populations with a major seroprevalence of Aleutian mink disease parvovirus (40.3%), but Catalonia has a lower rate (5.6%) (submitted).

The absolute adult age in days of the Burgos population was higher than the other two study populations, but no differences were noted in this parameter during the study period and between the first and last culling period in all three populations.

The mean absolute adult age in days was highly constant in Burgos and Catalonia. In Alava, an increasing tendency in the absolute adult age in days was detected, but the difference was not significant. Our initial hypothesis predicted a decreasing absolute adult age if culling had a positive result, but no decrease in the absolute adult age in days was detected in any study area.

Sub-adult ratio

The proportions of sub-adults (0+ age class) were similar between study areas through time, approximately 71% for the post-reproductive period and 40% for the pre-reproductive

period. The highest sub-adult ratio obtained was 3.13 in the post-reproductive period from Alava (study area with the more intensive trapping), which could be an effect of population response to intensive trapping (Sidorovich 1993; Whitman 2003). Sidorovich (1993) described a sub-adult proportion of 51-56% in stable populations and 78% in declining and overexploited populations. As a whole, the sub-adult percentages in the three studied populations were 49, 53, and 60% for Burgos, Catalonia and Alava, respectively. Such values suggest a low culling effect on the mink populations.

Demographic structures

According to the hypothesis, our results as a whole suggest that the three different culling operations that were analyzed failed to affect the demographic structure of the three American mink populations under study. The mean adult age and sub-adult ratio remained constant over time. Only Alava provides selected clues that could be interpreted as culling effects. The Alava population is associated with major trapping efforts and contains a younger population with a higher sub-adult percentage. The evolution of the American mink captured per 100 trap/nights (Fig. 14) allows us to consider that culling appears to have an effect in Alava. However, despite no significant result, the increasing absolute adult age trend during the study in this population is contrary to our initial hypothesis. Only an increased survival rate in the remaining population as effect of culling (Boyce et al. 1999) might explain the results if the trapping effort was successful. However, the carrying capacity of the habitat is much higher than required by the current and expanding Alava population, and culling probably does not increase the survival rate of the remaining population.

Lack of culling effect and mink expansion

The lack of effect of the culling actions performed in the three populations is in agreement with the expanding evolution of the American mink in these areas (MAGRAMA 2014).

Culling normally has less impact than expected in populations because of the principle of compensation, changes in life parameters, decreasing mortality and increasing survival rate (Boyce et al. 1999). Our results suggest that despite the different trapping efforts, all three

populations resulted in a stable age structure, without detectable effects within the population structure and without an apparent need to compensate for a culling effect.

Proportion of sub-adults in October: A tool as indicator of successful trapping efforts

Examination of baculum and/or osteological characteristics to distinguish sub-adult animals is only possible for animals up to eight months old (Whitman 2003). This period is comparable with our defined post-reproductive period (until December 31st). The sub-adult ratio in this period for the three populations studied varies from 2.26 to 3.13 (Table 12). If we assume no variations in other parameters that could have effects in the dynamic populations of the species (diseases, food shortages), the sub-adult ratio obtained in the post-reproductive period (animals until eight months old) must be higher than 3.13 to show possible repercussions on control of invasive species.

In field conditions without baculum and/or osteological characteristics examination, is useful to determine the sub-adult:adult ratio until October 31st. Until this date, it is easy to differentiate between sub-adult and adults. In this case, the sub-adult:adult ratio should be higher than 4.09 under trapping efforts to achieve repercussions on the population.

Recommendations

Trapping in different periods might have different effects on the success of the results. Culling of breeding females is more efficient than culling of young or dispersal animals. No differences were detected in the percentage of females captured in the pre-reproductive period (36.8%) compared with the post-reproductive period (35.5%), and thus, there is no specific period for capture of more females. Significant differences were obtained between the pre- and post- reproductive periods in the sub-adult age class, with a high mortality of this age class during the winter-dispersal period. The sub-adult percentage represented 71% of all animals in the post-reproduction period and 40% in the pre-reproduction period. Assuming that the three different culling operations failed to affect the demographic structure, in the framework of low economic resources, priority trapping in the pre-reproductive period is recommended.

The results obtained could be useful for increasing the effectiveness of American mink population management, and a better effort in culling campaigns, especially in the pre-reproductive period, is required to avoid population expansions.

The parameters used in the current study are simple and efficient indicators of successful trapping efforts. Control of the percentage of sub-adult animals is a useful method for auditing the effectiveness of control programs. A sub-adult ratio greater than 3.13 (December) or 4.09 (October) and trapping efforts greater than 3.95 traps/night/km²/year are required to have possible culling effects on the wild populations of American mink in our study areas.

El visón europeo muy probablemente se extinguirá del medio natural en los próximos años. Sólo una voluntad decidida y los medios económicos y materiales adecuados podrían evitarlo. La situación es crítica. En la población oriental, el “visón ruso” -como lo denominan allí- solo dispone actualmente de citas puntuales de presencia y se desconoce si cuenta con poblaciones relevantes en su área de distribución histórica, que ya está ocupada en su totalidad por el visón americano. La población del delta del río Danubio, en Rumania, vive amenazada por la presencia del visón americano justo en la frontera con Ucrania. En Francia no se han capturado ejemplares de la especie en los últimos años durante los trampeos específicos realizados y el visón americano ya ha colonizado el cauce principal del río Ebro en la Península Ibérica, principal reservorio del visón europeo. Un proyecto LIFE¹¹ en ejecución dirigido a la conservación de la especie puede ser la última oportunidad para evitar la extinción de la especie autóctona.

Aunque actualmente el visón americano es su principal amenaza y el factor definitivo en su desaparición, no están claras las causas históricas que han influido durante el largo proceso de extinción de la especie. La alteración del hábitat pudo influir más en los países del centro y este de Europa mientras que la caza excesiva podría ser la causa más importante en la Europa oriental. Los problemas sanitarios, transmitidos o no, por el visón americano, también han podido estar relacionados con el declive del visón autóctono. El presente trabajo intenta profundizar esta posible causa.

Estudio del AMDV en el visón europeo

Cuando a mediados de la década de los noventa se inició una línea de investigación en relación a los posibles problemas sanitarios en la especie, la información disponible era muy limitada. De todos los agentes patógenos que podrían afectar al visón europeo, el AMDV era potencialmente el más destacado debido a las características de la enfermedad, persistencia en el medio y por ser endémica y el principal problema de salud en visones americanos en todos los países productores, pero no se sabía nada sobre la enfermedad en la especie

¹¹ Life Lutreola Spain LIFE13/NAT/ES/001171.

autóctona. Hasta la fecha no se había realizado ningún estudio sobre el AMDV en el visón europeo, ni en el medio natural ni en ejemplares en cautividad.

En 1997, poco después de empezar el estudio, se detectó, por primera vez, el AMDV en el visón europeo (Mañas *et al.*, 2001). Los resultados preliminares del análisis genético de las cepas víricas presentes en España indicaban que eran diferentes a otras cepas descritas anteriormente. Tras su detección, los protocolos de captura del visón europeo y americano en la naturaleza incluyeron la extracción de sangre y realización de serologías rutinarias frente al AMDV. Asimismo, se contactó con los principales investigadores relacionados con la conservación de la especie a nivel europeo para alertar del posible problema sanitario, tanto en el medio natural como en cautividad.

Seroprevalencia y posibles efectos del AMDV

En el presente trabajo se ha realizado un estudio seroepidemiológico del AMDV en la Península Ibérica en las dos especies de visón durante el período 1997-2012. Los resultados indican que el AMDV es actualmente endémico, con una alta prevalencia y que está muy distribuido en las poblaciones de ambas especies. La seroprevalencia obtenida en visón europeo es del 32% (n=475), muy superior a la obtenida en Francia (18%, n=99) (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004) y con un incremento a lo largo del período de estudio en España. Visones europeos recapturados muestran una incidencia de 0.46 casos por animal-año de riesgo mientras que la incidencia de animales seropositivos que revierten a negativos es de 0.18 casos por animal-año de riesgo. La prevalencia en los visones europeos recapturados en nuestro estudio no es diferente significativamente a la obtenida en el conjunto de la población.

En visón americano la seroprevalencia obtenida es del 32.4%, prácticamente idéntica a la del visón europeo, con variaciones entre las distintas poblaciones. Las seroprevalencias más altas se han obtenido en Galicia (47%) – donde se concentra el 80% de las granjas peleteras- y en la población del centro de España (40.3%) mientras que la más baja se obtuvo en La Rioja -zona de nueva colonización- (18.5%) y en Cataluña (5.6%). La variación en la seroprevalencia en visón americano parece estar relacionada con el tiempo transcurrido desde la introducción del AMDV en cada población. En ambas especies se han obtenido

prevalencias del AMDV más bajas en zonas de nueva colonización (este de La Rioja y Aragón, en el caso del visón europeo y La Rioja en el caso del visón americano).

En el visón americano se ha determinado que la seroprevalencia del AMDV se incrementa con la edad de los animales, como se podría esperar en una infección crónica.

No se han detectado diferencias significativas en la prevalencia obtenida entre machos y hembras en ninguna de las dos especies. Los visones son animales territoriales, solitarios y presentan diferente ecología espacial, comportamiento y movimientos según el sexo. La obtención de una similar prevalencia entre sexos parece indicar que la transmisión vertical o perinatal y la infección durante las cópulas pueden ser más importantes en la transmisión del AMDV que otros modelos más ligados al comportamiento social. Padgett *et al.* (1967) y Porter *et al.* (1980) también sugieren que la vía vertical puede ser la vía para mantener el virus en la naturaleza y la forma de contagio más importante en animales de vida solitaria. No obstante, Aasted y Hauch (1988) detectaron que sólo el 15.4% de los visones americanos de granja se infectaban durante la cópula y que la concentración viral transmitida durante la misma era baja. Los mismos autores sugieren que bajas densidades de virus provocarían cuadros no progresivos de la enfermedad.

Parámetros reproductivos bajos (menos eficiencia reproductora) se han detectado en hembras infectadas de visón americano en cautividad (Jahns *et al.*, 2010). Nuestros resultados en visones americanos apoyan este hecho al detectar mayor porcentaje de hembras preñadas en el grupo de animales seronegativos (ratio hembras no preñadas seronegativas frente a las positivas de 0.4). No se ha podido valorar el número de fetos en hembras de visones europeos ya que en este estudio no se ha obtenido ninguna carcasa de hembras de visón europeo durante los meses de abril, mayo y junio.

En visones europeos en cautividad se están obteniendo actualmente una media de hasta 5 crías/parto en la población oriental y de 2.9 crías/parto (n=38) en la población occidental (la que corresponde a nuestra área de estudio) (M. Pödra, com. pers). Estos resultados proceden en su totalidad de hembras seronegativas al AMDV, en condiciones de cautividad y son cifras correspondientes a los 15 días posteriores a la fecha de nacimiento, que es cuando se realiza el primer control de las camadas. La diferencia de resultados reproductores entre las

poblaciones podría tener relación con la baja diversidad genética detectada en la población occidental. En nuestro estudio se ha detectado una media de 5.6 fetos por hembra de visón americano seronegativa preñada (datos correspondientes a la última mitad de gestación). Una disminución en los parámetros reproductores causada por el AMDV en el visón europeo puede tener grandes repercusiones demográficas, comprometer la viabilidad de la especie y ser uno de los factores que hayan podido contribuir en la desaparición de la especie en muchas zonas del Continente.

En el inicio de las poblaciones salvajes de visón americano en la Península Ibérica, la población situada en Galicia presentaba una menor velocidad de expansión en relación a las otras poblaciones Ibéricas, a pesar de contar con la mayor densidad de granjas peleteras (Ruiz-Olmo *et al.*, 1997). En esta población se ha detectado la prevalencia de AMDV más alta y podría haber influido en una menor velocidad de expansión. En cualquier caso, con las cepas víricas presentes en la actualidad en nuestra zona de estudio, el visón americano puede expandirse con altas prevalencias de AMDV.

La ausencia de diferencias en los pesos entre visones europeos positivos y negativos en el período pre-reproductivo sugiere que la infección no tiene efectos detectables en el peso de los animales. Animales con AD progresiva podrían tener menor capturabilidad o, alternativamente, estos efectos no se apreciarían hasta que se desarrollara un cuadro progresivo de la enfermedad

En Europa, además de estar presente en las poblaciones ibéricas de Carnívoros semiacuáticos, el AMDV está también presente en animales salvajes en Rusia (Skumatov, 2001; Mañas, 2001), Reino Unido (Yamaguchi y Macdonald, 2001); Francia (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004), Dinamarca (Jensen *et al.*, 2012), Estonia (Leimann *et al.*, 2015), Finlandia (Knuutila *et al.*, 2015) y Suecia (Persson *et al.*, 2015). De la población de visón europeo procedente del delta del río Danubio, en Rumania, sólo se han procesado cuatro muestras serológicas, todas ellas con resultado negativo (Mañas, 2005). El bajo número de muestras analizadas impide sin embargo valorar la situación sanitaria de esta población. En los estudios preliminares de secuenciación de las cepas de AMDV, Rusia presenta las mayores prevalencias y diversidad genética del virus (Mañas, 2001).

El AMDV es un virus muy variable y la patogenia depende de la cepa vírica. En relación a las pruebas de PCR y secuenciación destacar que la primera cepa del AMDV secuenciada en visón europeo no se había descrito anteriormente (Apartado 3.1) y estudios preliminares indican que existe una gran variedad de cepas en las poblaciones de visón europeo.

Origen de la infección por el AMDV en el visón europeo

Con la información disponible actualmente aún es imposible determinar el origen del AMDV en el visón europeo, desde cuándo está presente el virus en la especie autóctona, así como el papel que haya podido tener en su histórico proceso de regresión. Se ha descrito el papel de las granjas de visón americano como fuente de transmisión del AMDV a los animales de vida libre (Nituch *et al.*, 2011) mientras que en otros estudios no se ha podido determinar esta relación (Knuuttila *et al.*, 2015). También se ha descrito la implicación de animales salvajes en la reinfección de granjas saneadas o en la aparición de nuevos brotes de la enfermedad (Ellis *et al.*, 1995; Espregueira-Themudo *et al.*, 2011; 2012). En cualquier caso, desde que el AMDV es común en las granjas peleteras, se han de tomar las medidas necesarias para no introducir el virus al medio ambiente desde las mismas (Hansen, 1985). La alta prevalencia obtenida y la gran área de distribución del AMDV hacen imposible realizar una aproximación a su origen sin analizar con detalle todas las cepas del virus y su distribución.

Hay que recordar en este sentido que la cría en cautividad del visón americano con fines comerciales no se inició hasta 1866 en los Estados Unidos (Kellogg *et al.*, 1948) y que no fue hasta 1920 que se empezaron a establecer las primeras granjas peleteras en Europa. El visón europeo ya había empezado a desaparecer del centro de Europa lo que cuestiona a esta enfermedad como la causa que inició el proceso de rarefacción, aunque no invalida su efecto. En España, al igual que sucede en Francia (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004), se ha detectado la presencia del virus por toda su área de distribución, con animales seropositivos alejados, tanto del área de distribución del visón americano, como de granjas peleteras. Así, aunque la hipótesis más lógica en relación al origen de la infección es situarla en el visón americano y las granjas peleteras, un origen en otro mustélido no está excluido (Knuuttila *et al.*, 2009). Este hecho podría relacionar el AMDV y la regresión del visón europeo antes del establecimiento en Europa de granjas peleteras de visón americano.

En Cataluña el turón europeo se encuentra en peligro de extinción y su área de distribución se limita principalmente a la zona de l'Alt y Baix Empordà (Palazón *et al.*, 2010). Se detectaron turones de esta población positivos al AMDV por serología y PCR y lesiones compatibles con la enfermedad (Mañas, 2001) sin que existiera relación con poblaciones libres de visón americano. La única granja existente en la zona (T.M. Ullastret, Girona, cerrada en el año 2012) realizaba controles sanitarios con resultados negativos al AMDV (datos propios inéditos) mientras que hasta el año 2005 no se detectó el primer visón americano positivo al AMDV en Cataluña, después de analizar más de 70 visones americanos de esta población con anterioridad a esta fecha. La prevalencia del AMDV en Cataluña es la más baja (5.6%) en comparación con las otras poblaciones de la especie, congruente con una aparición reciente.

Si el origen de la infección en el visón europeo o en el turón europeo son las granjas de visones americanos –actuales o pasadas- o las poblaciones libres de la especie invasora, el AMDV se ha tenido que expandir mediante dispersión de ejemplares, otras especies con las que pueden compartir hábitat, como la nutria, aves, hurones domésticos o la utilización entre zonas de material de trampeo o de otro tipo, sin desinfectar.

El virus del AMDV es un virus viejo o que acumula cambios con más velocidad que en otros parvovirus (Gattschalck *et al.*, 1994). Existe la posibilidad de que el virus estuviese presente en los carnívoros semiacuáticos europeos antes de su detección en Estados Unidos en 1956. La aparición de los visones americanos aleutianos habría facilitado la detección del AMDV al ser la variedad más sensible al parvovirus y al hecho de encontrarse en cautividad.

Repercusión del AMDV en la conservación del visón europeo

Debido a la situación crítica del visón europeo, todos los factores negativos pueden tener una gran repercusión en su conservación. A pesar de no haber observado ningún efecto negativo obvio en los visones europeos seropositivos, la AD puede potencialmente afectar la supervivencia de la especie y se deberían tomar medidas para evitar la transmisión del AMDV a la población de visón europeo. Es necesario implantar protocolos de bioseguridad en las granjas peleteras así como en los visones europeos capturados para evitar la difusión del AMDV e incorporar únicamente animales seronegativos a los programas de cría en cautividad.

Se desconocen los posibles efectos que puede tener el AMDV en visones europeos en cautividad. Hasta la fecha, no se ha detectado ningún caso de AMDV en visones europeos cautivos, ni en el programa oriental ni en el occidental. Los 36 visones europeos analizados procedentes del programa oriental de cría en cautividad de la especie (zoológico de Tallin, Estonia, principalmente) resultaron negativos frente al AMDV (Mañas, 2005) y el protocolo de cuarentena del programa de cría en la población occidental incorpora el AMDV como uno de los factores excluyentes en los periodos de cuarentena para su incorporación al programa (Mañas *et al.*, 2003; MAGRAMA 2009), no detectándose hasta la fecha ejemplares seropositivos en cautividad.

Cualquier posible efecto, tanto en la susceptibilidad a otras infecciones como en la disminución de los parámetros reproductores, ya de por sí bajos en el visón europeo, podría tener graves repercusiones demográficas y comprometer la viabilidad de la especie.

Estudio demográfico

Como se ha comentado, el AMDV es una enfermedad principalmente crónica. Durante el presente estudio se ha dedicado una especial atención a la demografía de las poblaciones con la finalidad de detectar el posible efecto de patologías. Los resultados obtenidos han permitido describir la estructura demográfica básica del visón europeo, americano y del turón europeo, tres especies similares, con diferente estatus de conservación que pueden compartir patologías, además de hábitat (Apartado 3.3). En el caso del visón americano, también ha permitido analizar las posibles repercusiones demográficas en tres poblaciones sometidas a diferente intensidad de control durante un largo período de tiempo así como determinar un indicador simple y eficiente para valorar el éxito de los esfuerzos de trampeo (Apartado 3.4).

La correcta determinación de la edad en los animales salvajes es un aspecto básico en la realización de estudios demográficos (Alexander, 1958; Morris, 1972). En nuestras especies de estudio, determinar de forma precisa la edad en animales de más de ocho meses de edad es imposible (Whitman, 2003). Hasta esta edad, el báculo y diversas características osteológicas ayudan a diferenciar subadultos de adultos (Elder, 1951; Lechleitner, 1954; Greer, 1957). Según nuestra experiencia, los problemas para distinguir visualmente animales subadultos de adultos, sin valorar el báculo ni características osteológicas, se presentan a partir de los seis

meses de edad. En cualquier caso, para determinar correctamente la edad de los animales y detectar cambios demográficos es necesario utilizar un método alternativo.

La determinación de la edad mediante el análisis de los cortes histológicos en las piezas dentales se describió por primera vez por Scheffer (1950) y Laws (1952), que observaron un patrón de líneas de crecimiento en dientes procedentes de mamíferos marinos. Estas líneas de crecimiento presentan sincronía entre estaciones y están influenciadas por las condiciones ambientales. Desde entonces, el recuento de las líneas del cemento dental en cortes histológicos es un método ampliamente utilizado en Carnívoros y es la forma más precisa para estimar la edad en nuestras especies de estudio (Morris, 1972; Grue y Jensen, 1979; Dunstone, 1993), usado en trabajos anteriores (Danilov y Tumanov, 1976; Sidorovich, 1997; Whitman, 2003; Hammershøj, 2004; Bonesi *et al.*, 2006b).

El origen de las muestras en los estudios demográficos a menudo produce un sesgo en los resultados. Machos y animales subadultos suelen estar sobre representados debido probablemente a la diferente probabilidad de captura del método utilizado, diferente tamaño de territorio y diferentes comportamientos y actividad locomotora, tal como describen Buskirk y Lindstedt (1989). En nuestro estudio, las muestras dentales de visones americanos proceden de las campañas oficiales de control de esta especie exótica invasora mientras que los atropellos son las causas de muerte principales en las muestras de visón europeo y turón europeo. La diferencia en el origen de las muestras en el presente estudio (trampeo – atropellos) se ha de tener en consideración. Los resultados pueden no reflejar la estructura demográfica exacta o real de la población, pero son útiles como información básica para futuros estudios con el mismo tipo de muestras. Además, en las muestras de las tres especies y en las tres poblaciones de visón americano, al ser obtenidas de la misma forma oportunista, los sesgos que presenten han de ser los mismos, por lo que nuestra atención se ha de fijar en las diferencias, especialmente de la tasa de mortalidad y proporción de animales subadultos, que es nuestro principal objetivo

Se han procesado más muestras procedentes de machos que de hembras, tanto en el período pre-reproductivo como en el post-reproductivo en las tres especies, especialmente en el período pre-reproductivo en el visón europeo y turón europeo, probablemente debido a los patrones de comportamiento de las hembras en dicho período.

La edad máxima detectada ha sido de 7+, 5+ y 3+ y la edad media en días de 327, 294 y 275 para visón americano, europeo y turón, respectivamente. Los resultados de longevidad en visón americano representan los valores más altos obtenidos al compararlos con diferentes estudios realizados en la misma especie (Whitman, 2003; Bonesi *et al.*, 2006; Persson *et al.*, 2011). Los resultados en visón europeo están en concordancia con los resultados obtenidos en las recaptura de animales identificados seguidos en el medio natural (M. Pödra, com. pers.) aunque inferior a los resultados obtenidos en animales en cautividad (pers. obs.) mientras que en el caso del turón europeo se han obtenido los valores más bajos en comparación a otros estudios similares realizados en Europa, probablemente como resultado del menor tamaño de muestra en nuestro estudio (Ansorge y Suchentrunk, 2001; Kristiansen *et al.*, 2007).

La estructura demográfica de las tres especies es muy similar, con un alto porcentaje de animales subadultos en la población. En conjunto, la *ratio* de animales subadultos: adultos fue de 1.07 para el visón americano y el europeo, y del 1.32 para el turón europeo. Este porcentaje varía mucho entre el período post-reproductivo y el pre-reproductivo en las tres especies, lo que sugiere una alta mortalidad en esta clase de edad durante el período de dispersión - invierno, especialmente en el caso del turón europeo. En esta especie, el peso relativo de esta clase de edad varía del 75.8% en el período post-reproductivo al 31.8% en el período pre-reproductivo. La distribución de las clases de edad en los periodos post y pre-reproductivo tienen diferencias significativas y se han de tener en consideración al comparar estudios con diferentes periodos de muestreo. En cualquier caso demuestran una elevada mortalidad en los animales subadultos dispersantes durante el período invernal.

Visones europeos con 4 o más años de edad representan el 3.7% de todos los animales. Esta proporción es inferior a la descrita en Rusia (15.4%) o en Bielorrusia (5.6% para machos y 12.5% para hembras) (Danilov y Tumanov, 1976; Sidorovich, 1997). Estas diferencias pueden ser debidas a la situación de disminución poblacional en estas áreas y a la presencia del visón americano (Sidorovich, 2001b). En nuestro estudio, el visón europeo presenta diferentes parámetros demográficos en zonas con presencia o ausencia de visón americano. En zonas con visón americano, el visón europeo está en regresión y presentó una *ratio* de animales subadultos de 0.64 mientras que zonas muestreadas antes de la invasión de la

especie alóctona mostraron una ratio de animales subadultos mayor (1.58) aunque con diferencias no significativas ($p=0.053$). Resultados similares se obtuvieron en Bielorrusia (Sidorovich, 2001b), donde la proporción de animales subadultos decreció durante la coexistencia de las dos especies, antes de la extinción del visón europeo. Tras los resultados obtenidos y la evolución de las poblaciones en Rusia y Bielorrusia –población ya extinguida- (Danilov y Tumanov, 1976; Sidorovich, 1997), se espera en la población Ibérica de visón europeo una disminución generalizada de la ratio de subadultos, un incremento de la edad de los animales (en ausencia del posible efecto de enfermedades) y un incremento de la *sex-ratio*, todo ello como paso previo a la total extinción del visón europeo como ya sucedió previamente (Maran, 2007).

El turón europeo presenta una ratio de animales subadultos más elevada en el período post-reproductor (3.14) y, al mismo tiempo, la ratio más baja en el periodo pre-reproductivo (0.46) lo que sugiere la mayor mortalidad de animales subadultos en el período de dispersión-invierno en comparación con las otras dos especies estudiadas. Debido a la tendencia poblacional que presenta la especie en España (Virgos, 2007), se deberían desarrollar estudios dirigidos a estudiar las causas de mortalidad en la especie.

A diferencia de otros estudios, no se detectaron diferencias significativas en la edad absoluta de los visones americanos atropellados y capturados-sacrificados, probablemente como resultado del menor número de muestras en el grupo de animales atropellados. Tampoco se detectaron diferencias al comparar la edad de los animales atropellados de las tres especies, lo que indica que en las tres especies las edades de los ejemplares más susceptibles de ser atropellados son similares (animales sub-adultos, principalmente).

A nivel reproductivo el visón americano presenta muchas ventajas respecto a las especies autóctonas como la posibilidad de tener implantación diferida y crías de la misma camada procedentes de diferentes padres (Yamaguchi *et al.*, 2004), un periodo reproductor anterior así como un mayor número de crías por camada. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una mortalidad menor y una mayor longevidad del visón americano en relación a las especies autóctonas, lo que podría ser otro de los factores a tener en consideración como parte de una estrategia de éxito que explicaría su proceso de expansión. Estos valores, junto

a un menor tamaño y una menor agresividad en las especies nativas suponen una clara desventaja de éstas respecto al visón americano.

Estructuras demográficas en tres poblaciones de visón americano sometidas a diferente intensidad de control

En relación al estudio demográfico en tres poblaciones de visón americano sometidas a diferente intensidad de control, tres fueron los parámetros que se utilizaron para detectar posibles efectos del trampeo en la demografía: la ratio entre sexos, la edad absoluta en animales adultos y la ratio de animales subadultos. Según la hipótesis inicial, se esperaba una disminución de la edad absoluta de los ejemplares adultos y un incremento de la ratio de subadultos si los controles tenían repercusión en la demografía de las poblaciones. La *sex-ratio* se valoró para determinar si los trampeos influían en este parámetro ya que normalmente éstos presentan un sesgo en las capturas hacia el grupo de machos.

Tal como describen Buskirk y Lindstedt (1989), en nuestro estudio también se procesaron más muestras de machos que de hembras en las tres poblaciones y periodos. A pesar de ello, la *sex-ratio* no se vio afectado por el trampeo y la proporción de hembras se mantuvo constante durante el periodo de estudio en las tres poblaciones indicando que a pesar de que el método de trampeo tiende a capturar más machos el *sex-ratio* no ha variado durante el período de estudio.

En relación a la edad absoluta de los ejemplares adultos, ésta se mantuvo constante durante el periodo de estudio en Burgos, Cataluña y Álava. Aunque con diferencias no significativas, en esta última población se produjo un incremento de esta edad durante el estudio, de forma contraria a nuestra hipótesis inicial que contemplaba una disminución de la edad adulta si el control tuviera un efecto sobre la demografía de la especie. En ninguna de las tres poblaciones se produjo una disminución de la edad absoluta en animales adultos.

Se detectaron diferencias significativas en esta ratio al comparar los periodos pre- y post-reproductivo en las tres poblaciones. Asimismo, la ratio de animales subadultos se mantuvo también constante y en valores bajos en relación a otros estudios realizados en Europa. La ratio más alta de animales subadultos se obtuvo nuevamente en Álava, lo que sugeriría un

posible efecto del trampeo, aunque esta ratio de animales subadultos es inferior a otras obtenidas en poblaciones de visón americano en expansión o sometidas a fuerte presión cinegética (Sidorovich, 1993; Whitman, 2003).

Según nuestras hipótesis iniciales, en general, los resultados sugieren que en los tres casos las intensidades de control fallaron en relación a su afectación de la estructura demográfica de las tres poblaciones. Solamente en Alava –población con el mayor esfuerzo de trampeo– se obtienen datos que podrían sugerir, aunque ligeramente, un posible efecto del trampeo: es la población con una edad adulta menor, posee el mayor ratio en relación a animales subadultos y la evolución de los resultados de capturas por intensidad de trampeo mostrarían un efecto positivo del control (Fig. 14). A pesar de ello, la edad absoluta tiende a incrementarse durante el estudio, de forma contraria a nuestra hipótesis inicial.

En poblaciones con recursos limitados, los descastes pueden incrementar la supervivencia y la edad de los animales que se mantienen al disminuir la competencia intraespecífica por los recursos. En nuestro caso, la capacidad de carga del medio no es un factor limitante en la especie en el marco de su proceso de expansión.

Normalmente los trabajos de control tienen menos impacto del esperado debido al principio de compensación y al incremento de la reproducción en los animales que se mantienen en la población (Melero *et al.*, 2015). Nuestros resultados sugieren que las tres poblaciones mantienen una estructura de edades estable sin necesidad de compensar mediante el incremento de la reproducción el control realizado.

Esta falta de efecto en el control llevado a cabo en las tres poblaciones está en concordancia con la expansión en el área de distribución de estas tres poblaciones (MAGRAMA, 2014).

Seguimiento de los resultados en futuras campañas de control del visón americano

El examen del báculo y/o los caracteres osteológicos para distinguir animales subadultos de adultos sólo es de utilidad hasta los ocho meses de edad (Whitman, 2003). Este periodo es comparable con nuestro periodo post-reproductivo (hasta finales de diciembre). La ratio de animales subadultos en este periodo en las tres poblaciones estudiadas varía en las diferentes

poblaciones entre 2.26 y 3.13 (Tabla 12). Si asumimos que no existen variaciones de los parámetros que puedan afectar la dinámica poblacional de la especie en futuros estudios (contaminación, enfermedades, escasez de alimento), la obtención de una ratio en los trabajos de control en el periodo post-reproductivo (animales hasta los ocho meses de edad) debería ser superior a 3.13 para tener posibilidad de repercutir en la población de la especie invasora.

En condiciones de campo, sin posibilidad de realizar el estudio del báculo y/o las características osteológicas, es útil determinar la ratio de animales sub-adultos hasta finales de octubre, que corresponde a ejemplares de hasta seis meses de edad y fácilmente distinguibles de animales adultos. En este caso, la ratio de animales subadultos obtenidos en los trampeos debería ser superior a 4.09 para poder obtener un posible efecto positivo en los trabajos de control.

En breve, en nuestra zona de estudio y siempre que se mantengan estables otros parámetros que pudieran influir en las estructuras demográficas, la ratio mínima de animales sub-adultos que se ha de obtener en futuros controles de la especie invasora en octubre (sub-adultos de seis meses de edad) o en diciembre (ocho meses de edad) debería ser superior a 4.09 y 3.13, respectivamente, para indicar un posible efecto del control.

Los resultados de los trampeos pueden tener diferente repercusión según el período en los que se realice. El descaste de hembras reproductoras es un método más eficiente que el control de animales jóvenes o en dispersión. No se detectaron diferencias en la proporción de hembras capturadas en el periodo pre-reproductivo (36.8%) en relación con el período post-reproductivo (35.5%). Diferencias significativas se obtuvieron entre los periodos pre- y post-reproductivo en los animales sub-adultos, con la mayor tasa de mortalidad en esta edad durante el periodo de invierno-dispersión. El porcentaje de animales subadultos representa el 71% de todos los animales en el periodo post-reproductor y el 40% en el periodo pre-reproductor. Asumiendo que los tres diferentes controles fallaron en su afectación a la estructura demográfica, en el marco de un déficit de recursos económicos, la prioridad de trampeo en el período pre-reproductivo estaría recomendada. Los trampeos en el período post-reproductivo son útiles para valorar el éxito de los trabajos de control, al determinar el porcentaje de animales subadultos.

Incrementar los esfuerzos de las campañas de control, especialmente en el período pre-reproductivo, establecer períodos de tiempo definidos para la erradicación (Bomford y O'Brien, 1995) y mejorar el protocolo de trampeo tradicional usando otros métodos –como el uso de plataformas- para mejorar los resultados y detectar la especie en bajas densidades (Reynolds *et al.*, 2010) son necesarios para limitar la expansión de la especie invasora.

Líneas de investigación futuras

Como líneas de investigación futura se podrían destacar:

- Realización de un mayor número de PCR y secuenciación de las cepas de AMDV presentes en el medio natural en Europa, utilizando secuencias que codifiquen tanto proteínas estructurales como no estructurales para poder determinar el origen de las cepas presentes en los carnívoros riparios europeos así como la diversidad de cepas presentes.
- Determinar las lesiones asociadas al virus y realización de pruebas de inmunohistoquímica. Los principales problemas de este apartado son la obtención de muestras en buen estado de conservación y la dificultad de detectar el virus mediante pruebas de inmunohistoquímica.
- Realización de estudios sobre el AMDV relacionados con la condición corporal, estado inmunitario e infecciones paralelas con otros agentes patógenos.
- Seguimiento del AMDV a largo plazo para determinar la progresión de la prevalencia. Asimismo, realizar estudios en ríos seleccionados y compararlos con evoluciones de las densidades poblacionales.
- Determinar causas de mortalidad en el turón europeo mediante el radioseguimiento de ejemplares.
- Determinar si los valores propuestos de la ratio de ejemplares subadultos en futuros estudios son de utilidad para valorar la evolución del éxito de las capturas.

6. Conclusiones

1. Se ha identificado la presencia del AMDV en el visón europeo así como en otros carnívoros semiacuáticos ibéricos.
2. La seroprevalencia del AMDV obtenida tanto en el visón europeo como en el visón americano es del 32%, y está presente en todas las zonas estudiadas.
3. La prevalencia de AMDV en visón americano es muy variable y oscila entre el 6% en Cataluña y el 47% en Galicia. Las zonas con menor prevalencia corresponden a zonas con infección reciente o colonizada por el visón americano en los últimos años.
4. La incidencia calculada en visones europeos recapturados fue de 0.46 casos por animal-año de riesgo y la de los animales positivos que seroconvierten a negativos de 0.18.
5. No se detectaron diferencias en las prevalencias entre sexos en ninguna de las dos especies. En los visones americanos, la seroprevalencia se incrementa con la edad de los ejemplares.
6. La estructura demográfica de la población de visón europeo, americano y turón europeo es muy similar, con una ratio de animales subadultos/adultos elevada, especialmente en los machos (entre 1,2 y 1,5 según las especies) en relación a las hembras (0,8-1,0).
7. Se detectaron diferencias en el porcentaje de visones europeos subadultos en zonas con o sin presencia de visón americano.
8. Al estudiar tres poblaciones de visón americano sometidas a diferente presión de descaste no se detectaron efectos del control sobre ninguna de las poblaciones, sugiriendo que en los tres casos se falló en los objetivos establecidos.

7. Bibliografía

- AASTED, B. y M.E. BLOOM. 1984. Mink with Aleutian disease have high-affinity antiviral antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology* 19: 411-418.
- AASTED, B., G.S. TIERNEY y M.E. BLOOM. 1984. Analysis of the quantify of antiviral antibodies from mink infected with different Aleutian disease virus strains. *Scandinavian Journal of Immunology* 19: 395-402.
- AASTED, B. 1985. Aleutian disease of mink. *Virology and Immunology. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica. Sect. C. 93, Supplement 287.*
- AASTED, B. y H. HAUCH. 1988. Studies on the progression of Aleutian Disease in mink. *Acta Veterinaria Scandinavica* 29: 315-321.
- ALEXANDER, M.M. 1958. The place of aging in wildlife management. *American Scientist* 46: 123-137.
- ALEXANDERSEN, S., Å, UTTENTHAL-JENSEN, M. HANSEN y B. AASTED. 1985. Experimental transmission of Aleutian disease virus (ADV) to different animal species. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 93: 195-200.
- ALEXANDERSEN, S. 1986. Acute interstitial pneumonia in mink kits: Experimental reproduction of the disease. *Veterinary Pathology* 23: 579-588.
- ALEXANDERSEN, S., S. LARSEN, B. AASTED, A. UTTENTHAL, M.E. BLOOM y M. HANSEN. 1994. Acute interstitial pneumonia in mink kits inoculated with defined isolates of Aleutian mink disease parvovirus. *Veterinary Pathology* 31: 216-228.
- AMSTISLAVSKY, S. y Y. TERNOVSKAYA. 2000. Reproduction in mustelids. *Animal Reproduction Science* 60-61: 571-581.
- AMSTISLAVSKY, S., H. LINDEBERG, Y. TERNOVSKAYA, E. ZAVJALOV, G. ZUDOVA, D. KLOCHKOV y I. GERLINSKAYA. 2009. Reproduction in the

- European mink, *Mustela lutreola*: Oestrous cyclicity and early pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 489-498.
- AN, S. H. y D.G. INGRAM. 1977. Detection of inapparent Aleutian disease virus infection in mink. *American Journal of Veterinary Research* 38 (10): 1619-1624.
- AN, S.H. y D.G. INGRAM. 1978. Transmission of Aleutian disease from mink with inapparent infections. *American Journal of Veterinary Research* 39 (2): 309-313.
- AN, S.H., F.J. DEPAULI, P. WRIGHT y D.G. INGRAM. 1978. Characteristics of inapparent Aleutian disease virus infection in mink. *Research in Veterinary Science* 24 (2): 200-204.
- ANSORGE, H. y F. SUCHENTRUNK. 2001. Aging steppe polecats (*Mustela eversmanni*) and polecats (*Mustela putorius*) by canine cementum layers and skull characters. *Wiss Mitt Niederösterr Landesmuseum* 14: 79-106.
- BLOOM, M.E., R.E. RACE, W.J. HADLOW y B. CHESEBRO. 1975. Aleutian disease of mink: the antibody response of sapphire and pastel mink to Aleutian disease virus. *The Journal of Immunology* 115 (4): 1034-1037.
- BLOOM, M.E., R.E. RACE y J.B. WOLFINBARGER. 1980. Characterization of Aleutian disease virus as a parvovirus. *Journal of Virology* 35 (3): 836-843.
- BLOOM, M.E., S. ALEXANDERSEN, S. PERRYMAN, D. LECHNER y J.B. WOLFINBARGER. 1988. Nucleotide sequence and genomic organization of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): sequence comparisons between a nonpathogenic and a pathogenic strain of ADV. *Journal of Virology* 62 (8): 2903-2915.
- BLOOM, M.E., H. KANNO, S. MORI y J.B. WOLFINBARGER. 1994. Aleutian mink disease: puzzles and paradigms. *Infectious Agents and Disease* 3: 279-301.
- BLOOM, M.E., K.L. OIE, P. CHRISTENSEN y G. DURRANT. 1997. Evaluation of the polymerase chain reaction (pcr) as a tool for diagnosing infections with the Aleutian mink disease parvovirus (ADV). *Scientifur* 21: 141-146.

- BLOOM, M.E., J.M. FOX, B.D. BERRY, K.L. OIE y J.B. WOLFINBARGER. 1998. Construction of pathogenic molecular clones of Aleutian mink disease parvovirus that replicate both *in vivo* and *in vitro*. *Virology* 251: 288-296.
- BOMFORD M. y P. O'BRIEN. 1995. Eradication or control for vertebrate pest?. *Wildlife Society Bulletin* 23 (2): 249-255.
- BONESI, L., R. STRACHAN y D.W. MACDONALD. 2006a. Why are there fewer signs of mink in England? Considering multiple hypotheses. *Biological Conservation* 130: 268-277.
- BONESI, L., L.A. HARRINGTON, T. MARAN, V.E. SIDOROVICH y D.W. MACDONALD. 2006b. Demography of three populations of American mink *Mustela vison* in Europe. *Mammal Review* 36 (1): 98-106.
- BONESI, L. y S. PALAZÓN. 2007. The American mink in Europe: Status, impacts, and control. *Biological Conservation* 134: 470-483.
- BONESI, L., S.P. RUSHTON y D.W. MACDONALD. 2007. Trapping for mink control and water vole survival: Identifying key criteria using a spatially explicit individual based model. *Biological Conservation* 136: 636-650.
- BOWMAN, J., A.G. KIDD, R.M. GORMAN y A.I. SCHULTE-HOSTEDDE. 2007. Assessing the potential for impacts by feral mink on wild mink in Canada. *Biological Conservation* 139: 12-18.
- BOWMAN, J., A.G. KIDD, L.A. NITUCH, C. SADOWSKI y A.I. SCHULTE-HOSTEDDE. 2014. Testing for Aleutian mink disease virus in the river otter (*Lontra canadensis*) in sympatry with infected American mink (*Neovison vison*). *Journal of Wildlife Diseases* 50 (3): 689-693.
- BOYCE, M.C., A.R.E. SINCLAIR y G.C. WHITE. 1999. Seasonal compensation of predation and harvesting. *Oikos* 87: 419-426.
- BRAVO, C. y F. BUENO. 1999. Visión Americano, *Mustela vison*, Schreber, 1777. *Galemys* 11 (2): 3-16.

- BRAVO, C. 2007. *Neovison vison* Schreber, 1777. En: Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. L.J Palomo, J. Gisbert y J.C. Blanco (eds). Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU. Madrid: 299-301.
- BROLL, S. y S. ALEXANDERSEN. 1996. Investigation of the pathogenesis of transplacental transmission of Aleutian Mink Disease Parvovirus in experimentally infected mink. *Journal of Virology* 70 (3): 1455-1466.
- BUSKIRK S. W. y S.L. LINDSTEDT. 1989. Sex biases in trapped samples of Mustelidae. *Journal of Mammalogy* 70 (1): 88-97.
- CABRIA, M.T., J.R. MICHAUX, B.J. GÓMEZ-MOLINER, D. SKUMATOV, T. MARAN, P. FOURNIER, J. LÓPEZ DE LUZURIAGA y R. ZARDOYA. 2011. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology* 20 (6): 1176-1190.
- CABRIA, M.T., E.G. GONZÁLEZ, B.J. GÓMEZ-MOLINER, J.R. MICHAUX, D. SKUMATOV, A. KRANZ, P. FOURNIER, S. PALAZÓN y R. ZARDOYA. 2015. Patterns of genetic variation in the endangered European mink (*Mustela lutreola* L., 1761). *BMC Evolutionary Biology* 15: 141. DOI 10.1186/s12862-015-0427-9.
- CAMBY, A. 1990. Le Vison d'Europe (*Mustela lutreola* Linnaeus, 1761). En: Encyclopédie des Carnivores de France 13. Société Française pour l'étude et la protection des Mammifères (eds.). Paris, Francia: 1-18.
- CAUGHLEY, G. 1977. Analysis of vertebrate populations. John Wiley & Sons. Londres.
- CHO, H.J. y D.G. INGRAM. 1972. An accurate and rapid test for detecting aleutian disease infected mink. *Fur Trade Journal* 50 (8): 6-7.
- CHO, H.J. 1978. Eradicating Aleutian Mink Disease. Canada Agriculture.
- CHO, H.J. y J. GREENFIELD. 1978. Eradication of Aleutian disease of mink by eliminating positive counterimmunoelectrophoresis test reactors. *Journal of Clinical Microbiology* 7 (1): 18-22.

- CHO, H.J. y D.D. PORTER. 1978. Aleutian disease and Aleutian disease virus of mink. En: Persistent Viruses. Academic Press (ed.). New York, USA: 711-726.
- COTMORE, S.F., M. AGBANDJE-McKENNA, J.A. CHIORINI, D.V. MUKHA, D.J. PINTEL, J. QIU, M. SÖDERLUND-VENERMO, P. TATTERSALL, P. TIJSSEN, D. GATHERER y A.J. DAVISON. 2014. The family Parvoviridae. Archives of Virology 159: 1239-1247.
- DAM-TUXEN, R., J. DAHL, T.H.JENSEN, T. DAM-TUXEN, T. STRUVE y L. BRUUN. 2014. Diagnosing Aleutian Mink Disease infection by a new fully automated ELISA or by counter current immunoelectrophoresis: A comparison of sensitivity and specificity. Journal of virological methods 199: 53-60.
- DANILOV, P.I. y I.L. TUMANOV. 1976. The ecology of the European and American Mink in the Northwest of the USSR. En: Akad Nauk Karelski filial, Inst. Biol (ed) Ecology of birds and mammals in the Northwest of the USSR, Pertozavodsk, Rusia: 118-143.
- DAVISON, A., H.I. GRIFFITH, R.C. BROOKES, T. MARAN, D.W. MACDONALD, V.E. SIDOROVICH, A.C. KITCHENER, I. IRIZAR, I. VILLATE, J. GONZALEZ-ESTEBAN, J.C. CEÑA, A. CEÑA, I. MOYA y S. PALAZÓN. 2000. Mitochondrial DNA and paleontological evidence for the origin of endangered European mink, *Mustela lutreola*. Animal Conservation 4: 345-355.
- DELIBES, M. y F. AMORES. 1978. On the distribution and status of the Spanish Carnivores. Abstracts of the II Congr. Theriol. Int. 146 Brno, CSSR.
- DUNSTONE, N. 1993. The Mink. T & AD Poyser, London, Reino Unido.
- EKLUND, C.M., W.J. HADLOW, R.C. KENNEDY, C.C. BOYTE y T.A. JACKSON. 1968. Aleutian disease of mink: properties of the etiologic agent and the host responses. The Journal of Infectious Diseases 118: 510-526.
- ELDER W.H. 1951. The baculum as an age criterion in mink. Journal of Mammalogy 32: 43-50.
- ELLIS, L.C. 1992. 10 countries attend Oslo Fur Conference. Fur Rancher 73:8.

- ELLIS, L.C., Z-Z. LI, M.K. JACKSON y D. BARNARD. 1995. Mortality from Aleutian disease in mink. *Blue Book Fur Farm* 14;16;18.
- ESPREGUEIRA-THEMUDO, G., J. ØSTERGAARD y A.K. ERSBØLL. 2011. Persistent spatial clusters of plasmacytosis among Danish mink farms. *Preventive Veterinary Medicine* 102: 75-82.
- ESPREGUEIRA-THEMUDO, G., H. HOUE, J.F. AGGER, J. ØSTERGAARD y A.K. ERSBOLL. 2012. Identification of biosecurity measures and spatial variables as potential risk factors for Aleutian disease in Danish mink farms. *Preventive Veterinary Medicine* 107: 134-141.
- FERNANDES, M., T. MARAN, A. TIKHONOV, J. CONROY, P. CAVALLINI, A. KRANZ, J. HERRERO, M. STUBBE, A. ABRAMOV y C. WOZENCRAFT. 2008. *Mustela putorius*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>.
- FOURNIER, P., C. MAIZERET, C. FOURNIER-CHAMBRILLON, N. ILBERT, S. AULAGNIER y F. SPITZ. 2008. Spatial behaviour of European mink *Mustela lutreola* and polecat *Mustela putorius* in southwestern France. *Acta Theriologica* 53 (4): 343-354.
- FOURNIER-CHAMBRILLON, C., B. AASTED, A. PERROT, D. PONTIER, F. SAUVAGE, M. ARTOIS, J-M. CASSIÈDE, X. CHAUBY, A.D. MOLIN, C. SIMON, y P. FOURNIER. 2004. Antibodies to Aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores from southwestern France. *Journal of Wildlife Disease* 40 (3): 394-402.
- FOX, J.M., M.A. STEVENSON y M.E. BLOOM. 1999. Replication of Aleutian mink disease parvovirus *in vivo* is influenced by residues in the VP2 protein. *Journal of Virology* 73: 8713-8719.
- GARCIA-DÍAZ, P., y M. LIZANA. 2013. Reproductive aspects of American mink (*Neovison vison*) in central Spain: Testing the effects of prey availability. *Mammalian Biology* 78: 111-117.

- GARCÍA-PEREA, R. y R.A. BAQUERO. 1999. Age estimation in Iberian wildcats *Felis silvestris* by canine tooth sections. *Acta Theriologica* 44 (3): 321-327.
- GARIN, I., I. ZUBEROGOITIA, J. ZABALA, J. AIHARTZA, A.P. CLEVINGER y A. RALLO. 2002. Home ranges of European mink *Mustela lutreola* in southwestern Europe. *Acta Theriologica* 47 (1): 55-62.
- GENOVESI, P., L. CARNEVALI, A. ALONZI y R. SCALERA. 2012. Alien mammals in Europe: updated numbers and trends, and assessment of the effects on biodiversity. *Integrative Zoology* 7: 247-253.
- GENOVESI, P., C. CARBONERAS, M. VILÀ y P. WALTON. 2015. EU adopts innovative legislation on invasive species: a step towards a global response to biological invasions?. *Biological Invasions* 17: 1307-1311.
- GOMEZ, A., S. ORECA, M. PÖDRA, B. SANZ y S. PALAZÓN. 2011. Expansión del visón europeo *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) hacia el este de su área de distribución en España: Primeros datos en Aragón. *Galemys* 23: 37-45.
- GORHAM, J.R., R.W. LEADER y J.B. HENSON. 1964. The experimental transmission of a virus causing hypergammaglobulinemia in mink: Sources and modes of infection. *Journal of Infectious Disease* 114: 341-345.
- GORHAM, J.R., J.B. HENSON, T.B. CRAWFORD y G.A. PADGETT. 1976. The epizootiology of Aleutian disease. Chapter 7. En: *Slow virus diseases of animals and man*. R. H. Kimberlin (eds.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Holanda: 135-158.
- GOTTSCHALCK, E., S. ALEXANDERSEN, A. COHN, L.A. POULSEN, M. E. BLOOM y B. AASTED. 1991. Nucleotide sequence analysis of Aleutian mink disease parvovirus shows that multiple virus types are present in infected mink. *Journal of Virology* 65 (8): 4378-4386.
- GOTTSCHALCK, E., S. ALEXANDERSEN, T. STORGAARD, M.E. BLOOM y B. AASTED. 1994. Sequence comparison of the non-structural genes of four different types of Aleutian mink disease parvovirus indicates an unusual degree of variability.

- Archives of Virology 138: 213-231.
- GREER, K.R. 1957. Some osteological characters of known-age ranch minks. *Journal of Mammalogy* 38: 319-330.
- GRUE, H. y B. JENSEN. 1979. Review of the information of incremental lines in tooth cementum of terrestrial mammals. *Danish Review Game Biology* 11: 1-48.
- HAAGSMA, J. 1969. Epizootiology of Aleutian disease (plasmacytosis) in mink. *Netherland Journal of Veterinary Science* 2: 19.
- HAAS, L., P. WOHLSEIN, G. TRAUTWEIN, B. STOLZE y O.-R. KAADEN. 1990. Violet mink develop an acute disease after experimental infection with Aleutian Disease Virus (ADV) Isolate ADV SL3. *Journal of Veterinary Medicine B* 37: 106-117.
- HADLOW, W.J., R.E. RACE y R.C. KENNEDY. 1983. Comparative pathogenicity of four strains of Aleutian disease virus for pastel and sapphire mink. *Infection and Immunity* 41 (3): 1016-1023.
- HADLOW, W.J., R.E. RACE, y R.C. KENNEDY. 1984. Royal pastel mink respond variously to inoculation with Aleutian disease virus of low virulence. *Journal of Virology* 50 (1): 38-41.
- HADLOW, W.J., R.E. RACE y R.C. KENNEDY. 1985. Temporal replication of the Pullman strain of Aleutian disease virus in royal pastel mink. *Journal of Virology* 55 (3): 853-856.
- HAMMERSHØJ, M. 2004. Population ecology of free-ranging American mink *Mustela vison* in Denmark. PhD Thesis – National Environmental Research Institute, Kalø, Denmark.
- HANSEN, M. 1985. Diseases and Hygiene. En: Mink Production. G. Joergensen (eds.). 1st. edition. Scientifur, Hilleroed, Denmark: 261-340.
- HANSEN, M. y E. LUND. 1988. Pregnancy rate and foetal mortality in Aleutian disease virus infected mink. *Acta Veterinaria Scandinavica* 29: 271-272.
- HANSSON, A. 1947. The physiology of reproduction in mink (*Mustela vison* Schreb.) with

- special reference to delayed implantation. *Acta Zoologica* 28: 1-136.
- HARRINGTON, L.A. y D.W. MACDONALD. 2008. Spatial and temporal relationships between invasive American mink and native European polecats in the southern United Kingdom. *Journal of Mammalogy* 89 (4): 991-1000.
- HARRINGTON, L.A., A.L. HARRINGTON, T. MOORHOUSE, M. GELLING, L. BONESI y D.W. MACDONALD. 2009. American mink control on inland rivers in southern England: An experimental test of a model strategy. *Biological Conservation* 142: 839-849.
- HARRINGTON, L.A., M. GELLING, V. SIMPTON, A. HARRINGTON y D.W. MACDONALD. 2012. Notes on the health status of free-living, non-native American mink, *Neovison vison*, in southern England. *European Journal of Wildlife Research* 58: 875-880.
- HARRINGTON, L.A., M. PÖDRA, D.W. MACDONALD y T. MARAN. 2014. Post-release movements of captive-born European mink *Mustela lutreola*. *Endangered Species Research* 24: 137-148.
- HARTSOUGH, G.R. y J.R. GORHAM. 1956. Aleutian disease in mink. *Nat Fur News* 28: 11.
- HEGYELI, Z. y A. KECSKÉS. 2014. The occurrence of wild-living American mink *Neovison vison* in Transilvania, Romania. *Small Carnivore Conservation* 51: 23-28.
- HENRY, A. 1927. Les débuts de l'élevage du vison en France. *Revue d'Histoire Naturelle Appliquée* 8: 289-297.
- HENSON, J.B., R.W. LEADER y J.R. GORHAM. 1961. Hypergammaglobulinemia in mink. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 107: 919.
- HENTTONEN, H. 1992. Vesikko (*Mustela lutreola*). En: *Maailman uhanalaiset eläimet*. U. Elo (eds.). Espoo, Finlandia: 46-48.
- HENTTONEN, H. y A. TOLONEN. 1983. Minkki ja vesikko. En: *Suomen eläimet*. 1. Nisäkkäät. I. Koivisto (eds.). Espoo, Finlandia: 228-233.

- HOSSAIN-FARID, A., P. RUPASINGHE, J.L. MITCHELL y K. ROUVINEN-WATL. 2010. A survey of Aleutian mink disease virus infection of feral American mink in Nova Scotia. *The Canadian Veterinary Journal* 51 (1): 75-77.
- HOSSAIN-FARID, A. 2012. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55 (1):10.
- HOSSAIN-FARID, A. 2013. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55 (10) doi:10.1186/1751-0147-55-10.
- HOSSAIN-FARID, A., I. HUSSAIN y I. ARJU. 2015. Dectection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (*Neovison vison*) 10 days postinoculation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27 (3): 287-294.
- HUSSAIN, I., G.W. PRICE y A. HOSSAIN-FARID. 2014. Inactivation of Aleutian mink disease virus through high temperature exposure *in vitro* and under field-based composting conditions. *Veterinary Microbiology* 173: 50-58.
- INGRAM, D.G. y H.J. CHO. 1974. Aleutian disease in mink: Virology, immunology and pathogenesis. *The Journal of Rheumatology* 1: 74-92.
- IUCN. 2000. IUCN Guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species. Gland. Switzerland.
- JAHNS, H., P. DALY, M.C. McELROY, D.J. SAMMIN, H.F. BASSET y J.J. CALLANAN. 2010. Neuropathologic features of Aleutian disease in farmed mink in Ireland and molecular characterization of Aleutian mink disease virus detected in brain tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22: 101-105.
- JENSEN, T.H., L.S. CHRISTENSEN, M. CHRIÉL, Å. UTTENTHAL y A.S. HAMMER. 2011. Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus. *Journal of Virological Methods* 171: 81-85.
- JENSEN, T.H., L.S. CHRISTENSEN, M. CHRIÉL, J. HARSLUND, C. M. SALOMONSEN

- y A. S. HAMMER. 2012. High prevalence of Aleutian mink disease virus in free-ranging mink on a remote Danish Island. *Journal of Wildlife Diseases* 48 (2): 497-502.
- JEPSEN, J.R., F. D'AMORE, U. BAANDRUP, M.R. CLAUSEN, E. GOTTSCHALCK y B. AASTED. 2009. Aleutian mink disease virus and humans. *Emerging Infectious Diseases* 15 (12): 2040-2042.
- KELLER, R.P., J. GEIST, J.M. JESCHKE y I KÜHN. 2011. Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environmental Sciences Europe* 23:23.
- KELLOGG, C.E., C.F. BASSET y R.K. ENDERS. 1948. *Mink Raising*. United States Department of Agriculture. Circular 801.
- KENYON, A.J., G. TRAUTWEIN y C.F. HELMBOLDT. 1963a. Characterization of blood serum proteins from mink with Aleutian disease. *American Journal of Veterinary Research* 24 (98): 168-172.
- KENYON, A.J., C.F. HELMBOLDT y S.W. NIELSEN. 1963b. Experimental transmission of Aleutian disease with urine. *American Journal of Veterinary Research* 24 (102): 1066-1067.
- KENYON, A.J. 1966. Immunologic deficiency in Aleutian disease of mink. *American Journal of Veterinary Research* 27 (121): 1780-1782.
- KENYON, A.J., T.M. MAGNANO, C.F. HELMBOLDT y L. BUKO. 1966. Aleutian disease in the ferret. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 149 (7): 920-923.
- KENYON, A.J., B.J. KENYON y E.C. HAHN. 1978. Protides of the mustelidae: immunoreponse of mustelids to Aleutian Mink Disease Virus. *American Journal of Veterinary Research* 39 (6): 1011-1015.
- KEVEN-JACKSON, M., S.G. WINSLOW, L.D. DOCKERY, J.K. JONES y D.V. SISSON. 1996a. Investigation of an outbreak of Aleutian disease on a commercial mink ranch. *American Journal of Veterinary Research* 57 (12): 1706-1710.

- KEVEN-JACKSON, M., L.C. ELLIS, J.D. MORREY, Z-Z. LI y D.L. BARNARD. 1996b. Progression of Aleutian disease in natural and experimentally induced infections of mink. *American Journal of Veterinary Research* 57 (12): 1753-1758.
- KHLYAP, L.A., A.A. WARSHAVSKY y V.V. BOBROV. 2011. Diversity of alien mammal species in different regions of Russia. *Russian Journal of Biological Invasions* 2 (4): 293-299.
- KIDD, A.G., J. BOWMAN, D. LESBARRÈRES y A.E. SCHULTE-HOSTEDDE. 2009. Hybridization between escaped domestic and wild American mink (*Neovison vison*). *Molecular Ecology* 18: 1175-1186.
- KING, C.M., R.M. McDONALD, R.D. MARTIN y T. DENNIS. 2009. Why is eradication of invasive mustelids so difficult?. *Biological Conservation* 142: 806-816.
- KNUUTTILA, A., N. UZCÁTEGUI, J. KANKKONEN, O. VAPALAHTI y P. KINNUNEN. 2009. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease in Finland. *Veterinary Microbiology* 133: 229-238.
- KNUUTTILA, A., P. ARONEN, M. EEROLA, I. A. GARDNER, A-M. K. VIRTALA y O. VAPALAHTI. 2014. Validation of an automated ELISA system for detection of antibodies to Aleutian mink disease virus using blood samples collected in filter paper strips. *Virology Journal* 11: 141.
- KNUUTTILA A. K. AALTONEN, A.M. VIRTALA, H. HENTTONEN, M. ISOMURSU, A. LEIMANN, T. MARAN, U. SAARMA, P. TIMONEN, O. VAPALAHTI y T. SIRONEN. 2015. Aleutian mink disease virus in free-ranging mustelids in Finland – A cross-sectional epidemiologic and phylogenetic study. *Journal of General Virology* 96: 1423-1435.
- KRISTIANSEN, L.V., P. SUNDE, G. NACHMAN y A.B. MADSEN. 2007. Mortality and reproductive patterns of wild European polecats *Mustela putorius* in Denmark. *Acta Theriologica* 52 (4): 371-378.
- LADOUCEUR, E.E.B., M. ANDERSON, B.W. RITCHIE, P. CIEMBOR, G. RIMOLDI, M. PIAZZA, D. PESTI, D.L. CLIFFORD y F. GIANNITTI. 2014. Aleutian disease: an

emerging disease in free-ranging striped skunks (*Mephitis mephitis*) from California. *Veterinary Pathology*. doi: 10.1177/0300985814560234.

LARIVIÈRE, S. 1999. *Mustela vison*. *Mammalian Species* 608: 1-9.

LARSEN, A.E. y D.D. PORTER. 1975. Pathogenesis of Aleutian disease of mink: identification of non-persistent infections. *Infection and Immunity* 11: 92-94.

LARSEN, S., S. ALEXANDERSEN, E. LUND, P. HAVE y M. HANSEN. 1984. Acute interstitial pneumonitis caused by Aleutian disease virus in mink kits. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 92: 391-393.

LAWS, R. 1952. A new method for age determination on mammals. *Nature* 169 (7): 972-973.

LECHLEITNER, R.R. 1954. Age criteria in mink, *Mustela vison*. *Journal of Mammalogy* 35: 496-503.

LÉGER, F. 2008. Situation, en France, de trois petits carnivores introduits: le raton laveur (*Procyon lotor*), le vison d'Amérique (*Mustela vison*) et le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*). *Rev. Sci. Bourgogne-Nature* 8: 178-188.

LEIMANN, A., A. KNUUTTILA, T. MARAN, O. VAPALAHTI y U. SAARMA. 2015. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus (AMDV) in Estonia, and a global phylogeny of AMDV. *Virus Research* 199: 56-61.

LODÉ, T. 1995. Convergences morphologiques du putois (*Mustela putorius*) et du vison américain (*M. vison*) avec le vison d'Europe (*M. lutreola*). *Gibier Faune Sauvage, Game and Wildlife* 12: 147-158.

LODÉ, T. 1997. Trophic status and feeding habits of the European Polecat *Mustela putorius* L. 1758. *Mammal Review* 27 (4): 177-184.

LODÉ, T. 2001. Mating system and genetic variance in a polygynous mustelid, the European polecat. *Genes Genetic Systems* 76: 221-227.

LODÉ, T., J.P. CORMIER y D. Le JACQUES. 2001. Decline in endangered species as an indication of anthropic pressures: The case of European mink *Mustela lutreola*

- western population. *Environmental Management* 28 (4): 727-735.
- LODÉ, T. 2002. An endangered species as indicator of freshwater quality: fractal diagnosis of fragmentation within a European mink, *Mustela lutreola*, population. *Archiv für Hydrobiologie* 155 (1): 163-176.
- LODÉ, T., G. GUIRAL y D. PELTIER. 2005. European Mink-Polecat hybridization events: hazards from natural process?. *Journal of Heredity* 96 (2): 1-8.
- LOUKOPOULOS, P., Π. Λουκόπουλος, C. BILLINIS y E. TSALIE. 2012. First report of Aleutian Disease in a least weasel (*Mustela nivalis*). *Journal of Comparative Pathology*. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.11.097.
- MACDONALD, D.W. y L.A. HARRINGTON. 2003. The American mink: the triumph and tragedy of adaptation out of context. *New Zealand Journal of Zoology* 30: 421-441.
- MAGRAMA. 2005. Estrategia para la conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*) en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (ed). Madrid, España. <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-proteccion-especial/ce-proteccion-estr-vison-europeo.aspx>.
- MAGRAMA. 2009. Programa de conservación *ex situ* del visón europeo (*Mustela lutreola*) en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (ed). Madrid, España. http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies-amenazadas/estrategia_vison_europeo_ex_situ_tcm7-150027.pdf
- MAGRAMA. 2014. Estrategia de gestión, control y erradicación del visón americano (*Neovison vison*) en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (ed). Madrid, España. <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies-amenazadas/estrategias-y-planos-de-especies/default.aspx>.
- MAÑAS, S. 2001. Estudio ecopatológico. En: Distribución y estudio ecopatológico del visón europeo (*Mustela lutreola* Linnaeus, 1761) en las provincias de Burgos, La Rioja, Álaba/Araba, Soria, Zaragoza, Navarra, Cantabria, Gipuzkoa y Bizkaia. Grupo Tragsa. Informe inédito.

- MAÑAS, S., J.C. CEÑA, J. RUIZ-OLMO, S. PALAZÓN, M. DOMINGO, J.B. WOLFINBARGER y M.E. BLOOM. 2001. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 37 (1): 138-144.
- MAÑAS, S., S. PALAZÓN, J. RUIZ-OLMO, T. MARAN, W. FESTL, y C. SEEBAS. 2003. Captive breeding program of European mink in Spain: el Centre de Pont de Suert. En: International Conference on the Conservation of the European mink. Gobierno de La Rioja (ed.): 123-129.
- MAÑAS, S. 2005. Estudio sanitario. En: Informe de actividad de los Proyectos Life de conservación del visón europeo (LIFE 02/NAT/8604). Informe inédito.
- MARAN, T. 1989. Einige Aspekte zum gegenseitigen Verhalten des Europäischen *Mustela lutreola* und Amerikanischen Nerzes *Mustela vison* sowie zu ihrer Raum- und Zeitnutzung. En: Populationsökologie Marderartiger Säugetiere, 1. M. Stubbe (eds.). Halle, Alemania: 321-332.
- MARAN, T. y H. HENTTONEN. 1995. Why is the European mink, *Mustela lutreola*, disappearing? A review of the process and hypotheses. *Annals Zoologica Fennici* 32: 47-54.
- MARAN, T., H. KRÜK, D.W. MACDONALD y M. POLMA. 1998a. Diet of two species of mink in Estonia: displacement of *Mustela lutreola* by *M. vison*. *Journal of Zoology* 245: 218-222.
- MARAN, T., D.W. MACDONALD, H. KRÜK, V.E. SIDOROVICH y V.V. ROZHNOV. 1998b. The continuing decline of the European mink *Mustela lutreola*: Evidence for the intraguild aggression hypothesis. En: Behaviour and Ecology of Riparian Mammals. N. Dunstone and M. Gorman (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 71: 297-324.
- MARAN, T. 2007. Conservation biology of the European mink, *Mustela lutreola* (Linnaeus 1761): Decline and causes of extinction. PhD Thesis. Tallinn University Dissertations on Natural Sciences, vol 15. TLÜ Kirjastus, Tallin, Estonia.
- MARAN, T., D. SKUMATOV, S. PALAZÓN, A. GÓMEZ, M. PÖDRA, A. SAVELJEV, A.

- KRANZ, R. LIBOIS y A. AULAGNIER. 2011. *Mustela lutreola*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species, Version 2015.2 www.iucnredlist.org.
- MARTINO, P.E. y J.J. MARTINO. 1996. Prevalence of microorganisms in dead mink kits from Aleutian-disease-infected and non-infected farms. *Veterinary Research* 27: 607-612.
- MATSON, G.M. 1981. Workbook for cementum analysis. Matson's Laboratory, Milltown, Montana, USA.
- MELERO, Y., S. PALAZÓN, L. BONESI y J. GOSÀLBEZ. 2010. Relative abundance of culled and not culled American mink populations in northeast Spain and their potential distribution: are culling campaigns effective?. *Biological Invasions* 12: 3877-3885.
- MELERO, Y., S. PALAZÓN, E. REVILLA y J. GOSALBEZ. 2011. Winter activity patterns in an invading Mediterranean population of American mink (*Neovison vison*). *Folia Zoologica* 60 (1): 47-53.
- MELERO, Y., G. SANTULLI, A. GÓMEZ, J. GOSÀLBEZ, C. RODRÍGUEZ-REFOJOS y S. PALAZÓN. 2012. Morphological variation of introduced species: the case of American mink (*Neovison vison*) in Spain. *Mammalian Biology* 77 (5): 345-350.
- MELERO, Y., E. ROBINSON y X. LAMBIN. 2015. Density- and age-dependent reproduction partially compensates culling efforts of invasive non-native American mink. *Biological Invasions* 17 (9): 2645-2657.
- METZGER, M.J., R.G.H. BRUNCE, R.H.G. JONGMAN, C.A. MÜCHER y J.W. WATKINS. 2005. A climatic stratification of the environment of Europe. *Global Ecology and Biogeography* 14: 549-563.
- MICHAUX, J.R., R. LIBOIS, A. DAVIDSON, P. CHEVRET y R. ROSOUX. 2004. Is the western population of the European mink (*Mustela lutreola*) a distinct Management Unit for the conservation?. *Biological Conservation* 115: 357-367.
- MICHAUX, J.R., O.J. HARDY, F. JUSTY, P. FOURNIER, A. KRANZ, M. CABRIA, A. DAVISON, R. ROSOUX y R. LIBOIS. 2005. Conservation genetics and population

- history of the threatened European mink, *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. *Molecular Ecology* 14 (8): 2373-2389.
- MØLLER, T y N. HEJE. 1961. Plasmacelle leukæmi hos mink. En kasuistisk meddelelse. Medlemsblad for den Danske Dyr lægeforening 44: 57-61.
- MORRIS, P. 1972. A review of mammalian age determination methods. *Mammal Review* 2: 69-104.
- NITUCH, L.A., J. BOWMAN, K.B. BEAUCLERC y A.E. SCHULTE-HOSTEDDE. 2011. Mink farms predict Aleutian disease exposure in wild American mink. *PLoS ONE* 6 (7): e21693: doi: 10.1371/Journal.pone.0021693.
- NITUCH, L.A., J. BOWMAN, P. WILSON y A.I. SCHULTE-HOSTEDDE. 2012. Molecular epidemiology of Aleutian disease virus in free-ranging domestic, hybrid, and wild mink. *Evolutionary Applications*. Blackwell Publishing Ltd. 5: 330-340.
- OBEL, A.L. 1959. Studies on a disease in mink with systemic proliferation of the plasma cells. *American Journal of Veterinary Research* 20: 384-392.
- OIE, K.L., G. DURRANT, J.B. WOLFINBARGER, D. MARTIN, F. COSTELLO, S. PERRYMAN, W.J. HADLOW y M.E. BLOOM. 1996. The relationship between capsid protein (VP2) sequence and pathogenicity of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): a possible role for raccoons in the transmission of ADV infections. *Journal of Virology* 70: 852-861.
- OLOFSSON, A., C. MITTELHOLZER, L.T. BERNDTSSON, L. LIND, T. MEJERLAND y S. BELÁK. 1999. Unusual, high genetic diversity of Aleutian Mink Disease Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (12): 4145-4149.
- PADGETT, G.A., J.R. GORHAM y J.B. HENSON. 1967. Epizootiologic studies of Aleutian disease. I. Transplacental transmission of the virus. *Journal of Infectious Disease* 117: 35-38.
- PALAZÓN, S. y J. RUIZ-OLMO. 1993. Preliminary data on the use of space and activity of the European mink (*Mustela lutreola*) as revealed by radio-tracking. *Small Carnivore*

Conservation 8: 6-8.

- PALAZÓN, S y J. RUIZ-OLMO. 1997. El visón europeo (*Mustela lutreola*) y el visón americano (*Mustela vison*) en España. Ministerio de Medio Ambiente. Colección Técnica. Organismo Autónomo de Parques Nacionales (eds.), Madrid.
- PALAZÓN, S. 1998. Distribución, morfología y ecología del visón europeo (*Mustela lutreola* L. 1761) en la Península Ibérica. PhD Thesis. Universidad de Barcelona.
- PALAZÓN, S., J. RUIZ-OLMO y J. GOSÀLBEZ. 2004. Diet of European mink (*Mustela lutreola*) in Northern Spain. *Mammalia* 68 (2-3): 159-165.
- PALAZÓN, S. y J.C. CEÑA. 2007. *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761). En: Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. L.J. Palomo, J. Gisbert y J.C. Blanco (eds). Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid: 287-290.
- PALAZÓN, S., M. PÉREZ, A. BATET, L. ARJONA, E. RAFART, C. MALO y J. RUIZ-OLMO. 2010. Situación actual y evolución de la población de turón (*Mustela putorius* L., 1758) en Cataluña: 1950-2008. *Galemys* 22 (1): 91-112.
- PERSSON, S., B-M. BÄCKLIN, H. KINDAHL, B. BRUNSTRÖM y U. MAGNUSSON. 2011. Influence of age, nutritional status and season on the reproductive system in wild male mink (*Neovison vison*). *European Journal of Wildlife Research* 57: 1057-1063.
- PERSSON, S. T.H. JENSEN, A-L. BLOMSTRÖM, M.T. APPELBERG y U. MAGNUSSON. 2015. Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden. *PLoS ONE* 10 (3): e0122194. doi: 10.1371/journal.pone.0122194.
- PHILIPPA, J., C. FOURNIER-CHAMBRILLON, P. FOURNIER, W. SCHAFTENAAR, M. VAN DE BILDT, R. VAN HERWEIJNEN, T. KUIKEN, M. LIABEU, S. DITCHARRY, L. JOUBERT, M. BÉGNIER y A. OSTERHAUS. 2008. Serologic survey for selected viral pathogens in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other mustelids from south-western France. *Journal of Wildlife Diseases* 44 (4): 791-801.
- PILBEAM, T.E., P.W. CONCANNON y H.F. TRAVIS. 1979. The annual reproductive

- cycle of mink (*Mustela vison*). Journal of Animal Science 48: 578-584.
- PÖDRA, M., A. GÓMEZ y S. PALAZÓN. 2013. Do American mink kill European mink? Cautionary message for future recovery efforts. European Journal of Wildlife Research 59: 431-440.
- PORTER, D.D. y A.E. LARSEN. 1964. Statistical survey of Aleutian disease in ranch mink. American Journal of Veterinary Research 25: 1226-1229.
- PORTER, D.D., M.D. FRANK, J. DIXON y A.E. LARSEN. 1965. Metabolism and function of gamma globulin in Aleutian disease of mink. The Journal of Experimental Medicine 121: 889-900.
- PORTER, D.D., y A.E. LARSEN. 1968. Virus-Host Interactions in Aleutian Disease of Mink. En: Perspectives in Virology, Vol. 6. Academic Press Inc., (eds.). New York: 173-187.
- PORTER, D.D., A.E. LARSEN y H.G. PORTER. 1969. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. I. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigen. The Journal of Experimental Medicine 130 (3): 575-589.
- PORTER, D.D. y A.E. LARSEN. 1974. Aleutian disease of mink. Progress in Medical Virology 18: 32-47.
- PORTER, D.D., A.E. LARSEN y H.G. PORTER. 1980. Aleutian Disease of mink. Advances in Immunology 29: 261-286.
- PORTER, D.D. y H.J. CHO. 1980. Aleutian disease of mink: a model for persistent infection. Comprehensive Virology 16: 233-256.
- PORTER, D.D., H.G. PORTER y A.E. LARSEN. 1984. Much of the increased IgG in Aleutian disease of mink is viral antibody. Journal of Experimental Pathology 1: 79-88.
- PORTER, D.D. 1986. Aleutian disease: A persistent parvovirus infection of mink with a maximal but ineffective host immune response. Progress in Medical Virology 33: 42-60.

- PORTER, D.D. y A.E. LARSEN. 1990. Mink parvovirus infections. En: Handbook of Parvoviruses. Vol II. P. Tijssen (ed). Boca Raton, Florida, USA: 87-101.
- PORTER, H.G., D.D. PORTER y A.E. LARSEN. 1982. Aleutian disease in ferrets. Infection and Immunity 36 (1): 379-386.
- PORTEUS, T., M. SHORT, S. RICHARDSON y J. REYNOLDS. 2012. Empirical development of strategy for the control of invasive American mink by trapping. European Journal of Wildlife Research 58: 403-413.
- PRIETO, A., J.M. DÍAZ-CAO, R. FERNÁNDEZ-ANTONIO, R. PANADERO, P. DÍAZ, C. LÓPEZ, P. MORRONDO, P. DÍEZ-BAÑOS y G. FERNÁNDEZ. 2014. Application of real-time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. Veterinary Microbiology 173: 355-359.
- REYNOLDS, J.C., T.A. PORTEUS, S.M. RICHARDSON, R.J. LEIGH y M.J. SHORT. 2010. Detectability of American mink using rafts to solicit field signs in a population control context. Journal of Wildlife Management 74 (7): 1601-1606.
- REYNOLDS, J.C., S.M. RICHARDSON, B.J.E. RODGERS y O.R.K. RODGERS. 2013. Effective control of non-native American mink by strategic trapping in a river catchment in mainland Britain. The Journal of Wildlife Management 77 (3): 545-554.
- RODRIGUEZ DE ONDARRA, P.M. 1955. Hallazgo, en Guipúzcoa, de un mamífero no citado en la "Fauna Ibérica" de Cabrera. Munibe 4: 201-207.
- ROZHNOV, V.V. 1993. Extinction of the European mink; ecological catastrophe or natural process?. Lutreola 1: 10-16.
- RUIZ-OLMO, J., S. PALAZÓN, F. BUENO, C. BRAVO, I. MUNILLA y R. ROMERO. 1997. Distribution, status and colonization of the American mink *Mustela vison* in Spain. Journal of Wildlife Research 2 (1): 30-36.
- SAIFUDDIN, M. y J. G. FOX. 1996. Identification of a DNA segment in ferret Aleutian disease virus similar to a hypervariable capsid region of mink Aleutian disease parvovirus. Archives of Virology 141: 1329-1336.

- SAINT-GIRONS, M.CH. 1991. Le vison sauvage (*Mustela lutreola*) en Europe. Collection Sauvegarde de la Nature, 54. Consejo de Europa (eds.), Strasbourg, Francia.
- SANCHEZ-MIGALLÓN, D., A. CARVAJAL, J.F. GARCÍA-MARÍN, M. C. FERRERAS, V. PÉREZ, M. MITCHELL, F. URRÁ y J.C. CEÑA. 2008. Aleutian disease serology, protein electrophoresis, and pathology of the European mink (*Mustela lutreola*) from Navarra, Spain. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39 (3): 305-313.
- SANCHO, J.R. 1995. Sobre la presencia del visón Americano, *Mustela vison* Schreber 1777, en la provincia de Burgos. *Boletín SECEM* 7: 9
- SANG, Y., J. MA, Z. HOU y Y. ZHANG. 2012. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of Aleutian mink disease parvoviruses isolated from 2009 to 2011 in China. *Virus Genes* 45: 31-37.
- SATO, J.J., T. HOSODA, M. WOLSAN, K. TSUCHIYA, Y. YAMAMOTO y H. SUZUKI. 2003. Phylogenetic relationships and divergence times among Mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome *b* genes. *Zoological Science* 20: 243-264.
- SCHEFFER, V.B. 1950. Growth layers on the teeth of Pinnipedia as an indication of age. *Science* 112: 309-11.
- SCHREIBER, A., R. WIRTH, M. RIFFEL y H. VAN ROMPAEY. 1989. Weasels, Civets, Mongooses and their relatives: an action plan for the conservation of mustelids and viverrids. The World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- SCHUIERER, S., M. E. BLOOM, O.-R. KAADEN y U. TRUYEN. 1997. Sequence analysis of the lymphotropic Aleutian disease parvovirus ADV-SL3. *Archives of Virology* 142: 157-166.
- SFPEM. 2014. Propositions pour l'élaboration du troisième Plan National d'Action pour le Vison d'Europe. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères. Francia.

- SIDOROVICH, V.E. 1992. Comparative analysis of the diets of European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*) in Byelorussia. *Small Carnivore Conservation* 6: 2-4.
- SIDOROVICH, V.E. 1993. Reproductive plasticity of the American mink *Mustela vison* in Belarus. *Acta Theriologica* 38 (2): 175-183.
- SIDOROVICH, V.E. 1997. Demography of the declining European mink population in Belarus. Disappearance of the European mink: discussion of the hypotheses and original ideas. En: Zolotoy Uley publisher (ed) *Mustelids in Belarus. Evolutionary ecology, demography and interspecific relationships*, Minsk, Belarus: 187-191.
- SIDOROVICH, V.E., H. KRUK, D.W. MACDONALD y T. MARAN. 1998. Diets of semi-aquatic carnivores in northern Belarus, with implications for population changes. En: N. Dunstone y M.L. Gorman (eds), *Behaviour and Ecology of Riparian Mammals. Symposium de la Zoological Society of London*, UK: 177-190.
- SIDOROVICH, V.E. 2000. Seasonal variation in the feeding habits of riparian mustelids in river valleys of NE Belarus. *Acta Theriologica* 45 (2): 233-242.
- SIDOROVICH, V.E. 2001a. Findings on the ecology of hybrids between the European mink *Mustela lutreola* and polecat *M. putorius* at the Lovat upper reaches, NE Belarus. *Small Carnivore Conservation* 24: 1-5.
- SIDOROVICH, V.E. 2001b. Study on the decline in the European mink *Mustela lutreola* population in connection with the American mink *M. vison* expansion in Belarus: Story of the study, review of the results and research priorities. *Säugetierkundliche Informationen* 5: 133-153.
- SIDOROVICH, V.E. y D.W. MACDONALD. 2001. Density dynamics and changes in habitat use by the European mink and other native mustelids in connection with the American mink expansion in Belarus. *Netherlands Journal of Zoology* 51 (1): 107-126.
- SIDOROVICH, V.E., D.W. MACDONALD, M.M. PIKULIK y H. KRUK. 2001. Individual feeding specialization in the European mink, *Mustela lutreola* and the

- American mink, *M. vison* in north-eastern Belarus. *Folia Zoologica* 50 (1): 27-42.
- SIDOROVICH, V., y A. POLOZOV. 2002. Partial eradication of the American mink *Mustela vison* as a way to maintain the declining population of the European mink *Mustela lutreola* in a continental area. A case study in the Lovat River head, NE Belarus. *Small Carnivore Conservation* 26: 12-15.
- SKÍRNISSON, K., E. GUNNARSSON y S. HJARTARDÓTTIR. 1990. Plasmacytosis-sýking í villtum mink á Íslandi. *Icelandic Agricultural Science* 3: 113-122.
- SKUMATOV, D.V. 2001. The first registration of the virus plasmacytosis in free-ranging mustelids in Kirov Region. *Proceedings of the European Mink Second Workshop. Central Forest State Natural Biosphere Reserve. Nelidovo. Russia*: 96-97.
- STEINEL, A., C.R. PARRISH, M.E. BLOOM y U. TRUYEN. 2001. Parvovirus infections in wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases* 37 (3): 594-607.
- TUMANOV, I.L. y A.V. ABRAMOV. 2002. A study of the hybrids between the European Mink *Mustela lutreola* and the Polecat *M. putorius*. *Small Carnivore Conservation* 27: 29-31.
- VIRGOS, E. 2007. *Mustela putorius* (Linnaeus, 1758). En: Palomo LJ, Gisbert J, Blanco JC (eds.) *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid: 294-296.
- WEBER, D. 1989. Beobachtungen zu Aktivität und Raumnutzung beim Iltis (*Mustela putorius*, L.). *Revue Suisse de Zoologie* 96 (4): 841-862.
- WELCHMAN, D.D., M. OXENHAM y S.H. DONE. 1993. Aleutian disease in ferrets: diagnostic findings and survey results. *The Veterinary Record* 132: 479-484.
- WELLS, G.A.H., I.F. KEYMER y K.C. BARNETT. 1989. Suspected Aleutian disease in a wild otter (*Lutra lutra*). *The Veterinary Record* 125: 232-235.
- WITHMAN, J.S. 2003. Age structure differences in American Mink, *Mustela vison*, populations under varying harvest regimes. *Canadian Field-Naturalist* 117 (1): 35-38.
- WRIGHT, P.F. y B.N. WILKIE. 1982. Detection of antibody in Aleutian disease of mink:

Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and counterimmunoelectrophoresis. *American Journal of Veterinary Research* 43 (5): 865-868.

YAMAGUCHI, N. y D.W. MACDONALD. 2001. Detection of Aleutian disease antibodies in feral American mink in southern England. *Veterinary Record* 149: 485-488.

YAMAGUCHI, N., R.J. SARNO, W.E. JOHNSON, S.J. O'BRIEN y D.W. MACDONALD. 2004. Multiple paternity and reproductive tactics of free-ranging American minks, *Mustela vison*. *Journal of Mammalogy* 85 (3): 432-439.

YOUNGMAN, P.M. 1982. Distribution and systematics of the European mink, *Mustela lutreola* Linnaeus, 1761. *Acta Zoologica Fennica* 166: 1-48.

YOUNGMAN, P.M. 1990. *Mustela lutreola*. *Mammalian Species* 362: 1-3.

ZABALA, J., I. ZUBEROGOITIA y J.A. MARTÍNEZ-CLIMENT. 2007. Spacing pattern, intersexual competition and niche segregation in American mink. *Annales Zoologici Fennici* 44: 249-258.

ZABALA, J., I. ZUBEROGOITIA y J.A. GONZÁLEZ-OREJA. 2010. Estimating cost and outcomes of invasive American mink (*Neovison vison*) management in continental areas: a framework for evidence based control and eradication. *Biological Invasions* 12 (9): 2999-3012.

ZALEWSKI, A. y M. BARTOSZEWICZ. 2012. Phenotypic variation of an alien species in a new environment: the body size and diet of American mink over time and at local and continental scales. *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 681-693.