

Relatório de Atividades Época Venatória 2018-2019 e 2019-2020

+Coelho 2: *Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal*

Relatório de atividades do segundo projeto +Coelho, que compreendeu as épocas venatórias 2018-2019 e 2019-2020.

"+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal"

[submetido em 21-01-2021 ao Instituto da Conservação da Natureza e Florestas, I.P. (ICNF)]

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

ENTIDADE RESPONSÁVEL

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.)
Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), 2780-157 Oeiras, Portugal
Tel.: (+351) 214 403 500
Fax: (+351) 214 416 011
E-mail: geral@iniav.pt
E-mail: maiscoelho@iniav.pt

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA E FINANCEIRA

Doutora Margarida Duarte, INIAV I.P.

Financiamento: *Fundo Florestal Permanente*, Eixo de Intervenção IV: Funções Ecológicas, Sociais e Culturais da Floresta, Projeto n.º 2019014300001

ENTIDADES PARTICIPANTES

Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)
Campo Grande 50, 1700-093 Lisboa, Portugal
Tel.: (+351) 213 239 500
Fax: (+351) 213 463 518
e-mail: dirgeral@dgav.pt

Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA)
Rua 25 de Abril, Lote 20 – Cave B, 2100-126 Coruche, Portugal
Tel.: + 351 243 675 519
Fax: + 351 243 617 139
e-mail: sede@fencaca.pt

Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP)
Rua Dr. António Oliveira Cruz, 18, 5340-238 Macedo de Cavaleiros, Portugal
Tel.: (+351) 278426368
e-mail: info@cncp.pt

Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC)
Rua Mestre Lima de Freitas, nº1, 5º andar, 1549-012 Lisboa, Portugal
Tel.: (+351) 217100029
e-mail: anpc@anpc.pt

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO) da Universidade do Porto/ InBIO- Rede Nacional de Investigação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Laboratório Associado
Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas - Crasto, nº 7, 4485-661 Vairão, Portugal
Tel.: (+351) 252660428
e-mail: cibio@cibio.up.pt

Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Av. República, Qta. do Marquês
Edifício IBET/ITQB, 2780-157 Oeiras-Portugal
Tel.: (+351) 214 427 787
e-mail: aroldao@ibet.pt

ENTIDADES BENEFICIÁRIAS

- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.)
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)
- Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA)
- Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP)
- Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC)
- Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agroalimentares (ICETA) da Universidade do Porto
- Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO)
- Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET)

EQUIPA DE PROJETO

Coordenação científica e técnica:
Doutora Margarida Duarte, INIAV I.P.

Execução técnica:
Doutora Margarida Duarte, INIAV, I.P.
Doutora Carina L. Carvalho, INIAV, I.P.*
Mestre Fábio Abade dos Santos, INIAV, I.P.
Dra. Jéssica Monteiro, INIAV, I.P.
Dra. Teresa Fagulha, INIAV, I.P.
Dra. Teresa Albuquerque, INIAV, I.P.
Doutora Sandra Cavaco, INIAV, I.P.
Doutor Jacinto Gomes, INIAV, I.P.
Doutora Helga Waap, INIAV, I.P.
Eng.º João Fernandes, INIAV, I.P.
Dra. Madalena Monteiro, INIAV, I.P.
Dr. Paulo Carvalho, INIAV, I.P.
Dra. Paula Mendonça, INIAV, I.P.
Doutor Paulo Célio Alves, CIBIO/InBIO UP
Doutor Nuno Santos, CIBIO/InBIO UP
Doutor João Queirós, CIBIO/InBIO UP
Doutor Pedro Monterroso, CIBIO/InBIO UP
Mestre Ana Serronha, CIBIO/InBIO UP
Doutor Pedro Esteves, CIBIO/InBIO UP
Doutora Joana Abrantes, CIBIO/InBIO UP
Doutora Ana Margarida Lopes, CIBIO/InBIO UP
Doutora Yolanda Vaz, DGAV
Mestre Alexandra Fernandes, DGAV

Dra Rita Amador, DGAV
Dra Ana Paula Martins, DGAV
Mestre Ana Caria, DGAV
Mestre Patrícia Tavares Santos, DGAV
Mestre Pedro Canavilhas Melo, DGAV
Mestre José Manuel Costa, DGAV
Doutora Maria João Fradinho, DGAV
Jacinto Amaro, FENCAÇA
Mestre João Carvalho, ANPC
Eng.º António Paula Soares, ANPC
Eng.º Fernando Castanheira Pinto, CNCP
Eng.º José Bernardino, CNCP

*Entre 1de novembro de 2018 e 29 de fevereiro de 2019

Com a colaboração de:
Sebastião Miguel, Gestor de Cinegético
Eng.º Gonçalo Lopes, ICNF
Eng.ª Ana Hora, ICNF
Eng.º Manuela Berjano, INIAV, I.P.
Dra. Maria José Silva, INIAV, I.P.
Eng.º Paulo Dias Carvalho, INIAV, I.P.
Eng.º Mário Borges, INIAV, I.P.
Carlos Lucas, INIAV, I.P.
Virgílio Costa, INIAV, I.P.
Eng.º Válter Caetano, INIAV, I.P.
Ana Paula Alves, INIAV, I.P.
Eng.º Luís Alberto Mendes, INIAV, I.P.
Marco Alexandre dos Santos, INIAV I.P.
Doutor Benvindo Maçãs, INIAV, I.P.
Doutor Eitas Dias, INIAV.I.P.
Eng.ª Ana Perdigão, FENCAÇA
Eng. º Jorge Santos, FENCAÇA
Eng.º Jorge Maia, FENCAÇA
Eng.º Paulo Paixão, FENCAÇA
Carla Serrão, FENCAÇA
Eng.º Ricardo Neto, ANPC
Eng.º Miguel Capelo, ANPC
Eng.º André Lourenço, ANPC
Eng.º António Moreira, CNCP
André Cid, CNCP
Eng.º Eduardo Valente, CNCP
Eng.º Pedro Colaço, CNCP
Eng.ª Sandra Maria Marçal, CNCP
Eng.ª Ana Paula Pires Ferreira, CNCP
Eng.º Jorge Neves (Sotecnica)

Doutora Olga Moreira, INIAV I.P.
Alfredo Lobato, FENCAÇA
Eng.º António Sequeira, INIAV, I.P.

Agradecimentos
Gabinete de Comunicação e Imagem, INIAV, I.P.
Gabinete de Informação ao Cliente, INIAV, I.P.
Laboratório de Virologia, UEISPSA, INIAV I.P.
Silvina Simões, INIAV, I.P.
Manuela Gaspar. INIAV, I.P.
Maria João Teixeira, INIAV, I.P.
Maria de Fátima Cordeiro, INIAV, I.P.
Pedro Vitorino, Revista Caça e Cães de Caça

O presente relatório deve ser citado como:

Duarte, M., Carvalho, C. L., Santos, F. A., Monteiro, J., Gomes, J., Alves, P. C., Esteves, P. J., Abrantes, J., Lopes, A. M., Monterroso P., Serronha, A., Santos, N., Santos, Santos, P.T., Carvalho, J., Pinto, F. C., J. Bernardino, Amaro, J., (2020). "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal". Relatório de atividades na época venatória 2018-2019 e 2019-2020. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF.

Lista de Conteúdos

1. Organização do Relatório 1

2. Objetivos do Plano de Ação e do Projeto "+Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal 3

Eixos de Intervenção do Plano de Ação e Princípios Orientadores 3

Objetivos gerais (OG) do Projeto +Coelho 2 4

Medidas Gerais (MG) e objetivos específicos (OE) do Projeto +Coelho 2 5

3. Amostrar as populações de leporídeos caçados em zonas de caça selecionadas nas épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020 e as populações de leporídeos que evidenciem morbilidade ou mortalidade em todo o território nacional e no período a que se refere este relatório (01.11.2018 a 30.06.2020) e efetuar as análises laboratoriais necessárias ao conhecimento do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica (OE1) 7

Áreas de amostragem 10

Zonas de caça (ZC) amostradas durante as épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020 10

Recolha de material biológico (protocolos e Kits) 11

Capacitação dos técnicos das OSC (FENCAÇA, ANPC e CNCP) para a recolha de material 11

Ações de Formação 11

Caracterização da amostragem recolhida entre 1 de Setembro de 2018 e 30 de junho de 202011

Origem geográfica e temporal das amostras de leporídeos silvestres 14

Participação das OSC 1º nível e outros parceiros na amostragem 26

4. Investigar o estado hígio-sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica (OE1) 27

Resultados laboratoriais em leporídeos silvestres 27

Resultados Virológicos 27

Avaliação serológica para RHDV2 47

Resultados Anatomopatológicos 51

Resultados Bacteriológicos 61

Resultados Parasitológicos 67

5. Determinar as abundâncias de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica em zonas de caça selecionadas (OE2) 76

Caracterização da demografia do coelho-bravo e a epidemiologia da DHV em diferentes biótopos 76

Metodologia de Contagens de Excrementos em Pontos Fixos 78

Metodologia de Contagens Diretas de Coelhos-bravo 2018-2019 80

Tratamento e Análise de Dados 81

Reformulação da Metodologia de Contagens Diretas de Coelhos-bravo 2020 e Análise Comparativa do Esforço Técnico e Financeiro 83

Capacitação dos técnicos das OSC (FENÇAÇA, ANPC e CNCP) 85

Resultados da Avaliação das Populações Naturais de Coelho-bravo 86
Avaliação individualizada das populações naturais de coelho-bravo 87
Penafiel (PNF) - ZCM Mouzinho 87
Benavente (BNV) - ZCT de Roubão, Braço de Prata e Outras 89
Montemor-o-Novo (MTN) - ZCA das Herdades da Abrunheira, Paço do Aragão e outras 92
Estremoz (EST) - ZCT do Monte de Cima 96
Ferreira do Alentejo (FAL) – ZCT das Cortes 99
Serpa (SRP) – ZCT de Vale Perditos 102
Mértola (MRT) – ZCT Corte de Gafo 105
Alcoutim (ALC) – ZCT Herdade do Pereiro 108
Tavira (TVR) – ZCA Cerro da Cabeça 111
Mértola 2 (MRT2) – ZCA Moninho 113
Avaliação da presença de anticorpos nas populações naturais das áreas em estudo 117
Monitorização Demográfica e Epidemiológica Longitudinal de duas Populações-sentinela de coelho-bravo 120
Metodologia 120
Resultados 123
Capturas 123
Parâmetros demográficos 123
Parâmetros sanitários 126
Conclusões 127
Perspetivas futuras 128
6. Caraterizar a demografia do coelho-bravo e da lebre-ibérica e a epidemiologia dos agentes patogénicos mais relevantes que afetam estas espécies em diferentes biótopos, para ajustar adequadamente as medidas futuras de intervenção a diferentes cenários (OE3) 131
Desenvolvimento de plataforma interativa 131
7. Aumentar a consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos, através do desenvolvimento de ações de educação e sensibilização sobre o estatuto frágil da subespécie *O. c. algirus* e da espécie *Lepus granatensis*, a importância da conservação dos recursos genéticos autóctones e a importância de se limitar a circulação de agentes patogénicos através da adoção de boas práticas no campo (OE.4) 135
Objetivos 135
Feiras de Caça 136
Workshops 137
Palestras nacionais 137
Palestras internacionais 137

8. Assegurar a melhoria da condição corporal dos leporídeos caçados após suplementação de alimento composto administrado em comedouro para coelho-bravo desenvolvido pelo projeto (e registo de patente) (OE.5) 139
Objetivo 139
Características do alimento composto 139
Enquadramento legal da utilização de alimento medicamentoso 140
Ensaio de Palatibilidade 140
Ensaio Piloto de desparasitação 140
A Ração +Coelho como veículo de vacina oral para RHDV2 142
Comedouros 142
9. Averiguar se as vacinas comerciais contra a mixomatose induzem a produção de anticorpos protetores em lebre-ibérica, tendo em vista a sua utilização no futuro, caso a espécie venha a ser considerada criticamente ameaçada (OE6) 143
Objetivos da medida 143
Enquadramento legal da medida 144
Delineamento experimental do Ensaio 144
Obtenção de exemplares de lebre-ibérica através de eventos de captura no campo 145
Adequação das instalações para manutenção dos animais. Alimentação e Maneio dos Animais 152
Avaliação sanitária das lebres capturadas 154
Construção de uma Unidade Laboratorial móvel 163
Resultados do Ensaio 165
10. Conferir imunidade às populações naturais de coelho-bravo contra as estirpes de RHDV2 em circulação, através do desenvolvimento de uma vacina oral, que implica a caraterização genética das estirpes circulantes para modelação da vacina (OE7) 167
Objetivo 167
Continuação da caracterização molecular do gene completo da proteína da cápside VP60 168
Seleção das estirpes para a vacina 168
Caracterização molecular dos genes não estruturais de RHDV2 169
Divulgação do projeto 169
11. Alavancar a recuperação do coelho-bravo e da lebre-ibérica através do desenvolvimento de medidas práticas de gestão nas zonas de caça que favoreçam a proliferação das populações naturais e assegurem o sucesso de ações de translocação (OE.8). 171
12. Património genético, criação de cercados e infraestruturas complementares (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém (Pólo do INIAV) e de 3 cercados de reprodução *modelo* em zonas de caça (OE.9) 173
Avaliação da pureza genética dos animais para os cercados de reprodução; caracterização Genética e Deteção de Hibridação e Coelho-bravo 182

Objetivo 182
Amostragem 182
Metodologia 182
Resultados e conclusões 183
13. Promover ações de translocação com animais imunizados pelo contato natural com RHDV2 (OE. 10) 185
14. Divulgar e publicar as atividades técnico-científicas desenvolvidas e os resultados científicos obtidos no âmbito do Projeto +Coelho2 para diferentes públicos e promover ações de demonstração (OE.11) 189
Notícias no banner +Coelho 189
Em forma de manuais práticos de apoio ao setor 194
Em formato de folhetos 194
Em Alertas e Recomendações para minimizar a transmissão e disseminação de RHDV2 e mixomatose 194
Em entrevistas televisivas 194
Em colóquios e feiras de caça nacionais e estrangeiras (estimando-se uma média de 50 participantes por evento) 195
Em *workshops* de sensibilização do público em geral e do público jovem 196
Em congressos científicos 196
Assistência a reuniões Ibéricas 197
Em revistas de circulação nacional para público especializado 198
Em revistas de circulação nacional para público não especializado 198
Em capítulos de livros 199
Em revistas internacionais com arbitragem científica 199
Em dissertações académicas 200
Relatórios específicos 200
Dossiers Técnicos 200
Notícias em Websites 200
Desenvolvimento de Websites 201
15.Avaliação sanitária de cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética 202
16. Conclusões 210
17. Sumário dos indicadores de realização 229
Anexos 243

Lista de Figuras

Figura 1. Zonas de caça amostradas nas EV 18/19 (**A**) e 19/20 (**B**).....10
Figura 2. Percentagens relativas de leporídeos silvestres (coelho-bravo e lebre-ibérica) amostrados por categoria: cadáver e caçado. 12
Figura 3. Sexo e classes etárias na amostragem de coelho-bravos caçados (esquerda) e encontrados mortos no campo (direita) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 13
Figura 4. Sexo e classes etárias na amostragem de lebres caçadas (esquerda) e encontradas mortas no campo (direita) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.....14
Figura 5. Amostragem de lebre-ibérica caçada por unidade territorial NUT II na EV 18/19.....14
Figura 6. Amostragem de lebre-ibérica caçada por unidade territorial NUT II na EV 19/20. ...14
Figura 7. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por distrito na época cinegética de 2018/2019. 15
Figura 8. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por distrito na época cinegética de 2019/2020. 15
Figura 9. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por concelho na época cinegética de 2018/2019. 15
Figura 10. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por concelho na época cinegética de 2019/2020. 16
Figura 11. Localização geográfica dos locais onde foram caçadas e amostradas as lebres-ibéricas na época cinegética de 2018/2019 (**A**) e 2019/2020 (**B**). O número de animais caçados em cada zona de caça está indicado sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. 16
Figura 12. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por Nut II.....17
Figura 13. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por distrito.....17
Figura 14. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por concelho.....18
Figura 15. Origem geográfica dos cadáveres de lebre-ibérica recolhidos entre 30 de outubro de 2018 e 30 de junho de 2020.....19
Figura 16. Amostragem de coelho-bravo caçado por unidade territorial NUT II na época cinegética de 2018/2019. 20
Figura 17. Amostragem de coelho-bravo caçado por unidade territorial NUT II na época cinegética de 2019/2020. 20
Figura 18. Amostragem de coelho-bravo caçado por distrito na época cinegética de 2018/2019. 20
Figura 19. Amostragem de coelho-bravo caçado por distrito na época cinegética de 2019/2020. 21
Figura 20. Amostragem de coelho-bravo caçado por concelho na época cinegética de 2018/2019. 21
Figura 21. Amostragem de coelho-bravo caçado por concelho na época cinegética de 2019/2020. 21
Figura 22. Localização geográfica dos locais onde foram caçados os coelhos-bravos nos períodos cinegéticos de setembro a dezembro de 2018 (**A**) e de setembro a dezembro de 2019 (**B**). O número de animais caçados em cada zona de caça está indicado sobre um círculo cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. 22
Figura 23. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida, por unidade territorial NUT II, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. 23
Figura 24. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida, por distrito, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. 23

Figura 25. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida por, por concelho, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. 24
Figura 26. Localização geográfica dos locais onde foram recolhidos os cadáveres de coelho-bravo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. O número de cadáveres recolhidos em cada zona está indicado sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. 25
Figura 27. Localização geográfica dos coelhos caçados na EV 19/20. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto. Apenas uma amostra de coelho-bravo caçado foi positiva a RHDV2. 28
Figura 28. Localização geográfica das amostras de coelho-bravo caçado, positivas ao vírus da mixomatose, obtidas na EV 18/19 (**A**) e na EV 19/20 (**B**). O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto. 29
Figura 29. Positividade a mixomatose na amostra de coelho-bravo caçado na EV 2018-19 (**A**) e na EV 2019-20 (**B**), por distrito. 30
Figura 30. Localização geográfica das zonas de caça (ZC) onde foram caçados os coelhos-bravos amostrados entre os meses de setembro e dezembro de 2018 (EV 18/19) e setembro e dezembro de 2019 (EV 2019-2020). O número de animais caçados por ZC está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem, e o número de animais positivos a **mixomatose** encontra-se indicada a vermelho sobre o círculo correspondente. 31
Figura 31. Positividade a RHDV2 na amostra de cadáveres de coelho-bravo recolhidos no campo. 32
Figura 32. Localização geográfica dos cadáveres de coelho-bravo positivos RHDV2. O número de animas positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto. 33
Figura 33. Positividade a RHDV2 na amostra de cadáveres de coelho-bravo recolhidos entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito. 34
Figura 34. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de coelho-bravo enviados para o INIAV I.P. Alguns animais (n=10), referem-se ao 2º trimestre de 2016. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a **RHDV2**, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente. 36
Figura 35. Localização geográfica dos cadáveres de coelho-bravo positivos mixomatose. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege, cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras recolhidas está indicado a preto. 37
Figura 36. Positividade a mixomatose na amostra de cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito. 38
Figura 37. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de coelho-bravo enviados para o INIAV I.P. Alguns animais (n=10), referem-se ao 2º trimestre de 2016. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a mixomatose, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente. 40
Figura 38. Localização geográfica dos cadáveres de lebre ibérica positivos mixomatose. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege, cujo

diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto. 42
Figura 39. Positividade a mixomatose na amostra de cadáveres de lebre-ibérica encontrados no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito. 42
Figura 40. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 20 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de lebre-ibérica enviados para o INIAV I.P. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a mixomatose, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente. 44
Figura 41. Distribuição do RHDV2 e do vírus da mixomatose em Portugal continental no período entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 de acordo com a amostragem testada. A percentagem de positividade a cada um dos vírus na amostra, por distrito, é indicada na legenda. 45
Figura 42. Mapa de Portugal continental com (**A**) número de soros de coelho-bravo analisados por localidade amostrada, (**B**) número de soros de lebre-ibérica analisados por localidade amostrada. 48
Figura 43. Mapa de Portugal continental com a percentagem de soros positivos/negativos por localidade para (**A**) coelho-bravo e (**B**) lebre-ibérica. 49
Figura 44. Distribuição dos títulos de anticorpos (em %) para coelho-bravo e lebre ibérica. Eixo dos xx: título de anticorpos obtido através da técnica de ELISA para animais considerados inicialmente positivos por ELISA indireta. Eixo dos yy: proporção d desses animais que apresentam determinado título. 50
Figura 45. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de coelho-bravo encontrados mortos e respetiva positividade amostral. 65
Figura 46. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de lebre-ibérica encontrados mortos e respetiva positividade amostral. 66
Figura 47. Microscopia eletrónica de amostra de pele de uma lebre LeHV-5 positiva. 71
Figura 48. Lesões (vesículas e vesiculo-pústulas) presentes numa lebre morta com LeHV-5. 72
Figura 49. Análise filogenética baseada em 37 sequencias aminoacídicas da enzina DNA polimerase de herpesvirus de várias espécies de vertebrados. A sequência nucleotídica do vírus identificado (no topo da arvore) apresenta uma relação genética mais próxima com herpesvírus de roedores. 73
Figura 50. Zonas de Caça (áreas de estudo a vermelho) onde foi estabelecida a monitorização das populações de coelho-bravo 77
Figura 51. Esquema geral de implementação das unidades de amostragem para monitorização de coelho-bravo e das grelhas de contagem de excrementos. 78
Figura 52. Fotografia de uma unidade de contagem de excrementos, onde o círculo corresponde a uma área circular de 1 m2, com exemplificação de remoção da vegetação para contagem e remoção de excrementos de coelho-bravo. 79
Figura 53. Representação esquemática de percurso para amostragem por contagem direta de animais nas zonas de caça a amostrar. 81
Figura 54. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) de julho de 2018 a novembro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo de Penafiel (PNF). 87
Figura 55. Representação gráfica doa estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses

amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de abril de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo PNF. 88
Figura 56. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita), para julho de 2018 e de outubro de 2018 a agosto de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo BNV. 90
Figura 57. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo BNV. 91
Figura 58. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) de junho de 2018 a março de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo MTN. 93
Figura 59. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de abril de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MTN 94
Figura 60. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico superior) e a média entre todas as grelhas (gráfico inferior) entre julho de 2018 e outubro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo EST. 96
Figura 61. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo EST. 97
Figura 62. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico superior) e a média entre todas as grelhas (gráfico inferior) entre maio e julho de 2018, e entre novembro de 2018 e junho de 2019, com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo FAL. 99
Figura 63. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo FAL. Ver legenda anteriores. 100
Figura 64. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre junho e julho de 2018 e posteriormente de forma pontual em fevereiro, abril, julho e setembro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo SRP 102
Figura 65. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo SRP. 103
Figura 66. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre abril, maio e junho de 2018 e posteriormente entre junho e agosto de 2019 com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo MRT. 105

Figura 67. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MRT. 106
Figura 68. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre maio e julho de 2018 e entre dezembro de 2018 e setembro de 2019, com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo ALC. 108
Figura 69. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo ALC. 109
Figura 70. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre abril e junho e julho de 2018 e posteriormente entre dezembro de 2018 e fevereiro de 2019 com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo TVR. 111
Figura 71. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo TVR. 112
Figura 72. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MRT2. 114
Figura 73. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MTN2. 116
Figura 74. Amostras de Coelho-bravo com % de anticorpos para a RHDV2, para cada área de estudo, em cada uma das fases do projeto (+Coelho e +Coelho2). 119
Figura 75. Área de estudo na Companhia das Lezírias, situada na Silha do Matias, com a localização das armadilhas. 120
Figura 76. Caixa armadilha Tomahawk™ iscada para captura de coelho bravo. 121
Figura 77. Captura, manipulação para recolha de amostras e libertação de coelho bravo. 121
Figura 78. Abundância de coelho bravo estimada para a área de estudo da Companhia das Lezírias, com erro padrão, utilizando modelos POPAN. 124
Figura 79. Abundância de coelho-bravo no cercado do Resbaloso, com erro-padrão. Abundância estimada utilizando modelos POPAN. 124
Figura 80. Quinzena de nascimento dos coelhos na área de estudo da Companhia das Lezírias, com <900g à primeira captura, estimadas com base no peso (Ferreira & Ferreira, 2014). Dados de 2018-2020 agrupados. 125
Figura 81. Número de coelhos bravos nascidos no cercado na Herdade da Coitadinha, por quinzena. Datas de nascimento estimadas com base no peso (Ferreira & Ferreira, 2014), para os coelhos com menos de 900g à captura. Dados de 2019 e 2020 agrupados. 125
Figura 82. Ação de Formação realizada a 28 de novembro de 2019 no INIAV, I.P. em Oeiras. 132
Figura 83. Estomago de coelho com Graphidium strigosum. 141

Figura 84. Colocação de rede de tresmalhe para captura das lebres. Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, Canhestros, a 31 de agosto de 2019. 146
Figura 85. Após a linha de rede colocada, deu-se início à batida para direcionar os animais para a rede. Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, Canhestros, a 31 de agosto de 2019..... 147
Figura 86. Colocação junto à rede, à espera do aprisionamento de algum animal. Herdade do Brunhal, 26 de outubro de 2019. 147
Figura 87. Pessoal a deslocar-se para posicionamento na linha de batida. Herdade do Brunhal, 26 de outubro de 2019. 148
Figura 88. Alunos da Escola Profissional Agricola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras), envolvidos no evento de captura em Santa Clara do Louredo, 29 de outubro de 2019. 148
Figura 89. Aluno da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras), envolvido no evento de captura em Santa Clara do Louredo, 29 de outubro de 2019..... 149
Figura 90. Imagens da captura realizada na Herdade dos Pinheirinhos, na Fundação Eugénio de Almeida, a 4 de outubro de 2019. Em cima, Fábio Abade dos Santos, Margarida Duarte e Gonçalo Lopes retirando uma lebre da rede. Em baixo, Gonçalo Lopes e João Carvalho em diferentes momentos. 149
Figura 91. Sebastião Miguel contendo uma lebre capturada na Fundação Eugénio de Almeida, a 4 de outubro de 2019 (esquerda) e Duarte Nuno em Canhestros, a 31 de agosto de 2019, colaborando na recolha de uma rede (direita). 150
Figura 92. Sebastião Miguel, Maminho e Gonçalo Lopes (à esquerda em cima) e Sebastião Miguel, Maminho, Ricardo Neto e dois alunos e maninho em Évora, a 4 de outubro de 2019 (esquerda), e João Grosso, em Serpa a 2 de outubro (direita). 150
Figura 93. Grupo de participantes em Serpa no dia 2 de outubro de 2019 (esquerda), e Pedro Melo, Médico Veterinário da DGAV em Santa Clara do Louredo no dia 29 de outubro de 2019 (direita). 151
Figura 94. Á esquerda- Batedores alinhados e preparados para a enxota na Herdade do Brunhal a 26 de outubro de 2019. À direita-pegada de lebre revela presença de exemplares durante o 8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Elvas, a 19 de outubro de 2019. 152
Figura 95. Vista aérea das instalações para a detenção em cativeiro dos exemplares de lebre-ibérica 152
Figura 96. Imagem diurna captada durante o dia num dos parques da Quinta do Infesto (setembro de 2020). 153
Figura 97. Imagem noturna, captada durante a noite num dos parques da Quinta do Infesto (setembro de 2020). 153
Figura 98. Distribuição por sexo das lebres que morreram na Quinta do Infesto 154
Figura 99. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de lebre-ibérica provenientes de explorações de produção centro de reprodução do OE6, MG6, e respetiva percentagem de positividade na amostra. 161
Figura 100. Lebre com infeção muito grave por Cysticercus pisiformis (Forma larvar da Taenia pisiformis). O parênquima hepático encontra-se destruído pela forma parasitária. 162
Figura 101. Planta técnica da Unidade Laboratórial Móvel. 164
Figura 102. À esquerda, Pedro Melo (Médico Veterinário da DGAV) e Sebastião Miguel (Gestor responsável pela manutenção dos animais e apoio às ações médicas) medindo a temperatura retal de uma lebre. À direita, Fábio Abade dos Santos recolhendo sangue por punção da veia jugular externa a uma lebre. 165
Figura. 103. Vista aérea da Folha do carril, junto à margem direita da fotografia. 175
Figura. 104. Planta sem divisões. Escala 1:3000. 176
Figura 105. Vista do interior do Cercado construído pela ANPC na Companhia Das Lezírias. 177
Figura 106. Características das unidades de comedouro/bebedouro instaladas pela ANPC no cercado da Companhia das Lezírias. 178

Figura 107. Características do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias. 179
Figura 108. Vala para enterramento rede e enrocamento no cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias. 179
Figura 109. Aspeto geral do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias (comedouros/bebedouros, moroiços, cercas temporárias e área de alimentação). 179
Figura 110. Portão de acesso ao Cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias. 180
Figura 111. Vista geral do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias. 180
Figura 112. Cerca elétrica para proteção contra predadores e monotorização do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias. 181
Figura 113. Ação de captura de coelho-bravo conduzida pela equipa do projeto para a criação do núcleo fundador do cercado de reprodução construído na Companhia das Lezírias. 187
Figura 114. Estrutura de retenção e quarentena para coelho-bravo, desenvolvida pela ANPC. 188
Figura 115. Colocação de exemplares capturados na estrutura de quarentena construída na Companhia das Lezírias. 188
Figura 116. Género e classes etárias na amostragem de cadáveres de coelho-bravo coletados em explorações de produção cinegética. 203
Figura 117. Percentagem de positividade a RHDV2 e a mixomatose na amostragem de coelhos-bravos oriundos das explorações de produção cinegética. 203
Figura 118. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de coelhos-bravos provenientes de explorações de produção cinegética e respetiva percentagem de positividade na amostra. A percentagem de negativos também está indicada. 208
Figura 119. Heat maps relativos à deteção de RHDV2 em coelhos-bravos caçados nas EV 18/19 e 19/20 (esquerda) e cadáveres entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 (direita, neste mapa estão incluídos 10 animais encontrados em 2016). 212
Figura 120. Heat maps relativos à deteção do vírus da mixomatose coelhos-bravos caçados nas EV 18/19 (esquerda) e 19/20 (direita). 214
Figura 121. Heat maps relativos à deteção do vírus da mixomatose coelhos-bravos encontrados mortos entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. Neste mapa estão incluídos 10 animais encontrados em 2016. 215
Figura 122. Heat maps relativos à deteção do vírus da mixomatose em lebres caçados nas EV 18/19 (esquerda); Não houve positividade a mixomatose em lebres caçadas na EV 19/20. 216
Figura 123. Heat maps relativos à deteção do vírus da mixomatose em lebres encontradas mortas entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. 217
Figura 124. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos caçados e resultados da pesquisa de MYXV 218
Figura 125. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos encontrados mortos e resultados da pesquisa de MYXV. 219
Figura 126. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos caçados e resultados da pesquisa de RHDV2. 220
Figura 127. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos encontrados mortos e resultados da pesquisa de RHDV2 221
Figura 128. Distribuição temporal da amostragem de lebres-ibéricas encontradas mortas e resultados da pesquisa de MYXV. 222

Lista de Tabelas

Tabela 1. Painel de agentes infeciosos pesquisados nos materiais biológicos de coelho-bravo e de lebre-ibérica. 9
Tabela 2. Análises laboratoriais realizadas nas amostras de leporídeos silvestres (coelho-bravo e lebre-ibérica) recebidas, por vigilância ativa e passiva, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. 27
Tabela 3. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em coelho-bravo caçado nas épocas venatórias 2018-2019 e 2019-2020, e respetiva percentagem de positividade amostral. 29
Tabela 4. Distritos onde foi detetado RHDV2 em cadáveres de coelho-bravo encontrados mortos no campo e respetiva percentagem de positividade amostral. 33
Tabela 5. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo e respetiva percentagem de positividade na amostra. 37
Tabela 6. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em cadáveres de lebre-ibérica encontrados no campo e respetiva percentagem de positividade na amostra. 41
Tabela 7. Tabela 6. Percentagem de positividade a RHDV2 e ao vírus da mixomatose, no total da amostragem recolhida (vigilância ativa e ativa e passiva) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito. 45
Tabela 8. Condição corporal dos cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 51
Tabela 9. Condição corporal dos cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose. 51
Tabela 10. Traumatismos observados nos cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 52
Tabela 11. Traumatismos observados nos cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose. 52
Tabela 12. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 53
Tabela 13. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose. 53
Tabela 14. Número de **coelhos-bravos** em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 54
Tabela 15. Número de **lebres-ibéricas**, em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a mixomatose. 54
Tabela 16. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e mixomatose. 55
Tabela 17. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose. 55
Tabela 18. Número de **coelhos-bravos** em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados na necrópsia e sua relação com a positividade a mixomatose e a RHDV2. 56
Tabela 19. Número de **lebres-ibéricas** em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados na necrópsia e sua relação com a positividade a mixomatose e a RHDV2. 56
Tabela 20. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 57
Tabela 21. Lesões hepáticas e esplénicas observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose. 57
Tabela 22. Número de coelhos-bravos em que se observaram edemas e espessamentos nodulares e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 58

Tabela 23. Número de lebre-ibéricas em que se observaram edemas e espessamentos nodulares e relação destas lesões com a positividade a mixomatose. 58
Tabela 24. Número de coelhos-bravos em que se observaram lesões externas, incluindo lesões de pele, e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 59
Tabela 25. Número de lebres-ibéricas em que se observaram lesões externas, incluindo lesões de pele, e relação destas lesões com a positividade a mixomatose. 59
Tabela 26. Número de coelhos-bravos em que se observaram outras lesões/alterações e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 60
Tabela 27. Número de lebres-ibéricas em que se observaram outras lesões/alterações e relação destas lesões com a positividade a mixomatose. 60
Tabela 28. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de leporídeos silvestres e respetiva percentagem de positividade na amostra. 63
Tabela 29. Total de animais necropsiados e nos quais foram efetuadas análises parasitológicas. 67
Tabela 30. Nemátodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral. 68
Tabela 31. Perfil de parasitismo misto por nemátodes em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos. 68
Tabela 32. Céstodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral. 69
Tabela 33. Perfil de parasitismo misto por céstodes em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos. 69
Tabela 34. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral. 70
Tabela 35. Perfil de parasitismo misto por espécies de coccídeas em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos. 70
Tabela 36. Zonas de Caça onde se realizou a monitorização das populações naturais de coelho-bravo. 77
Tabela 37. Monitorizações realizadas em cada zona de caça por mês desde o inicio do projeto +Coelho. Dist – Monitorização por contagem de animais por distâncias (cinza escuro); Exec – Monitorização por contagem de excrementos em pontos fixos (cinza claro). 84
Tabela 38. Monitorizações realizadas, pela nova metodologia adotada, em cada zona de caça por mês pelo método de monitorização por contagem de animais por distâncias realizadas na época de mínimo populacional e na época de máximo populacional para coelho e lebre. 85
Tabela 39. Tabela comparativa do esforço requerido por cada método de monitorização. 85
Tabela 40. Valores mínimos e máximos de densidade populacional (coelho/ha), média ± desvio padrão registados em cada uma das áreas em, ao nível dos núcleos populacional (densidade estimada pela contagem em pontos fixos) e ao nível da meta-população da área de estudo (estimada pela contagem direta de indivíduos) 86
Tabela 41. Valores de densidade populacional média ± erro médio, estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo PNF.Tabela 24 - Valores de densidade populacional média ± erro médio, estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo PNF. 89
Tabela 42. Valores de densidade populacional média ± erro médio estimado para cada mês através da metodologia de contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo BNV. 92
Tabela 43. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MTN. 95

Tabela 44. Valores de IQA em fevereiro de 2020 e em julho de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total para lebre-ibérica, na área de estudo MTN. 96
Tabela 45. Valores de densidade populacional média ± erro médio estimado para cada mês através da metodologia de contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo EST. 98
Tabela 46. Valores brutos de contagem de lebres em fevereiro de 2020 e em julho de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total do número de animais contabilizados em cada réplica, para a área de estudo EST. 99
Tabela 47. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo FAL. 101
Tabela 48. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo SRP. 104
Tabela 49. Tabela 34 - Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MRT 107
Tabela 50. Valores brutos de contagem de lebres em março de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total do número de animais contabilizados em cada réplica, para a área de estudo MRT. 108
Tabela 51. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo ALC 110
Tabela 52. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo TVR. 113
Tabela 53. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MRT2. 115
Tabela 54. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MTN2. 117
Tabela 55. Amostras de Coelho-bravo e de Lebre-ibérica com análise serológica para a RHDV2, para cada área de estudo, com indicação de números absolutos de amostras com teste positivo e negativo para pesquisa de anticorpos, e respetiva percentagem. 118
Tabela 56. Lista das amostras biológicas recolhidas de cada coelho bravo capturado. Para cada coelho, apenas é efetuada uma recolha de amostras por campanha de captura, independentemente do número de capturas desse indivíduo. A biópsia de orelha é recolhida apenas na primeira captura. 122
Tabela 57. Resumo das campanhas de captura efetuadas em 2020 na Companhia das Lezírias. 123
Tabela 58. Resumo das campanhas de captura efetuadas em 2020 na Herdade da Coitadinha. 123
Tabela 59. Resumo dos resultados de excreção parasitária dos coelhos capturados na Companhia das Lezírias. 126
Tabela 60. Seroprevalência de Mixomatose e Doença hemorrágica viral nos coelhos capturados na Companhia das Lezírias. 126
Tabela 61. Resumo dos resultados de excreção parasitária dos coelhos capturados na Herdade da Coitadinha. 126
Tabela 62. Seroprevalência de Mixomatose e Doença hemorrágica viral nos coelhos capturados na Herdade da Coitadinha. 127

Tabela 63. Condição corporal dos cadáveres de lebre-ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 155
Tabela 64. Traumatismos observados em dois cadáveres de lebre-ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose. 156
Tabela 65. Número de lebres-ibéricas s do centro de reprodução do OE6, MG6 em que se observaram hemorragias internas e relação deste sinal clínico com a positividade a mixomatose. 157
Tabela 66. Lesões pulmonares observadas nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 no exame anatomopatológico e sua relação com a positividade ao vírus da mixomatose. 157
Tabela 67. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose. 158
Tabela 68. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose. 158
Tabela 69. Alterações externas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose. 159
Tabela 70. Outras lesões observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose. 160
Tabela 71. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de lebre ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6, e respetiva percentagem de positividade na amostra. 161
Tabela 72. Céstodes identificados nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e respetivos valores de percentagem de positividade amostral. 162
Tabela 73. Nemátodes identificados nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes de explorações de produção centro de reprodução do OE6, MG6 e respetivos valores de percentagem de positividade amostral. 162
Tabela 74. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral. 163
Tabela 75. Caracteristicas dos Cercados de Reprodução previstos para as 3 OSCs 174
Tabela 76. Critérios definidos para a classificação genética dos indivíduos com base nas análises estatísticas realizadas [(i) índice de hibridação doméstico (HI_DOM), (ii) índice de hibridação O. c. cuniculus (HI_CUN), (iii) análise Bayesiana e (iv) análise filogeográfica] e valores de referência obtidos para as populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica. 183
Tabela 77. Tabela 2: Classificação genética dos indivíduos analisados. 183
Tabela 78. Condição corporal dos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose 204
Tabela 79. Número de coelhos-bravos provenientes de explorações de produção cinegética em que se observaram alterações intestinais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 204
Tabela 80. Número de animais provenientes de explorações de produção cinegética em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 205
Tabela 81. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres provenientes de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e mixomatose. 205

Tabela 82. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres provenientes de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 206
Tabela 83. Número de animais oriundos de explorações de produção cinegética em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados à necrópsia e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 206
Tabela 84. Outras lesões observadas nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose. 207
Tabela 85. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetiva percentagem de positividade amostral. 207
Tabela 86. Céstodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral. 208
Tabela 87. Nemátodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral. 209
Tabela 88. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade 209
Tabela 89. Indicadores de Realização do Projecto +Coelho2, no final do Projecto 229
Tabela 90. Indicadores de Resultados do Projeto "+Coelho 2". 229
Tabela 91. Quadro referente ao **OE1: "**Amostrar as populações de leporídeos caçados em zonas de caça selecionadas nas épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020 e as populações de leporídeos que evidenciem morbilidade ou mortalidade em todo o território nacional e no período a que se refere este relatório (01.11.2018 a 30.06.2020) e efetuar as análises laboratoriais necessárias ao conhecimento do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica" e "Investigação do estado hígio-sanitário das populações de coelho-bravo e lebre" 231
Tabela 92. Quadro relativo ao **OE2: "**Determinar as abundâncias de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica em zonas de caça selecionadas." 233
Tabela 93. Quadro relativo ao **OE3.: "**Caraterizar a demografia do coelho-bravo e da lebre-ibérica e a epidemiologia dos agentes patogénicos mais relevantes que afetam estas espécies em diferentes biótopos, para ajustar adequadamente as futuras medidas de intervenção a diferentes cenários." 234
Tabela 94. Quadro relativo ao **OE4**: "Aumentar a consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos, através do desenvolvimento de ações de educação e sensibilização sobre o estatuto frágil da subespécie O. c. algirus e da espécie Lepus granatensis, a importância da conservação dos recursos genéticos autóctones e a importância de se limitar a circulação de agentes patogénicos através da adoção de boas práticas no campo". 235
Tabela 95. Quadro relativo ao **OE5: "**Assegurar a melhoria da condição corporal dos leporídeos caçados após suplementação de alimento composto administrado em comedouro para coelho-bravo desenvolvido pelo projeto (e registo de patente)". 235
Tabela 96. Quadro relativo ao **OE6:** "Averiguar se as vacinas comerciais contra a mixomatose induzem a produção de anticorpos protetores em lebre-ibérica, tendo em vista a sua utilização no futuro, caso a espécie venha a ser considerada criticamente ameaçada". 236
Tabela 97. Quadro relativo ao **OE7:** "Conferir imunidade às populações naturais de coelho-bravo contra as estirpes de RHDV2 em circulação, através do desenvolvimento de uma vacina oral, que implica a caraterização genética das estirpes circulantes para modelação da vacina"... 237
Tabela 98. Quadro relativo ao **OE8**..... 238
Tabela 99. Quadro relativo ao **OE9: "**Património genético, criação de cercados e infraestruturas complementares (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém (Pólo do INIAV) e de 3 cercados de reprodução modelo em zonas de caça". 240

Tabela 100. Quadro relativo ao **OE.10: "**Promover ações de translocação com animais imunizados pelo contato natural com RHDV2."..... 241
Tabela 101. Quadro relativo ao OE.11: "Divulgar e publicar as atividades técnico-científicas desenvolvidas e os resultados científicos obtidos no âmbito do Projecto +Coelho2 para diferentes públicos e promover ações de demonstração." 242

1. Organização do Relatório

O Relatório de Atividades de execução do Projeto **"+Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal",** reúne informação sobre as atividades desenvolvidas pela equipa do projeto entre 1 de novembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

As atividades desenvolvidas, maioritariamente incidentes nas épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020, são descritas de acordo com os 11 objetivos específicos (OE) definidos na Memória Descritiva do processo de candidatura do projeto +Coelho 2 ao Fundo Florestal Permanente (FFP), explicitados mais à frente.

As onze secções, correspondentes a cada um dos objetivos específicos, são precedidas pela descrição dos **Objetivos do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos**, homologado pelo Senhor MAFDR em setembro de 2017, recordando-se os quatro eixos de ação, objetivos gerais, objetivos específicos e medidas específicas do Plano, bem como de uma **Introdução** sobre aspetos relevantes do coelho-bravo e da lebre-ibérica, e das doenças que presentemente mais os afetam.
Segue-se a **Súmula dos Resultados, Conclusões,** e **Perspetivas Futuras**.

Os **Indicadores de realização** são apresentados face ao previsto na Candidatura N.º 2019014300001 e respetiva Memória Descritiva.

No final do documento, são incluídos vários anexos com o seguinte conteúdo:
Anexo I- Ficha de Identificação da Amostras Revista:
Anexo II- Tabelas Anexas;
Anexo III- Protocolo de Monitorização das Populações Naturais de Coelho-bravo e Lebre
Ficha de Contagem Direta de Animais por Distância – Reformulada;
Anexo IV- A - Relatório do Ensaio de Palatibilidade com a Ração +Coelho;
Anexo IV-B - Relatório dos Dados Parasitológicos obtidos no âmbito do Projeto +Coelho;
Anexo IV-C- Relatório dos exames coprológicos pré-desparasitação realizados em três Zonas de Caça aderentes ao Projeto +Coelho;
Anexo IV-D- Protocolo de Recolha de Fezes para Exame Parasitológico;
Anexo IV-E- Ficha de Identificação da Amostra de Fezes para Exame Parasitológico;
Anexo IV-E- Ficha de Registo de Colheitas por Zona de Caça;
Anexo V-A- Dossier Técnico;
Anexo V-B- Credencial para Captura de Lebre-ibérica;
Anexo V-C- Caderno de Encargos;
Anexo V-D- Credenciais de Detenção
Anexo VI-A- Credencial de Autorização para a Captura de exemplares de Coelho-bravo
Anexo VI-B- Ofício de Autorização de Captura de Coelhos-bravos
Anexo VI-C- Relatório da Caracterização Genética e Deteção de Hibridação em Coelho-bravo
Anexo VI-D- Relatório dos Resultados da Avaliação Sorológica a RHDV2;
Anexo VI-E- Ficha de Captura;

Anexo VII-A- Notícias de Divulgação
Anexo VII-B- Divulgação em Revistas de Circulação Nacional para Público Especializado;
Anexo VII-C- Divulgação em Revistas de Circulação Nacional para Público Não Especializado;
Anexo VII-D- Comunicações Orais e em Póster em Congressos Científicos;
Anexo VII-E- Divulgação em Revistas de Internacionais com Arbitragem Cientifica;
Anexo VII-F- Capítulo no livro "Lagomorpha characteristics": "The Health and Future of the Six Hare Species in Europe: A Closer Look at the Iberian Hare";
Anexo VII-G- Manual de Boas Práticas de Gestão (Versão de Trabalho);
Anexo VII-H- *Flyers*
Anexo VII-I- Alertas e Recomendações;

2. Objetivos do Plano de Ação e do Projeto "+Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal

Na sequência do Despacho N.º 4757/2017 de 31 de maio do Ministro da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR), foi criado um Grupo de Trabalho (GT) com o objetivo de delinear uma nova estratégia conceptual e operacional, de índole prática, de monitorização e vigilância de RHDV2 que permitisse a curto prazo conhecer o atual estado ecossanitário das populações naturais de coelho-bravo no território nacional e mapear o risco epidemiológico da DHV e propor um conjunto de medidas para alavancar e acelerar a sua recuperação.

Esta equipa multidisciplinar, que inclui entidades públicas e privadas, em estreita articulação com as três Organizações do Setor da Caça (OSC) de primeiro nível, delineou um Plano de Ação onde foram definidas estratégias de investigação e ações prioritárias específicas, de caráter profilático e sanitário, com o objetivo de inverter o processo de declínio continuado das populações de coelho-bravo, muito agravado pela emergência em 2010 de um novo vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2), e mais tarde, em 2018, de um vírus recombinante da mixomatose, e de repor o equilíbrio ecológico desejável. O Plano foi delineado com base numa avaliação integrada das várias dimensões que potencialmente afetam as populações naturais de coelho, de modo a permitir a consolidação do conhecimento sobre a DHV e outros agentes patogénicos e a transferência de conhecimento para operacionalização no terreno das necessárias medidas de intervenção.

Embora o Plano de Ação tenha sido delineado para o território de Portugal continental, algumas ações desenvolvidas no âmbito do primeiro ano de execução do Projeto +Coelho decorreram em áreas piloto, localizadas em áreas de regime cinegético ordenado, para, numa fase posterior, serem alargadas a outras áreas do território nacional continental. Previu-se também a possibilidade de o Plano ser alargado às regiões autónomas da Madeira e dos Açores. Foi também prevista a monitorização e avaliação da execução do Plano, numa base anual, para uma análise de desvios e (re)ajustamento das ações aos objetivos definidos ou, mesmo, a eventuais novos objetivos estabelecidos em função da evolução da situação demográfica e epidemiológica das populações de leporídeos.

Eixos de Intervenção do Plano de Ação e Princípios Orientadores

As atividades propostas pelo Plano de Ação foram integradas nos **eixos de intervenção:** ***I) Programa de investigação***; ***II) Boas práticas de gestão*** e ***III) Medidas de controlo sanitário***, tendo sido definido ***IV) um plano de comunicação*** transversal aos três eixos, de modo a manter permanentemente informados todos os agentes e tomadores de conhecimento implicados na recuperação da espécie coelho-bravo, bem como a sociedade-civil, procurando envolver todos os atores nos esforços para a recuperação desta espécie.

Foram definidos como **princípios orientadores**:
- A utilização da informação científica mais adequada e atualizada disponível sobre a biologia, ecologia e dinâmica populacional do coelho-bravo, bem como sobre a RHDV e RHDV2, enquanto fatores determinantes para a conservação e gestão da espécie;
- Uma atuação de forma preventiva e proactiva relativamente a alterações do habitat do coelho-bravo;
- O reconhecimento dos proprietários, produtores, caçadores, gestores e as organizações que os representam, os demais utilizadores do território, bem como a sociedade-civil em geral, como agentes fundamentais e condicionantes da execução do projeto;
- O estabelecimento de parcerias entre os organismos da administração do Estado, academia, organizações do sector da caça e outras entidades com ação relevante na problemática do coelho-bravo, como um instrumento prioritário de ação;
- A informação permanente de todos os agentes e tomadores de conhecimento implicados na recuperação da espécie coelho-bravo, bem como a sociedade-civil, procurando envolver todos os atores nos esforços para a sua recuperação.

O Plano de Ação delineado está organizado em medidas a desenvolver a curto (até 1 ano), médio (1-3 anos) e longo prazo (mais de 3 anos), em articulação com outras ações já em curso.

Para desenvolvimento e operacionalização das medidas previstas a curto prazo no Plano, muitas delas necessárias para preparar e alavancar as medidas de médio e longo prazo, submeteu-se a candidatura ao Fundo Florestal Permanente o projeto "+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" (01.08.2017 a 31.10.2018) e o projeto "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal" (01.11.2018 a 30.06.2020). Estes projetos constituem, pois, um instrumento de operacionalização do Plano de Ação Para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos e para a recuperação das populações naturais de coelho-bravo.

Objetivos gerais (OG) do Projeto +Coelho 2

Estabeleceram-se como **objetivos gerais**:
OG.1 Alavancar a recuperação de populações de coelho-bravo através da criação de cercados de reprodução modelo, tendo em vista o estabelecimento de uma rede nacional de preservação e reprodução de leporídeos;
OG.2 Alavancar a recuperação de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica através do desenvolvimento de uma vacina oral, no caso do coelho, e de estudos de avaliação de eficácia de vacinas comerciais, no caso da lebre;
OG.3 Alavancar a recuperação do coelho-bravo e da lebre-ibérica através do desenvolvimento de medidas práticas nas zonas de caça que favoreçam a proliferação das populações naturais destas espécies e o sucesso de ações de translocação;
OG.4 Conhecer o estado ecossanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica;
OG.5 Monitorizar a incidência de RHDV2 e de mixomatose em leporídeos e identificar a mortalidade associada a estas infeções;
OG.6 Aumentar a consciência social sobre a importância das boas práticas de gestão dos territórios e sobre o papel que o caçador pode exercer na proteção da biodiversidade e conservação da fauna

selvagem, reforçando a comunicação e a disseminação do conhecimento técnico-científico gerado para os proprietários, produtores, caçadores, gestores e demais utilizadores do território.

Medidas Gerais (MG) e objetivos específicos (OE) do Projeto +Coelho 2

As medidas gerais propostas para o controlo do vírus RHDV2 e recuperação das populações naturais de coelho-bravo incluíram:
MG.1. Continuação da avaliação sanitária das populações de leporídeos (coelho-bravo e lebre-ibérica) do território nacional para monitorizar o seu estado sanitário na época venatória 2018/2019;
MG.2. Continuação das avaliações demográficas das populações de leporídeos;
MG.3. Implementação e operacionalização da plataforma para a recolha de dados demográficos e epidemiológicos da população de coelho-bravo e integração com as condições edafoclimáticas, de habitat, densidades de predadores, disponibilidade de alimento, gestão cinegética e presença de vetores;
MG.4. Informação e sensibilização dos atores do setor sobre a importância da certificação genética e sanitária dos animais nas ações de repovoamento;
MG.5. Melhoria da condição corporal das populações selvagens de coelho-bravo e lebre-ibérica através da disponibilização de alimento composto não-medicamentoso e medicamentoso;
MG.6. Avaliação da eficácia de vacinas comerciais desenvolvidas para o controlo da mixomatose em coelho doméstico na indução de anticorpos protetores em lebre-ibérica;
MG.7. Desenvolvimento da vacina oral para RHDV2;
MG.8. Desenvolvimento de metodologias para avaliação do impacto da predação na recuperação do coelho-bravo e o efeito de medidas de controlo de predadores;
MG.9. Preservação do património genético, criação de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém e estabelecimento de uma rede piloto de cercados de reprodução modelo para a criação de coelho-bravo em zonas de caça das 3 OSC de 1º nível;
MG.10. Identificação de populações de animais com títulos elevados de anticorpos para constituição de núcleos fundadores de cercados de reprodução e para introdução no campo, em ações de translocação;
MG.11. Comunicação, divulgação, demonstração e transferência de conhecimento.

Para cada uma das MG acimas definidas foram identificados um ou mais **objetivos específicos** (OE), que a seguir se elencam:
OE.1. Amostrar as populações de leporídeos caçadas em zonas de caça selecionadas e as populações de leporídeos que evidenciem morbilidade ou mortalidade em todo o território nacional e efetuar as análises laboratoriais necessárias ao conhecimento do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica na época venatória 2018/2019 e 2019/2020;
OE.2. Determinar as abundâncias de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica em zonas de caça selecionadas;
OE.3. Caraterizar a demografia do coelho-bravo e da lebre-ibérica e a epidemiologia dos agentes patogénicos mais relevantes que afetam estas espécies em diferentes biótopos, para ajustar adequadamente as futuras medidas de intervenção a diferentes cenários;
OE.4. Aumentar a consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos através do desenvolvimento de ações de educação e sensibilização sobre o estatuto frágil da

subespécie *O. c. algirus* e da espécie *Lepus granatensis*, a importância da conservação dos recursos genéticos autóctones e a importância de se limitar a circulação de agentes patogénicos através da adoção de boas práticas no campo;

OE.5. Assegurar a melhoria da condição corporal dos leporídeos caçados após suplementação de alimento composto; desenvolvimento de comedouro para coelho-bravo e registo de patente.

OE6. Esclarecer se as vacinas comerciais contra mixomatose induzem a produção de anticorpos protetores em lebre-ibérica, tendo em vista a sua utilização no futuro, caso a espécie venha a ser considerada ameaçada;

OE7. Conferir imunidade às populações naturais de coelho-bravo contra as estirpes de RHDV2 em circulação, através do desenvolvimento de uma vacina oral, o que também implica a caraterização genética das estirpes circulantes para modelação da vacina;

OE8. Alavancar a recuperação do coelho-bravo através do desenvolvimento de medidas práticas de gestão nas zonas de caça que favoreçam a proliferação das populações naturais e assegurem o sucesso de ações de translocação;

OE9. Certificacão genética e criação de cercados e infra-estruturas complementares (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém (Pólo do INIAV) e de 3 cercados de reprodução em zonas de caça (1 por OSC);

OE10. Estabelecer rede de cercados de reprodução com animais com elevados níveis de anticorpos. Promover translocações com animais imunizados pelo contacto natural com RHDV2;

OE11. Divulgar e publicar as atividades técnico-científicas desenvolvidas e os resultados científicos obtidos no âmbito do Projecto +Coelho2 para diferentes públicos e promover ações de demonstração.

As atividades desenvolvidas no âmbito de cada objetivo específico acima referido, encontram-se organizadas por secções, incluindo-se uma breve descrição das metodologias utilizadas e os respetivos resultados. Para agilizar o fluxo de informação, as tabelas que compilam os dados relativos a cada um dos objetivos específicos são, maioritariamente, apresentadas em anexo;

3. Amostrar as populações de leporídeos caçados em zonas de caça selecionadas nas épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020 e as populações de leporídeos que evidenciem morbilidade ou mortalidade em todo o território nacional e no período a que se refere este relatório (01.11.2018 a 30.06.2020) e efetuar as análises laboratoriais necessárias ao conhecimento do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica (OE1)

Objetivo operacional 1: Assegurar o adequado diagnóstico laboratorial com vista à determinação da causa de mortalidade em coelho-bravo e lebre no ano a que se refere o Projeto +Coelho 2
Atividade 1: Redefinir o painel de agentes infeciosos a testar em função dos resultados do ano anterior
Atividade 2: Intensificar a amostragem de lebre-ibérica no território nacional
Atividade 3: Atualizar os protocolos de recolha de amostras e ficha de registo, quando necessário
Objetivo operacional 2: Garantir a funcionalidade de uma rede de recolha e armazenamento de amostras e a entrega destas no Laboratório de Referência de Saúde Animal do INIAV.
Atividade 1: Manter a funcionalidade da rede nacional de recolha de amostras envolvendo os parceiros
Atividade 2: Rever as zonas de caça a amostrar no 2º ano de projeto, em função da dificuldade de amostragem e determinação de valores máximos e mínimos de amostragem de coelhos-bravos por zona de caça por forma a otimizar a razão esforço/beneficio
Atividade 3: Fornecer kits para colheitas e preservação das amostras;
Atividade 4: Garantir a funcionalidade de armazenamento de amostras biológicas em frio;
Atividade 5: Garantir as condições para a criação de um banco de amostras;
Atividade 6: Garantir as condições necessárias para a execução das análises laboratoriais;
Objetivo operacional 3: Assegurar a recolha de amostras no campo pelas OSC
Atividade 1: Garantir a vigilância ativa e passiva dos vírus da DHV e da mixomatose na amostragem considerada: colheita de material em animais caçados e em cadáveres encontrados no campo|diagnóstico laboratorial;
Atividade 2: Efetuar ações de atualização (Formação ou disponibilização de informação escrita) sobre o processo de colheita de material aos técnicos das Organizações do Setor da Caça;
Objetivo operacional 4: Assegurar a execução de diagnóstico diferencial quando solicitado pelos dados da necrópsia
Atividade 1: Efetuar o exame anatomopatológico em cadáveres em bom estado de preservação;
Atividade 2: Efetuar os exames bacteriológicos;
Atividade 3: Efetuar os exames parasitológicos;
Atividade 4: Efetuar outros exames considerados relevantes;
Objetivo operacional 5: Assegurar os recursos humanos e materiais para a sequenciação de fragmentos genómicos virais, para esclarecimento dos resultados laboratoriais
Atividade 1: Sequenciar o gene da cápside sempre que necessário para o correto diagnóstico. Sequenciar alguns genomas completos para perceber que recombinantes continuam a circular;
Objetivo operacional 6: Assegurar o rastreio serológico das populações de coelho-bravo para a presença de anticorpos para o RHDV2
Atividade 1: Garantir os recursos para executar os testes serológicos para deteção de anticorpos RHDV2

Foram amostradas áreas do território nacional continental onde se verificou morbilidade e/ou mortalidade de coelho-bravo e/ou de lebre através de uma rede de recolha de âmbito continental, implementada no decurso do Projeto +Coelho 1, e que assegurou a receção, o congelamento e o envio do material biológico para os Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal sediados no INIAV, onde todas as análises laboratoriais foram realizadas. Foram também amostrados ativamente animais caçados no conjunto de 27 e 24 zonas de caça selecionadas nas épocas venatórias (EV) 18/19 e 19/20, respetivamente (**Figura 1**).

A **rede nacional de epidemiovigilância** articula os parceiros do projeto +Coelho, e permite a recolha sistemática e adequada de material biológico e o seu transporte para laboratórios no INIAV I.P.. Esta rede envolve a utilização de instalações e equipamentos, o recurso a serviços de transporte de materiais biológicos e a alocação de recursos humanos à gestão das amostras e à prestação de serviços laboratoriais para investigação de agentes patogénicos.

De acordo com o estipulado pelo Grupo de Trabalho, e no sentido de ajustar a amostragem face à analise efetuada durante o Projeto +Coelho 1, foram estabelecidos os limites máximo e mínimo da amostragem em cada área de estudo (30 amostras por zona de caça) e redefinidas as ZC a amostrar por vigilância ativa em função dos resultados do ano anterior.

Foi confirmada a funcionalidade da rede nacional de recolha de amostras. Para além dos Pólos do INIAV I.P. (Oeiras, Vairão, Évora e Coruche), as associações de caçadores e de proprietários rurais assumiram um papel fundamental para a eficácia desta rede. Foi ainda confirmada a operacionalidade do equipamento e locais de armazenagem em frio (arcas frigorificas e funcionários responsáveis) nos pontos de recolha e da logística de transporte refrigerado entre os pontos de recolha e as instalações do INIAV.

Foi ainda confirmada a existência de condições para armazenagem de um banco de tecidos, soros e ácidos nucleicos (armazenamento -80ºC) no Biobanco do INIAV, uma vez que não foi adquirida nenhuma arca -80ºC nos projetos +Coelho 1 e +Coelho 2.

À semelhança do que aconteceu no Projecto +Coelho 1, também no decurso do Projeto +Coelho 2 o painel de agentes infeciosos pesquisados foi ajustado mediante observação do quadro lesional na necrópsia incluindo o exame histopatológico, bacteriológico (ex. pesquisa de *Pasteurella spp*., *Francisella spp*.), virológico (ex. LRV) e/ou parasitológico (ecto- e endoparasitas).
Foi necessário reforçar a vigilância sanitária no que toca ao vírus da mixomatose em populações de lebre-ibérica face à emergência de um novo vírus em 2018, altamente patogénico para esta espécie, que passou a afetar fortemente as populações em Espanha e em Portugal.

A metodologia adotada para a vigilância passiva e ativa da DHV e mixomatose nas populações de leporídeos foi a estabelecida na Candidatura do 1º ano do Projeto +Coelho, nomeadamente:

- Vigilância passiva

  a) Receção do material no INIAV IP (cadáveres encontrados mortos em todo o território nacional);

  b) Colheita de fígado e baço para pesquisa de lagovírus (RHDV2, RHDV, EBHSV, NP-RCV) por métodos moleculares;

  c) Colheita de mixomas e de pulmão para pesquisa do vírus da mixomatose por métodos moleculares;

  d) Exame anátomo-histopatológico; realização de outros testes de diagnóstico (virológicos/bacteriológicos/parasitológicos/micológicos), com base nas indicações resultantes da necrópsia;

  e) Análise de dados, caraterização da fenologia dos surtos e introdução dos dados em plataforma informática;

  f) Partilha dos resultados com o remetente da amostra biológica e com a DGAV.

- Vigilância ativa

g) Receção do material no INIAV IP (amostras de fígado/baço/pulmão/sangue, colhidas de animais caçados);

h) Exame virológico (RHDV2, RHDV e Vírus da Mixomatose);

i) Exame serológico para pesquisa de anticorpos contra RHDV e RHDV2;

j) Análise de dados e introdução dos mesmos em plataforma informática;

k) Partilha dos resultados com o remetente da amostra biológica e com a DGAV.

No âmbito da avaliação sanitária, foi necessário:

l) Redefinir as áreas a amostrar na vigilância ativa;

m) Atualizar o protocolo para recolha de amostras no âmbito da vigilância ativa em animais caçados, tendo em atenção a necessidade de se detetar a forma respiratória da mixomatose;

n) Assegurar a produção de kits de colheita (tubos de plástico; seringas e agulhas; lâminas de bisturi; luvas; etiquetas, sacos de plástico);

o) Garantir o reencaminhamento das amostras para o INIAV IP, onde os exames anatomo-histopatológicos, microbiológicos, serológicos e moleculares serão realizados.

p) Promover a prospeção ativa de cadáveres, nomeadamente após a deteção de algum surto, por forma a se determinarem as estirpes de campo, bem como a se proceder à remoção de animais potencialmente infetados no terreno

As atividades desenvolvidas para cumprimento do objetivo específico OE1, suas metas e produtos, indicadores de realização, entidade responsável e entidades participantes, estão listadas abaixo:

Durante o Projeto +Coelho 2, foram efetuados exames laboratoriais para um conjunto de agentes infeciosos, de etiologia viral (RHDV, RHDV2 e Mixomatose), bacteriana e parasitária (**Tabela 1**). Todos os cadáveres foram submetidos a necrópsia.

Tabela 1. Painel de agentes infeciosos pesquisados nos materiais biológicos de coelho-bravo e de lebre-ibérica.

Exames Laboratoriais	**Metodologias**	**Painel de agentes**
Anatomopatológicos	Convencionais	
Virológicos	Moleculares (PCR e RT-PCR)	RHDV2, RHDV, Vírus da Mixomatose
Bacteriológicos	Bacteriologia geral	Bactérias em aerobiose
Parasitológicos	Técnicas de flutuação, sedimentação e identificação morfológica)	Nemátodos, Céstodes Protozoários
Serológicos	ELISA	RHDV2 e RHDV

Tal como no Projecto +Coelho 1, durante o Projecto + Coelho 2 as amostras foram identificadas através do preenchimento de uma ficha de Identificação de Amostra **(Anexo I)**, disponibilizada *online* no site do INIAV.

Áreas de amostragem

Um dos objetivos específicos dos Projetos +Coelho 1 e +Coelho 2, consistiu em amostrar, em todo o território nacional continental, populações de leporídeos utilizando para o efeito animais caçados. Entre os parceiros das três Organizações do Setor Caça (OSC), foram identificadas várias dezenas de zonas de caça, distribuídas por todo o território, para realização das amostragens de leporídeos durante as épocas venatórias (EV) 2018/2019 e 2019/2020 (**Figura 1A e 1B**). Algumas das ZC amostradas durante o Projeto +Coelho 1 foram eliminadas da amostragem ou substituídas por áreas contiguas, dada a redução abrupta de coelho-bravo nessas áreas geográficas.

Zonas de caça (ZC) amostradas durante as épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020

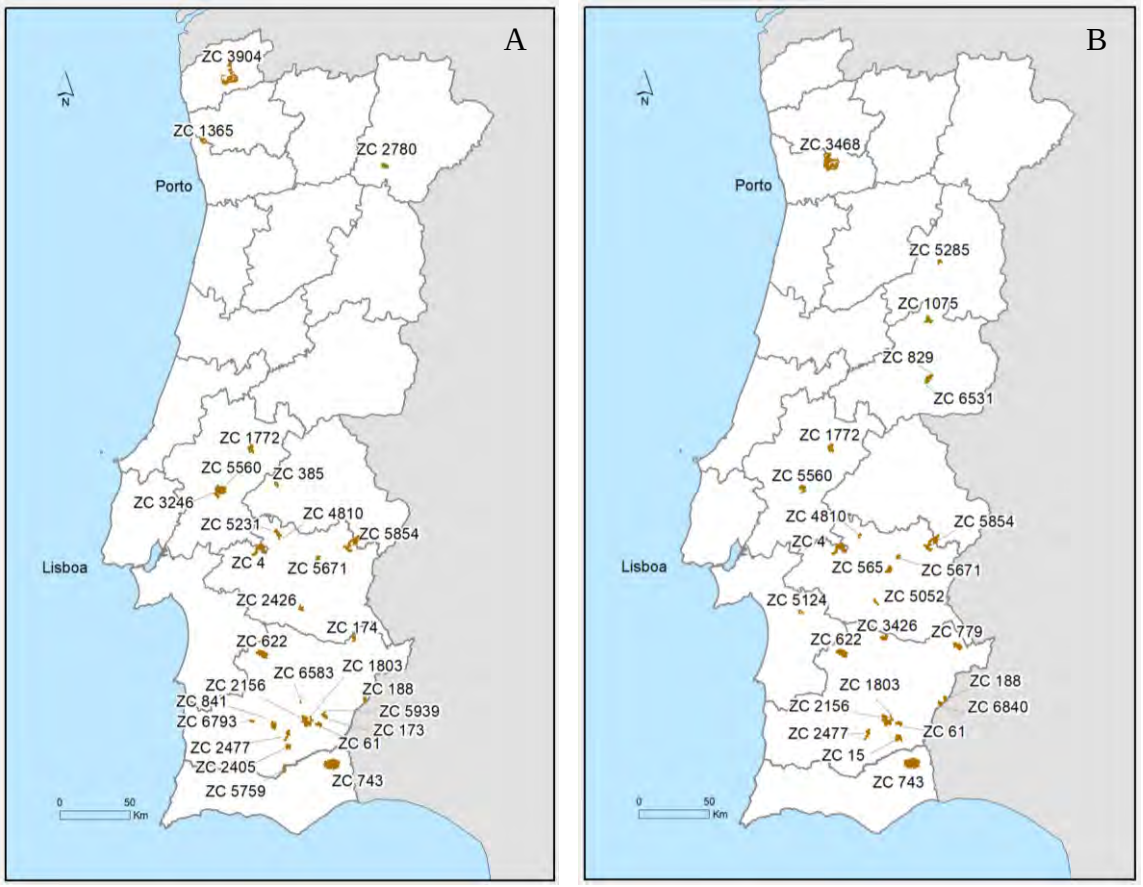


Figura 1. Zonas de caça amostradas nas EV 18/19 (**A**) e 19/20 (**B**).

Durante a EV de 2018/2019 foram amostradas **27** zonas de caça (ZC), sendo 18 turísticas (ZCT), maioritariamente localizadas na região do Alentejo, 7 associativas (ZCA), sobretudo nas regiões do Norte e Alentejo, e 2 municipais (ZCM), localizadas na região Norte e Alentejo [**Tabela 1AII (Anexo II**)].

Durante a EV de 2019/2020 foram amostradas **24** zonas de caça (ZC), sendo 14 turísticas (ZCT), maioritariamente localizadas na região do Alentejo, 8 associativas (ZCA), sobretudo nas regiões do

Alentejo e Centro, e 2 municipais (ZCM), localizadas na região Norte e Alentejo [**Tabela 2AII (Anexo II**)].

O número de ZC amostradas nas épocas venatórias 18/19 e 19/20 foi menor do que na época venatória de 17/18 (**49** ZC).

Recolha de material biológico (protocolos e Kits)

No decurso do Projeto +Coelho 2, foram utilizados os **Protocolos de Recolha de Material para Exames Virológicos e Serológicos e** os **procedimentos de recolha de cadáveres** encontrados no campo [Relatório 1, **Figura 3AI (Anexo I)**] e de **colheita de material biológico em ato venatório** [Relatório 1, **Figura 4AI (Anexo I)**], produzidos no Projeto +Coelho 1.

Foram produzidos **kits específicos para recolha** de cadáveres e para a recolha de amostras de animais caçados, e **kits para recolha de cadáveres**, por forma a providenciar aos técnicos no terreno o material necessário e adequado para a recolha e armazenamento do material biológico, salvaguardando a saúde do operador e do ambiente.

Globalmente, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 foram entregues cerca de **1000** kits para recolha de órgãos de animais caçados e cadáveres.

Capacitação dos técnicos das OSC (FENCAÇA, ANPC e CNCP) para a recolha de material

Ações de Formação

As 9 ações de formação realizadas no 1º ano do projeto, capacitaram os técnicos das três OSC que integram o GT +Coelho (FENCAÇA, ANPC e CNCP), sobre procedimentos de recolha de cadáveres encontrados no campo e de colheita de material biológico em ato venatório. Assim, durante o projeto +Coelho 2 não houve necessidade de se proceder a ações de formação adicionais.

Caracterização da amostragem recolhida entre 1 de Setembro de 2018 e 30 de junho de 2020

A **amostragem** que a seguir se caracteriza refere-se aos períodos venatórios de 2018/2019 e 2019/2020 para coelhos-bravos caçados (set. 2018 a dez. 2018, e set. 2019 a dez. 2019) e para lebres caçadas (set. 2018 a fev. 2019, e set. 2019 a fev. 2020), e ao período compreendido entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 (22 meses) para cadáveres de coelho-bravo e de lebres encontrados no campo.

A amostragem recolhida no Projeto +Coelho 2 incluiu **amostras de leporídeos silvestres**, maioritariamente de coelho-bravo (82,9%) e, em menor extensão, de lebre-ibérica (12,05%). Globalmente, durante o Projeto +Coelho 2 foram recolhidas amostras de 971 leporídeos silvestres.

Cerca de dois terços destas amostras (61,89%, n=601) compreenderam coelhos-bravos amostrados após ato venatório (animais aparentemente saudáveis), durante múltiplos eventos de caça que decorreram nas duas épocas cinegéticas referidas.

Foram também recebidos 169 cadáveres de coelho-bravo (compreendendo 17,40% da amostragem total), recolhidos por prospeção ativa no campo, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

A lebre-ibérica foi amostrada no decorrer das épocas cinegéticas de 2018/2019 e 2019/2020, estendendo-se o período venatório desta espécie de 1 de setembro a finais de fevereiro do ano seguinte. Foram recolhidas amostras de 49 lebres caçadas (compreendendo 5,05% da amostragem total) nas duas épocas venatórias, assim como de 95 cadáveres encontrados no campo (compreendendo 9,78% da amostragem total) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020**.** Foram também analisados 22 cadáveres de lebre-ibérica (representando 2,27% da amostragem total) provenientes do núcleo de reprodução implementado no âmbito do Objectivo Especifico (OE) 6 e da Medida Geral (MG) 6 (**Figura 2**)**.** [**Tabela 3AII (Anexo II**)].

No âmbito do projeto, o INIAV I.P. recebeu ainda um número significativo de cadáveres de coelho-bravo originários de algumas explorações de produção cinegética (n=35), que corresponderam globalmente a 3,60% da amostragem total de leporídeos silvestres. Pelo facto desta amostragem reportar a um contexto específico de carater artificial, e não ser por isso representativa da realidade epidemiológica da doença no campo, os seus dados foram tratados e apresentados separadamente (secção 15).

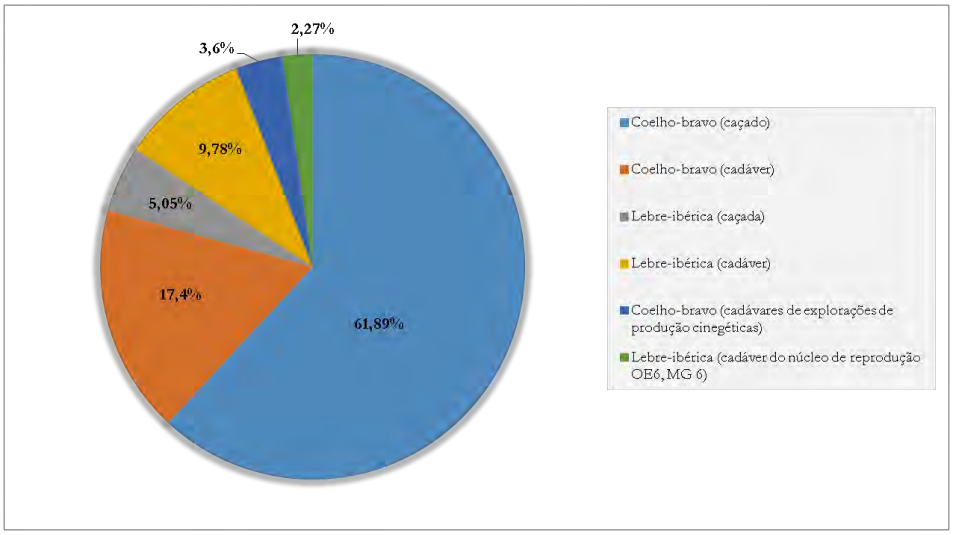


Figura 2. Percentagens relativas de leporídeos silvestres (coelho-bravo e lebre-ibérica) amostrados por categoria: cadáver e caçado.

A **caracterização** das variáveis **sexo** (Fêmea vs. Macho) e **classe etária** (Juvenil vs. Adulto) foi realizada no grupo dos **cadáveres de coelho-bravo** e de **lebre-ibérica** encontrados no campo.

Os **espécimes de coelho-bravo** encontrados mortos foram pesados durante o exame anatomopatológico realizado pelos patologistas do INIAV I.P.. O peso dos cadáveres de coelho-bravo prospetados no campo variou entre 70 e 1400 gramas. No caso dos coelhos juvenis, a amplitude de pesos registada variou entre 70 e 866 gramas. Para os juvenis sexados, a amplitude de peso variou entre 70 e 849 gramas no caso dos machos e entre 165 e 866 gramas, no caso das fêmeas. Nos adultos, o peso variou entre 630 e 1400 gramas. Para os adultos sexados, a amplitude de pesos variou entre 644 e 1307 gramas no caso dos machos, e entre 630 e 1400 gramas no caso das fêmeas. Quatro das fêmeas encontravam-se gestantes, variando o seu peso entre as 813 e 1400 gramas, enquanto uma, recém-parida, pesou 1148 gramas.

No que toca à distribuição de género no grupo dos animais caçados, verificou-se que o número de fêmeas de coelho-bravo (n=300, correspondendo a 126 na EV 18/19 e 174 na EV 19/20), foi ligeiramente superior ao de machos (n=292, correspondendo a 135 na EV 18/19 e 157 na EV19/20) para o mesmo período temporal. Não foi feito registo de género em 9 dos 601 coelhos-bravos caçados. Relativamente aos cadáveres de coelho-bravo, 47,34% (n=79) corresponderam a fêmeas e 49,11% (n=81) corresponderam a machos. Não foi feito registo de género para 9 dos 169 cadáveres recolhidos entre setembro de 2018 e junho de 2020. [**Tabela 4AII (Anexo II), Figura 3].**
Para os animais sexados, no grupo dos machos o número de animais juvenis (n=32) foi inferior ao número de animais adultos (n=49). No caso das fêmeas, o número de animais juvenis (n=47) foi superior ao número de animais adultos (n=32). [**Tabela 4AII (Anexo II), Figura 4**].

No que concerne à **lebre-ibérica caçada**, verificou-se que o número de fêmeas (n=22) foi ligeiramente inferior ao número de machos (n=26), não tendo sido efetuado registo de género para apenas 1 animal caçado **(Tabela 5AII (Anexo II), Figura 4**). Relativamente aos cadáveres, o número de fêmeas (n=43) foi apenas ligeiramente inferior ao número de machos (n=45). Não foi feito registo de género para 7 dos 95 cadáveres de lebre ibérica recolhidos no campo [**Tabela 5AII (Anexo II), Figura 4**]. O peso dos cadáveres dos cadáveres de lebre-ibérica prospetados no campo variou entre 360 e 2500 gramas. No caso dos juvenis, a amplitude de pesos registada variou entre 360 e 1560 gramas. Para os juvenis sexados, a amplitude de peso variou entre 614 e 1650 gramas no caso dos machos, e 489 e 1550 no caso das fêmeas. Nos adultos, o peso variou entre 1500 e 2500 gramas. Para os adultos de lebre-ibérica sexados, a amplitude de pesos variou entre 1500 e 2200 gramas no caso dos machos e entre 1620 e 2500 no caso das fêmeas.

No que toca ao género das lebres encontradas mortas, verificou-se que o número de fêmeas de lebre-ibérica (n=44) amostradas foi ligeiramente inferior ao de machos (n=48), para o mesmo período temporal. Não foi feito registo de género em 8 dos 100 cadáveres recolhidos entre 1 setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. **[Tabela 5AII (Anexo II), Figura 4**].

Para os animais sexados, tanto no grupo dos machos como das fêmeas, o número de animais juvenis, 4 e 5 respetivamente, foi inferior ao número de animais adultos (42 e 39, respetivamente).

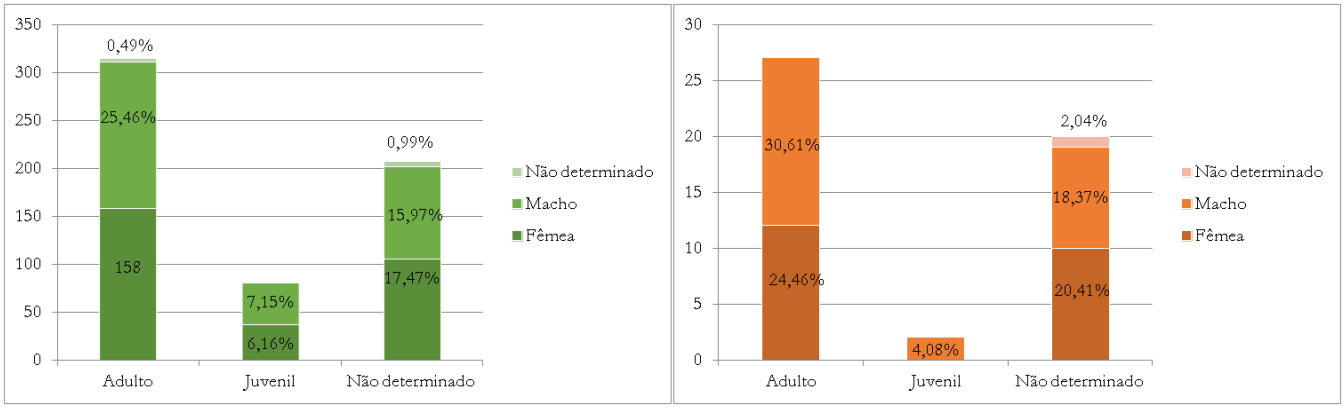


Figura 3. Sexo e classes etárias na amostragem de coelho-bravos caçados (esquerda) e encontrados mortos no campo (direita) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020

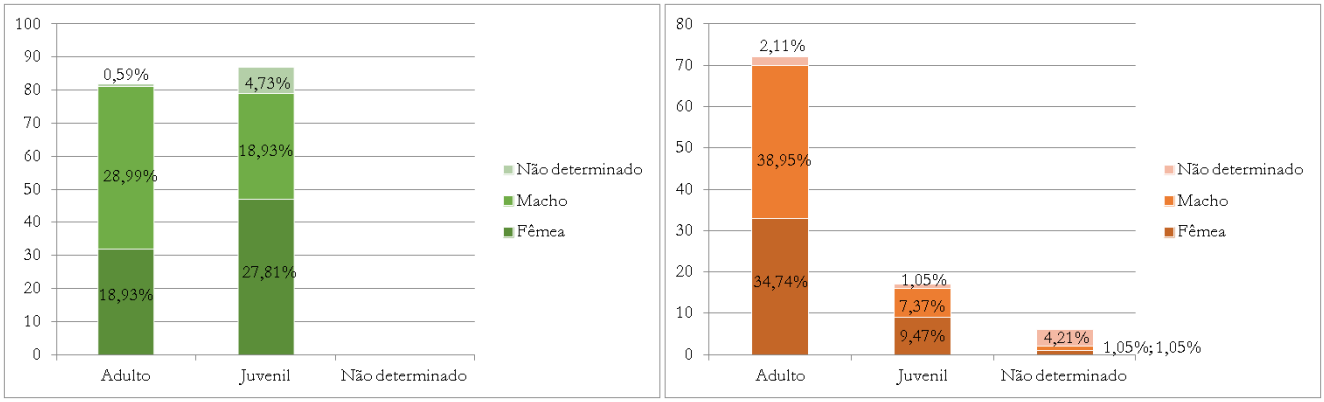


Figura 4. Sexo e classes etárias na amostragem de lebres caçadas (esquerda) e encontradas mortas no campo (direita) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

Origem geográfica e temporal das amostras de leporídeos silvestres

No que se refere à origem geográfica das amostras de **lebre-ibérica caçada** por unidade territorial NUT II, a maior parte da amostragem obtida no decurso das épocas cinegéticas de 2018/2019 e 2019/2020 teve origem na região do Alentejo, totalizando respetivamente 94,74% (n=36) e 81,82% (n=9) das amostras. Da região do Norte receberam-se 2 amostras (5,26%) na EV 18/19, e do Algarve e do Centro apenas uma amostra (9,09%), respetivamente, durante a EV 19/20. [**Tabelas 6AII e 7AII (Anexo II), Figura 5 e 6**].

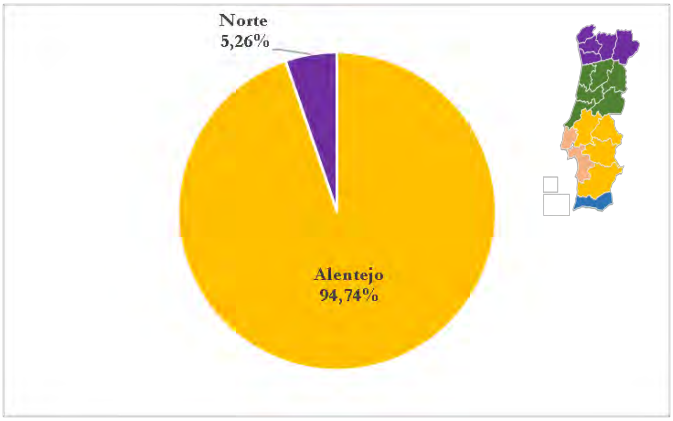


Figura 5. Amostragem de lebre-ibérica caçada por unidade territorial NUT II na EV 18/19.

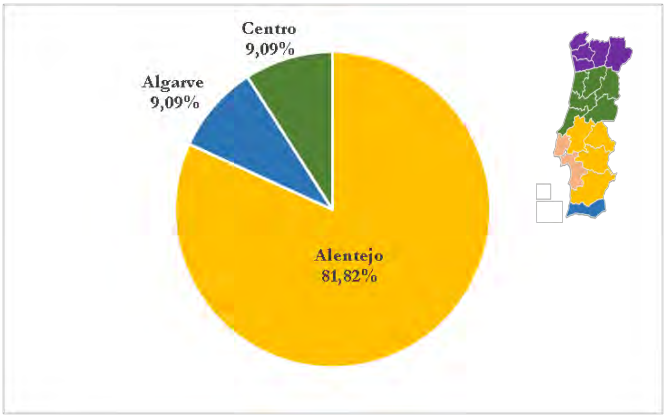


Figura 6. Amostragem de lebre-ibérica caçada por unidade territorial NUT II na EV 19/20.

Na EV 18/19 a maioria das amostras de lebre-ibérica foram obtidas nos distritos de Beja (65,79%, n=25) e Évora (26,32%, n=10), mais especificamente, nos concelhos de Almodôvar (28%, n=7), Castro Verde (28%, n=7) e Mértola (24%, n=6), **[Tabela 6AII (Anexo II), Figuras 7 e 9]**.
Na EV 19/20 a maior parte destas amostras provieram dos distritos de Évora (54,55%, n=6), mais especificamente dos concelhos de Borba, Évora e Mora qua aportaram individualmente 2 amostras cada um (n=2, 33,33%). **[Tabela 7AII (Anexo II), Figuras 8 e 10]**.

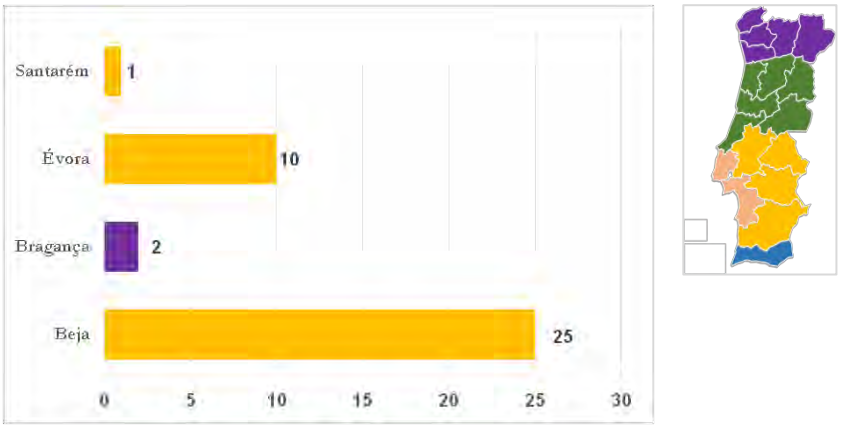


Figura 7. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por distrito na época cinegética de 2018/2019.

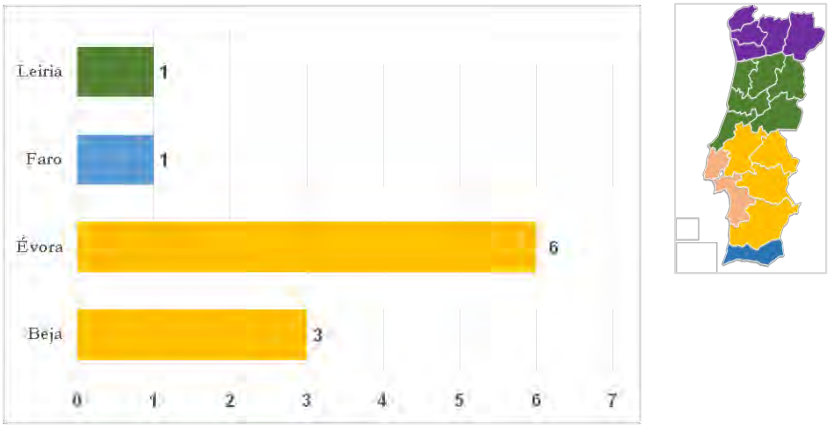


Figura 8. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por distrito na época cinegética de 2019/2020.

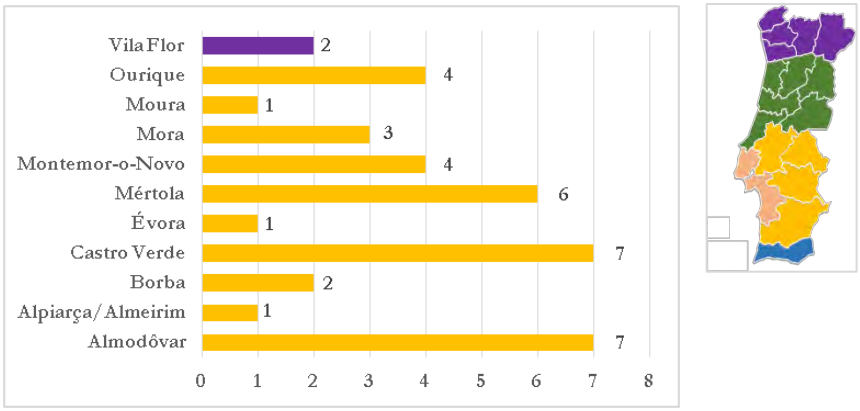


Figura 9. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por concelho na época cinegética de 2018/2019.

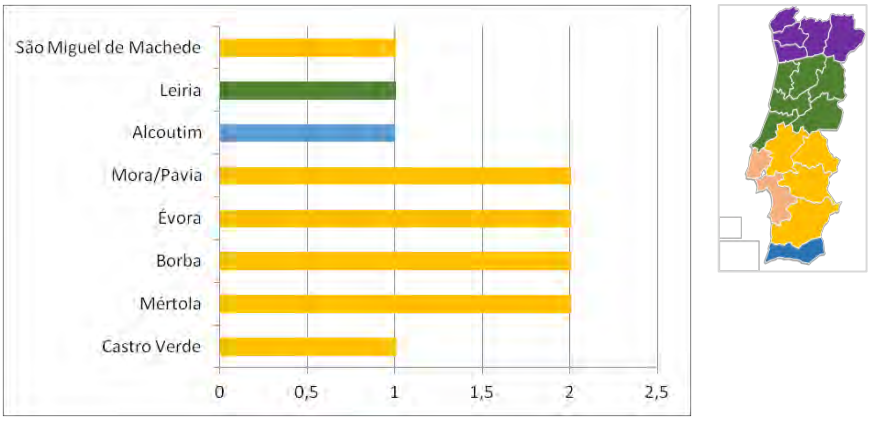


Figura 10. Amostragem de lebre-ibérica caçada obtida por concelho na época cinegética de 2019/2020.

A amostragem total de lebre-ibérica obtida, por zona de caça, no período cinegético de 2018/2019 e 2019/2020 encontra-se representada na **Figura 11**.



Figura 11. Localização geográfica dos locais onde foram caçadas e amostradas as lebres-ibéricas na época cinegética de 2018/2019 (**A**) e 2019/2020 (**B**). O número de animais caçados em cada zona de caça está indicado sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem.

A maioria dos exemplares de lebre-ibérica amostrados na EV 18/19 foi conseguida do distrito de Beja (n=25), maioritariamente em zonas de caça turística, com destaque para as ZCT nº2405 de Herdade do Monte da Vinha, e nº 1803 Herdade Alcaria Ruiva. Na EV 19/20 a maioria dos exemplares provieram do distrito de Évora (n=6). [**Tabelas 6AII e 7AII (Anexo II), Figura 12 e 13**].

Dos cadáveres de lebre ibérica amostrados entre 1 de setembro de 2018 e 20 de junho de 2020, a maior parte proveio do Alentejo (63,16%, n=60), nomeadamente dos distritos de Beja e Évora que aportaram conjuntamente cerca de metade da amostragem proveniente desta região (individualmente de cada distrito provieram 23 animais, correspondendo a 24,21%). Dentro destes distritos, proveio um maior número de amostras do concelho de Castro Verde (34,78%, n=8) no distrito de Beja, e do Redondo (26,06%, n=6) no distrito de Évora [**Tabela 8AII (Anexo II), Figura 12, 13 e 14]**.

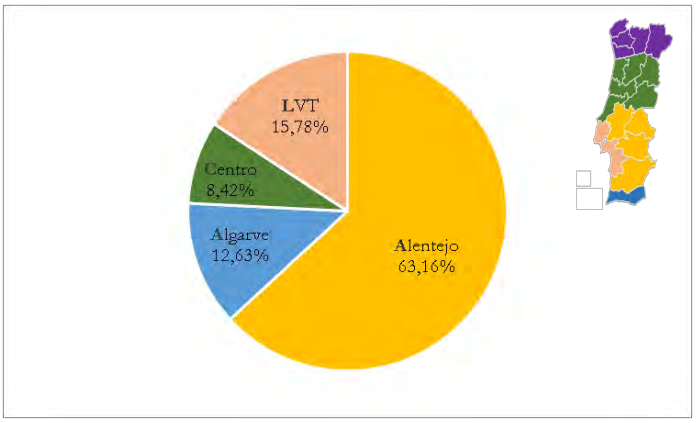


Figura 12. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por Nut II.

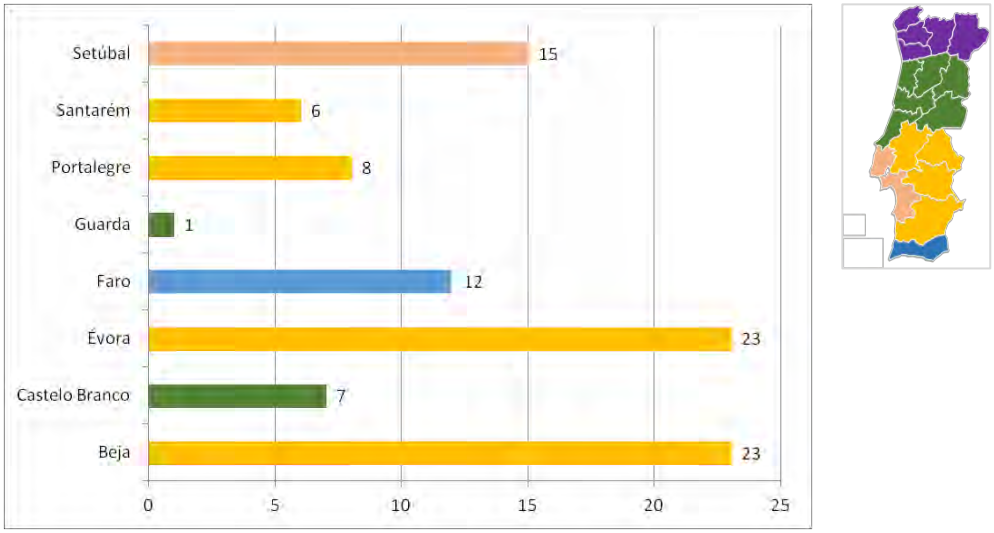


Figura 13. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por distrito

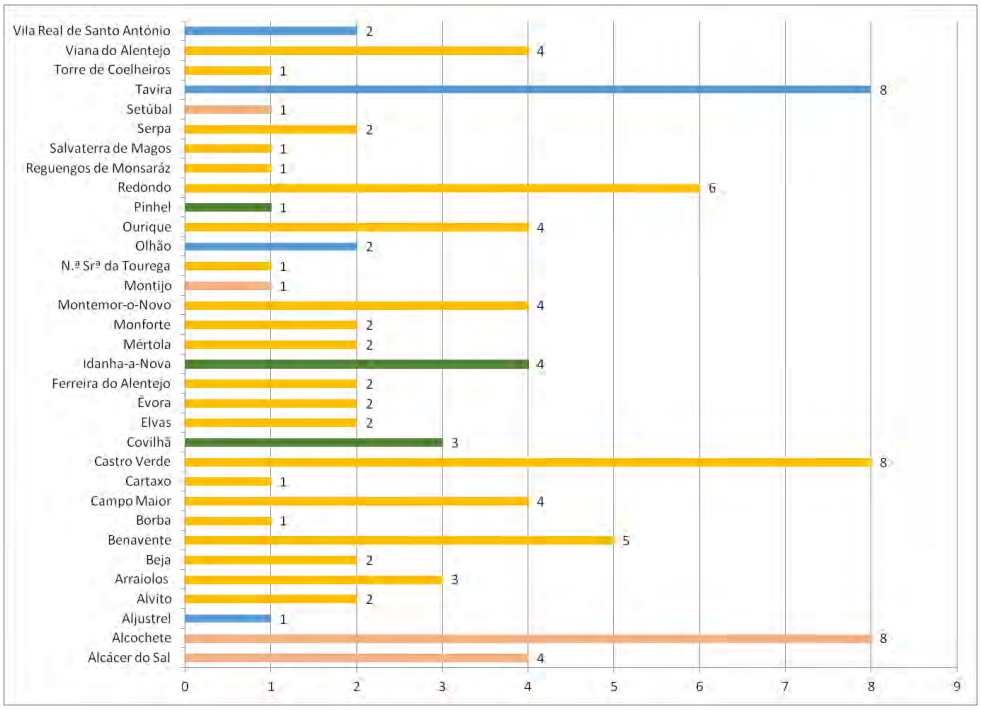


Figura 14. Amostragem de lebre-ibérica cadáver obtida por concelho.

A amostragem total de lebre-ibérica obtida por zona de caça, no período cinegético de 2018/2019 e 2019/2020, encontra-se representada na **Figura 15**.

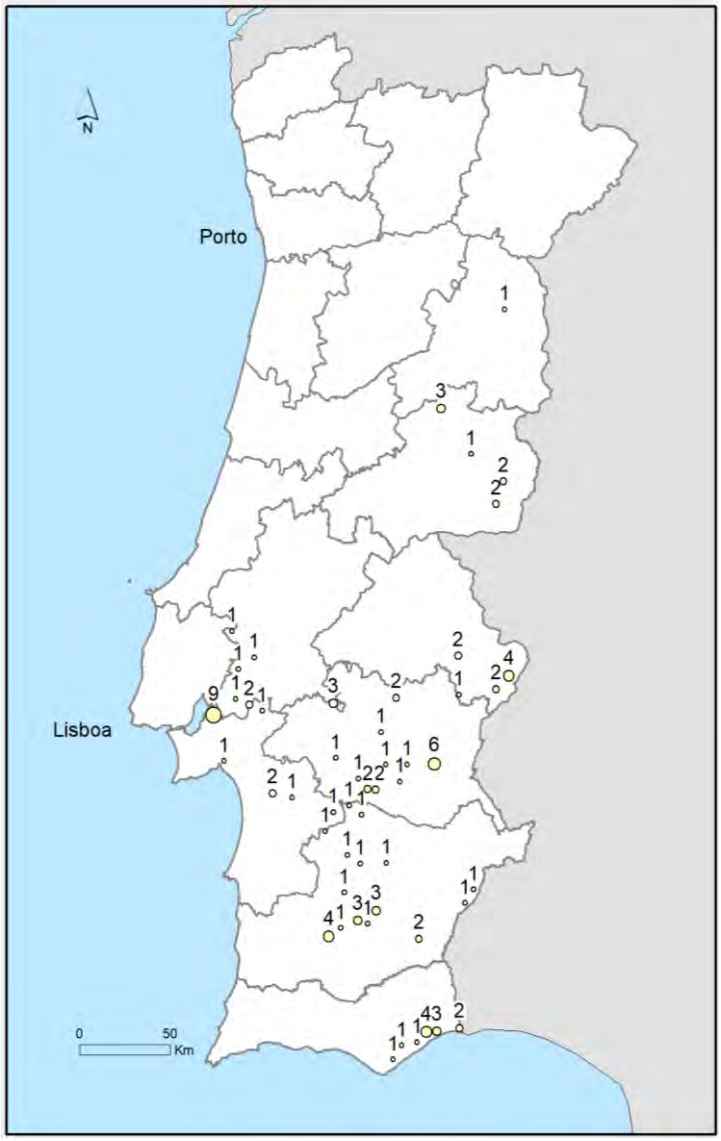


Figura 15. Origem geográfica dos cadáveres de lebre-ibérica recolhidos entre 30 de outubro de 2018 e 30 de junho de 2020.

No que toca à proveniência de **coelho-bravo caçado** por unidade territorial NUT II, na EV 18/19 verificou-se que a amostragem mais numerosa teve origem na região do Alentejo, que aportou 88,67% (n=235) das amostras rececionadas, e que na EV 19/20 o Alentejo aportou 74,40% (n=250) das amostras. A maior parte dos espécimes na EV 18/19 foi oriunda do distrito de Beja (40,75%, n=108), mais especificamente do concelho de Mértola que aportou 86,31% (n=59) da amostragem proveniente deste distrito. Na EV 19/20 foi o distrito de Évora que aportou a maior parte da amostragem (29,76%, n=100), nomeadamente o concelho de Estremoz (50%, n=50), seguido pelo distrito de Beja de onde vieram 97 amostras (28,87%), maioritariamente do concelho de Mértola (56,70%, n=55). [**Tabelas 9AII e 10AII (Anexo II), Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21]**.

Das restantes regiões do país, na EV 18/19, do Norte e Algarve proveio uma amostragem de 7,17%, e 4,15% respetivamente, e na EV 19/20 o Centro foi a segunda região com maior amostragem representando c 12,5% da amostragem total, enquanto o Norte e o Algarve aportaram 4,17% e 2,08% da amostragem, respetivamente [**Tabelas 9AII e 10AII (Anexo II), Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21]**.

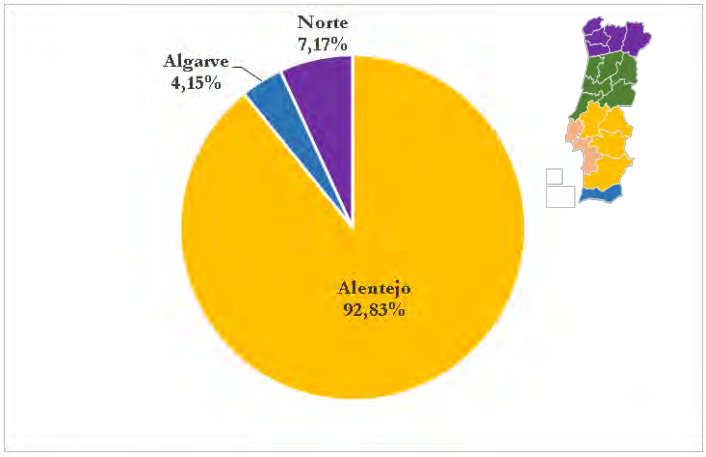


Figura 16. Amostragem de coelho-bravo caçado por unidade territorial NUT II na época cinegética de 2018/2019.

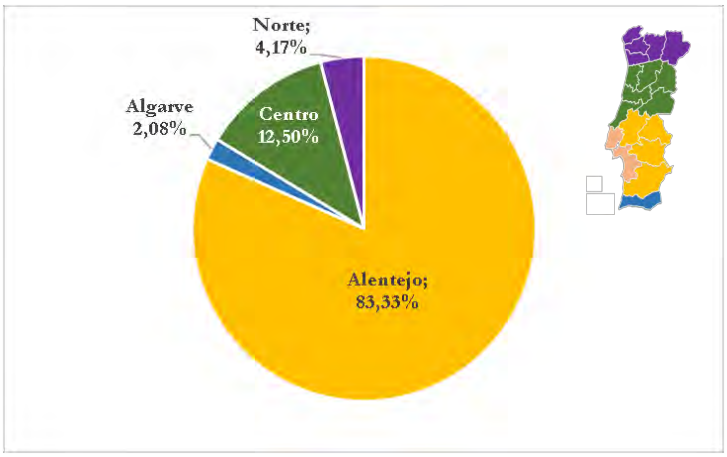


Figura 17. Amostragem de coelho-bravo caçado por unidade territorial NUT II na época cinegética de 2019/2020.

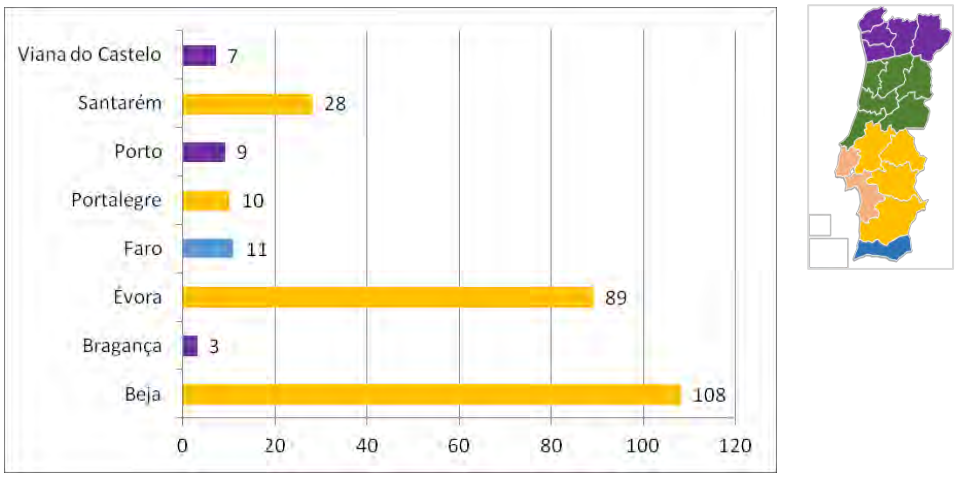


Figura 18. Amostragem de coelho-bravo caçado por distrito na época cinegética de 2018/2019.

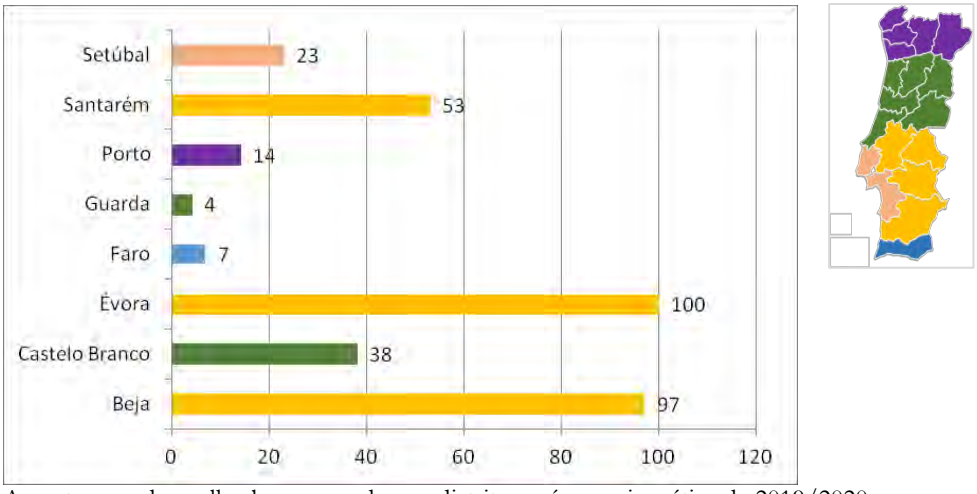


Figura 19. Amostragem de coelho-bravo caçado por distrito na época cinegética de 2019/2020.

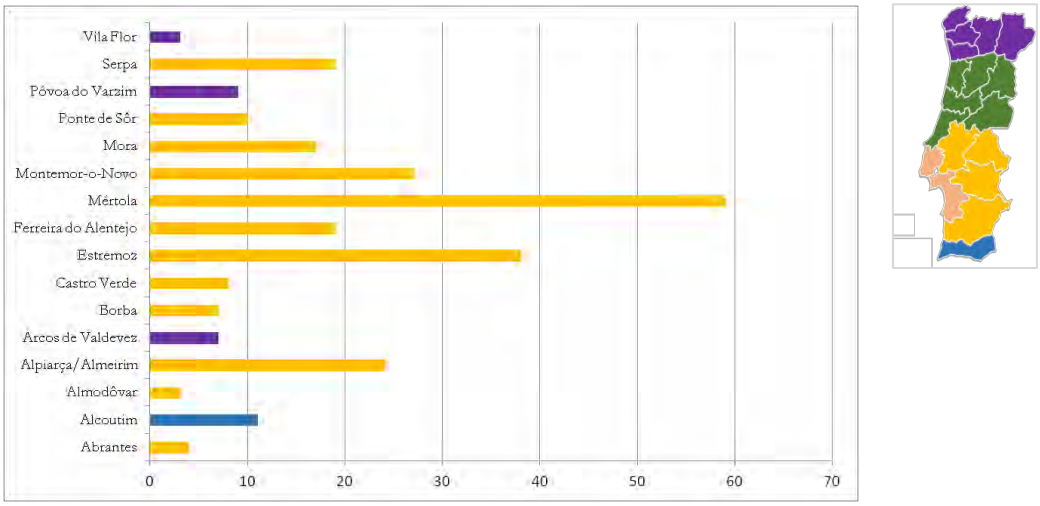


Figura 20. Amostragem de coelho-bravo caçado por concelho na época cinegética de 2018/2019.

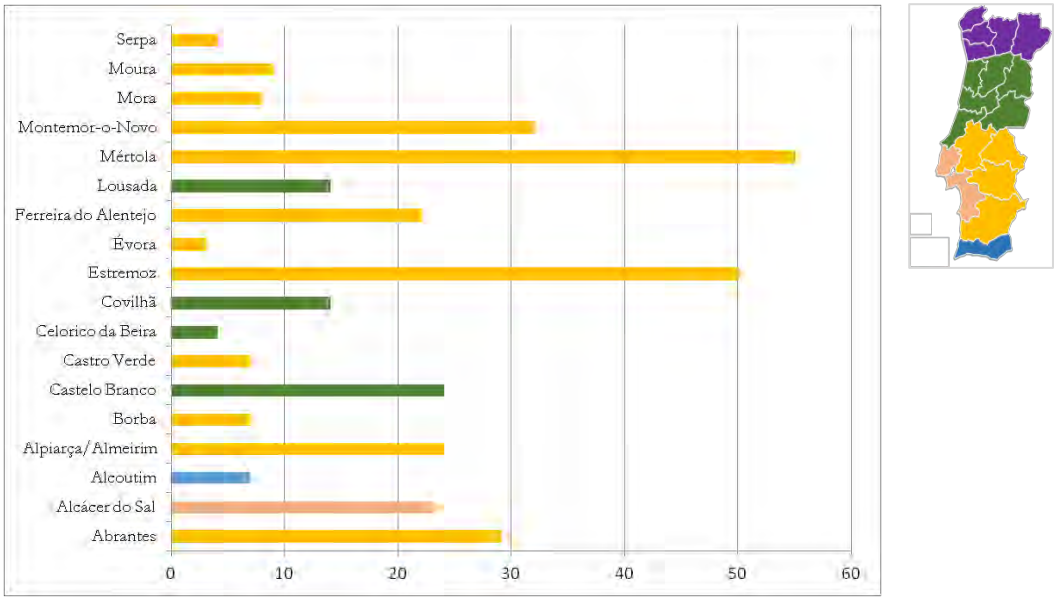


Figura 21. Amostragem de coelho-bravo caçado por concelho na época cinegética de 2019/2020.

A amostragem total de coelho-bravo caçado, por zona de caça, na época venatória de 2017/2018 encontra-se representada na **Figura 22.**

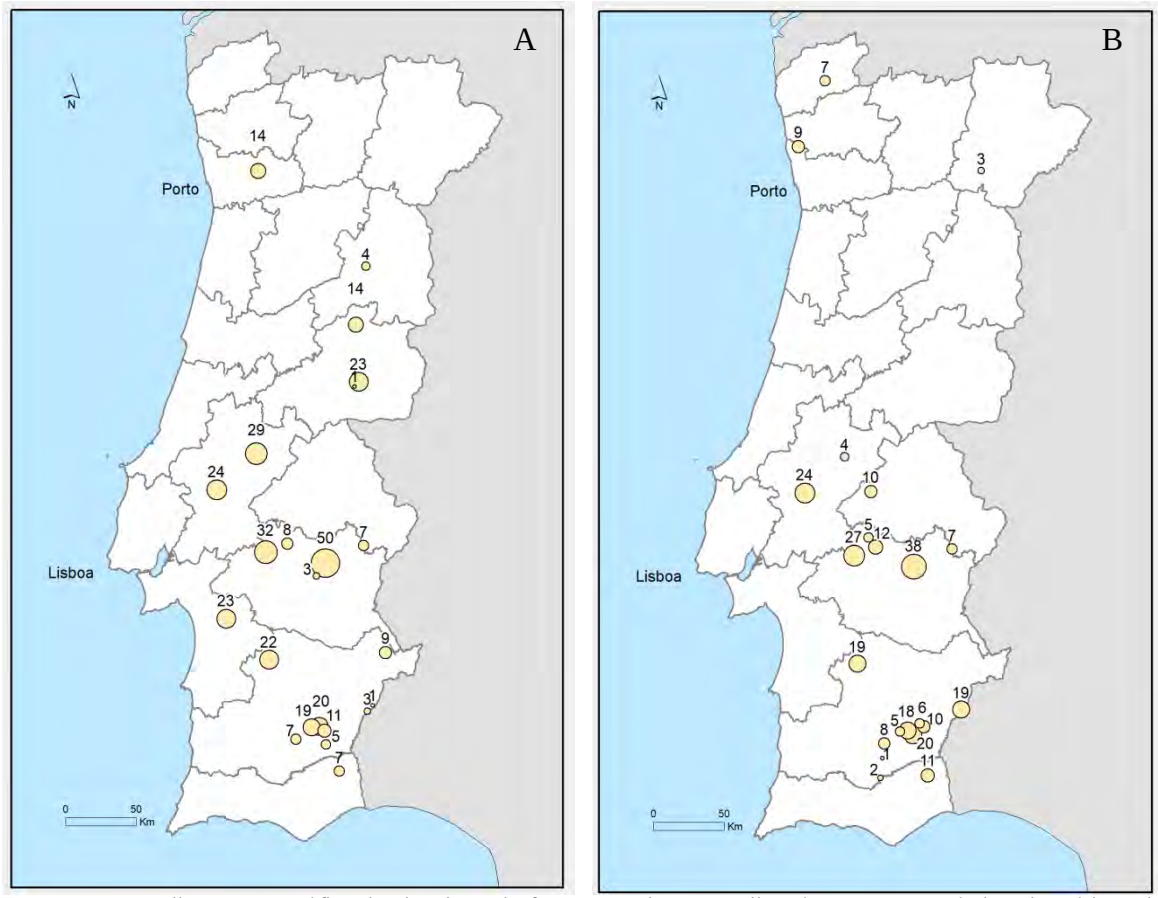


Figura 22. Localização geográfica dos locais onde foram caçados os coelhos-bravos nos períodos cinegéticos de setembro a dezembro de 2018 (**A**) e de setembro a dezembro de 2019 (**B**). O número de animais caçados em cada zona de caça está indicado sobre um círculo cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem.

A maior parte da amostragem de coelho-bravo caçado na EV 18/19 e 19/20 foi obtida durante o mês de outubro (n=131 e n= 161, respetivamente), nos três tipos de zonas de caça (turística, associativa e municipal) participativas no projeto +Coelho, maioritariamente nas zonas de caça turísticas e associativas **[Tabelas 9AII e 10AII (Anexo II), Figura 30]**.

As zonas de caça e outros locais de onde provieram os **cadáveres de coelho-bravo** prospetados ativamente no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 encontram-se listadas na **Tabela 11AII (Anexo II)**. A maioria consiste em zonas de caça turísticas (ZCT) localizadas no Alentejo.

Quando determinada a amostragem de cadáveres de coelho-bravo por unidade territorial NUT II, verificou-se que a maioria proveio da região Alentejo (69,23%, n=117), essencialmente do distrito de Beja (51,28%, n=60). A região Alentejo foi secundada pela região LVT (11,83%, n=20) com amostragem oriunda do distrito de Lisboa (85%, n=17), sobretudo do concelho de Alenquer e Lisboa de onde proveio um total de 12 animais (n=70,59%). **[Tabela 11AII (Anexo II), Figuras 23, 24 e 25]**.

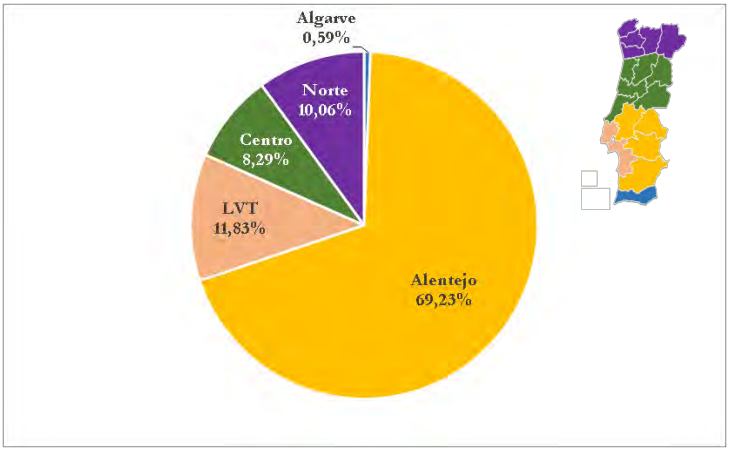


Figura 23. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida, por unidade territorial NUT II, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

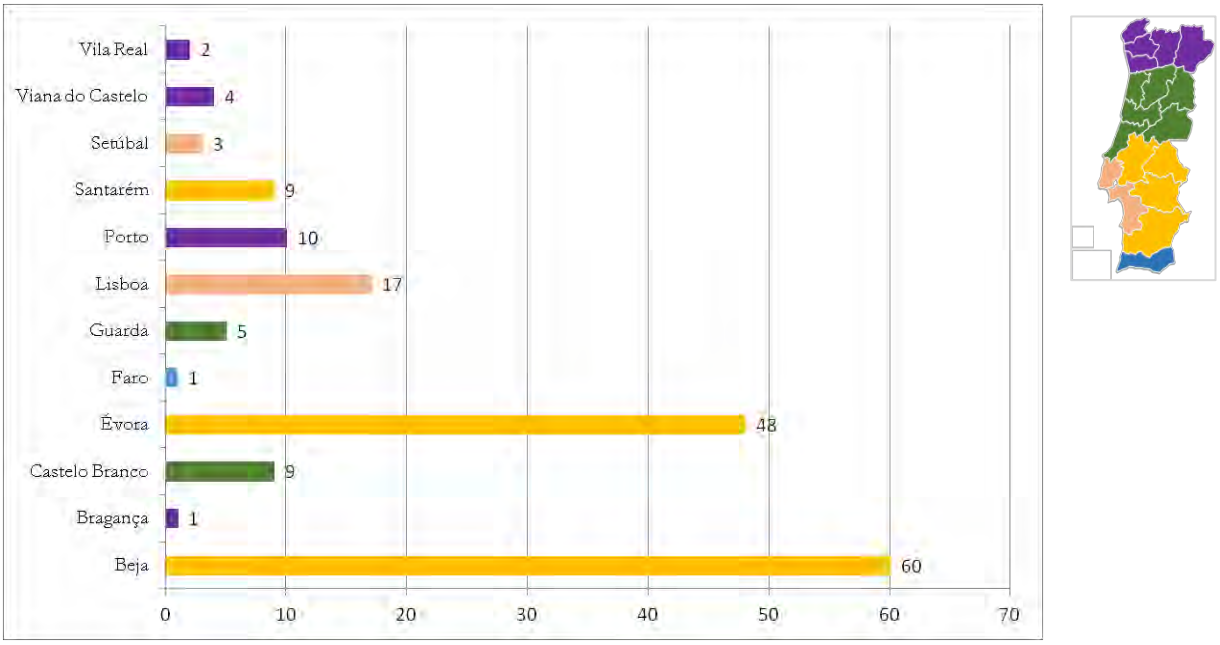


Figura 24. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida, por distrito, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

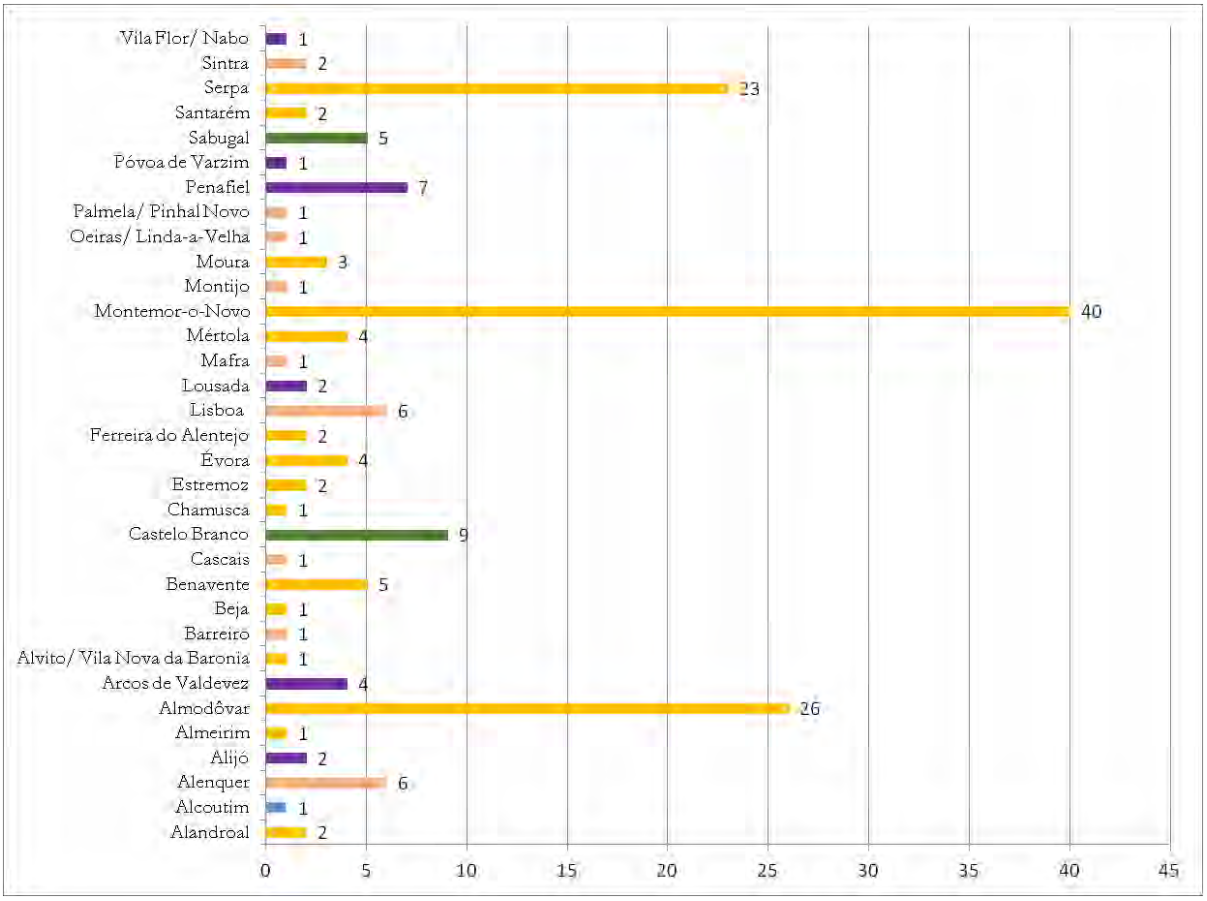


Figura 25. Amostragem de cadáveres de coelho-bravo obtida por, por concelho, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

A amostragem total de cadáveres de coelho-bravo recolhidos entre 1 de setembro de 2018 e 31 de agosto de 2019 e 1 de setembro de 2019 e 30 de junho de 2020 no projeto encontra-se representada na **Figura 26.**

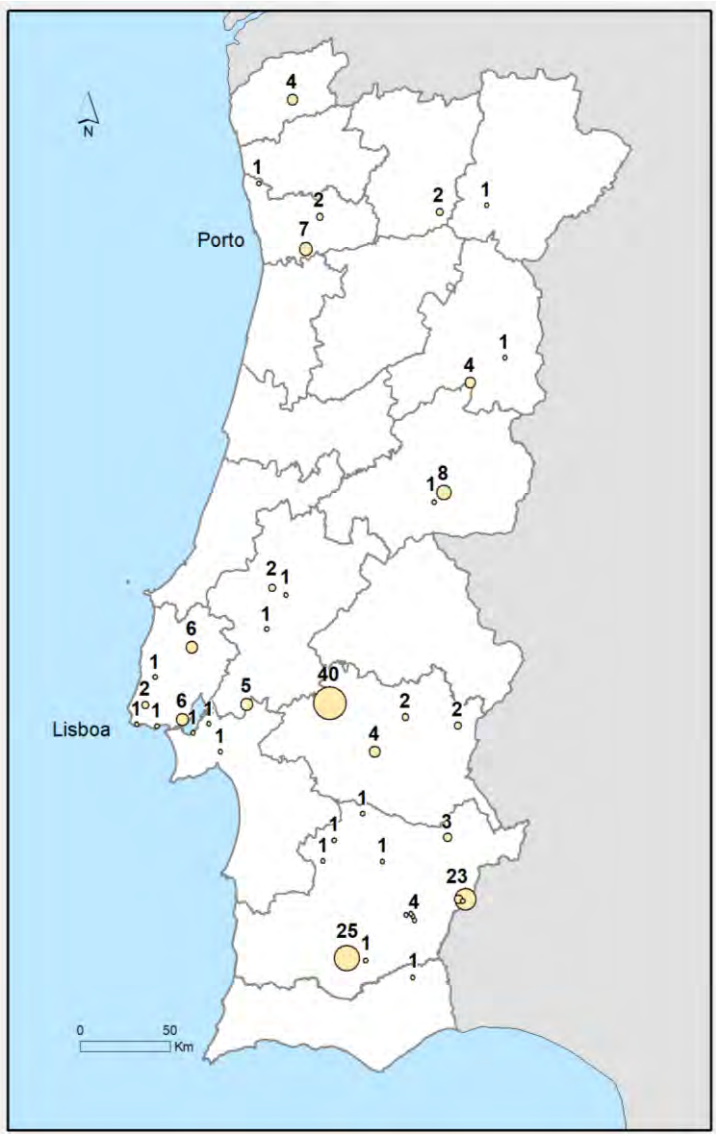


Figura 26. Localização geográfica dos locais onde foram recolhidos os cadáveres de coelho-bravo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. O número de cadáveres recolhidos em cada zona está indicado sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem.

A maioria dos cadáveres de coelho-bravo rececionados pelo INIAV entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram recolhidos no período compreendido entre o início do 4º trimestre de 2018 (out. a dez.) e o final do 2º trimestre de 2019 (abril a junho), com especial enfoque para o 1º trimestre de 2019 e 2020 (jan. a mar.) **[Tabela 11AII (Anexo II), Figuras 34 e 37]**.

A maior parte dos cadáveres recolhidos no 4º trimestre de 2018 proveio de centros de reprodução. A amostragem teve participação semelhante das ZC turísticas (ZCT), associativa (ZCA) e municipais (ZCM). No que se refere ao 2º trimestre de 2019, verificou-se que a maioria dos cadáveres recolhidos neste período foi oriunda de zonas de caça turísticas (ZCT) e municipais (ZCM). **[Tabela 11AII (Anexo II)]**.

Em súmula, globalmente, foram rececionadas amostras de leporídeos silvestres de 15 distritos, localizados do Norte ao Sul do território continental. Contudo, a maior parte das amostras recebidas

proveio do distrito de Beja (n=297), sucedido pelo distrito de Évora (n=260). Os distritos de Santarém (n=100) e Faro (n=76) também aportaram um número significativo de amostras. **[Tabela 11AII (Anexo II), Figuras 34 e 37]**.

Participação das OSC 1º nível e outros parceiros na amostragem

Tal como no Projecto +Coelho 1, a participação das OSC de primeiro nível na recolha de amostras foi essencial para a concretização da avaliação sanitária. O distrito de Viana do Castelo foi exclusivamente amostrado pela FENCAÇA, tendo sido a OSC com participação mais relevante nos distritos do Santarém, Beja e Évora. Os distritos de Castelo Branco e Guarda foram maioritariamente amostrados pela CNCP. As amostras oriundas dos distritos de Leiria e Lisboa foram exclusivamente coletadas por particulares (identificados nas figuras como "Outros"). A ANCP foi a OSC de primeiro nível com participação mais relevante nos distritos de Beja, tendo tido uma contribuição significativa nos distritos de Évora, Portalegre e Faro. Além dos distritos já mencionados, a participação de particulares ("Outros") refletiu-se também na amostragem dos distritos de Lisboa e Setúbal.

4. Investigar o estado hígio-sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica (OE1)

Resultados laboratoriais em leporídeos silvestres

Globalmente, no segundo ano do projeto +Coelho foram realizadas 9765 análises laboratoriais no período entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. Estas análises compreenderam exames virológicos, anatomopatológicos, bacteriológicos, parasitológicos e serológicos, descriminados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Análises laboratoriais realizadas nas amostras de leporídeos silvestres (coelho-bravo e lebre-ibérica) recebidas, por vigilância ativa e passiva, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

	Exame					
Categoria	**Anatomopatológico**	**Virológico**	**Bacteriológico**	**Parasitológico**	**Histopatológico**	**Total**
Caçado	0	6390	0	0	0	6390
Cadáver	264	2376	251	220	264	3375
Total	**264**	**8766**	**251**	**220**	**264**	**9765**

Resultados Virológicos

No decurso do Projeto +Coelho 2 foram amostradas de 144 exemplares de **lebre-ibérica** (49 exemplares caçados e 95 cadáveres encontrados no campo). Nenhuma das amostras de fígado e baço destes animais foi positiva a RHDV2 ou RHDV. O primeiro exemplar de lebre-ibérica **positivo ao vírus da mixomatose** foi recolhido a 28 de outubro de 2018. Este cadáver proveio da ZC nº6431, ZCT Vale de Moura e Mourinha, localizado em Évora. O exemplar correspondia a uma fêmea adulta com 2,2kg e boa condição física. Apresentava espessamento nodular da mucosa anal e genital, e tumefação das pálpebras, mucosa anal e genital. Tinha uma infeção de oocistos de *Eimeria media, E. magna*, e *Passalurus ambiguus*, e presença de bactéria patogénica *Enterococcus faecium*.

Foram também testadas para a presença dos vírus RHDV2, RHDV e da mixomatose, todas as amostras de fígado e baço dos exemplares de **coelho-bravo caçado** nas épocas cinegéticas 2018/2019 e 2019/2020.

Foi detetada a **presença de RHDV2** em **1** dos **601 exemplares** de **coelho-bravo obtidos em ato venatório**, correspondendo a uma positividade na amostra de 0,17%. O exemplar positivo foi colhido na EV 19/20, oriundo do distrito do Porto, da ZC nº3468, ZCM de Lousada, colhido a 16 de outubro de 2019 (**Figura 27**).

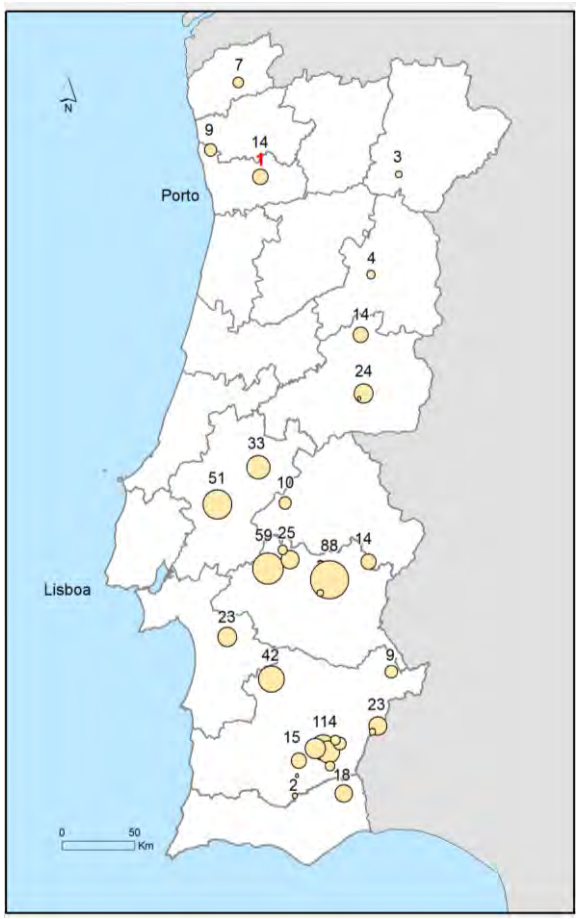


Figura 27. Localização geográfica dos coelhos caçados na EV 19/20. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto. Apenas uma amostra de coelho-bravo caçado foi positiva a RHDV2.

O **vírus da mixomatose** foi detetado em **15** dos **601** espécimes de **coelho-bravo** obtidos em **ato venatório** no decurso das épocas cinegéticas de 2018/2019 e 2019/2020, correspondendo a uma positividade na amostra de 2,49% em animais caçados, nomeadamente 2,64% (7 em 265) na EV 18/19 e 2,38% (8 em 336) na EV 19/20. Os animais positivos provieram dos distritos de Beja, Évora, Porto e Santarém. O distrito de Évora teve o maior número de animais positivos (n=5), e o distrito de Porto a maior percentagem de positividade amostral (14,29%), contudo o número de amostras neste distrito foi inferior a 30 (n=14). **(Tabela 3, Figuras 28 e 29)**.

Tabela 3. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em coelho-bravo caçado nas épocas venatórias 2018-2019 e 2019-2020, e respetiva percentagem de positividade amostral.

Época Venatória	Distrito	Nº de animais positivos	Amostragem/ distrito	Percentagem de positivos na amostra/ distrito
18/19	**Beja**	2	108	1,85
	Évora	5	82	6,10
19/20	**Évora**	3	100	3,00
	Santarém	3	53	5,66
	Porto	2	14	14,29

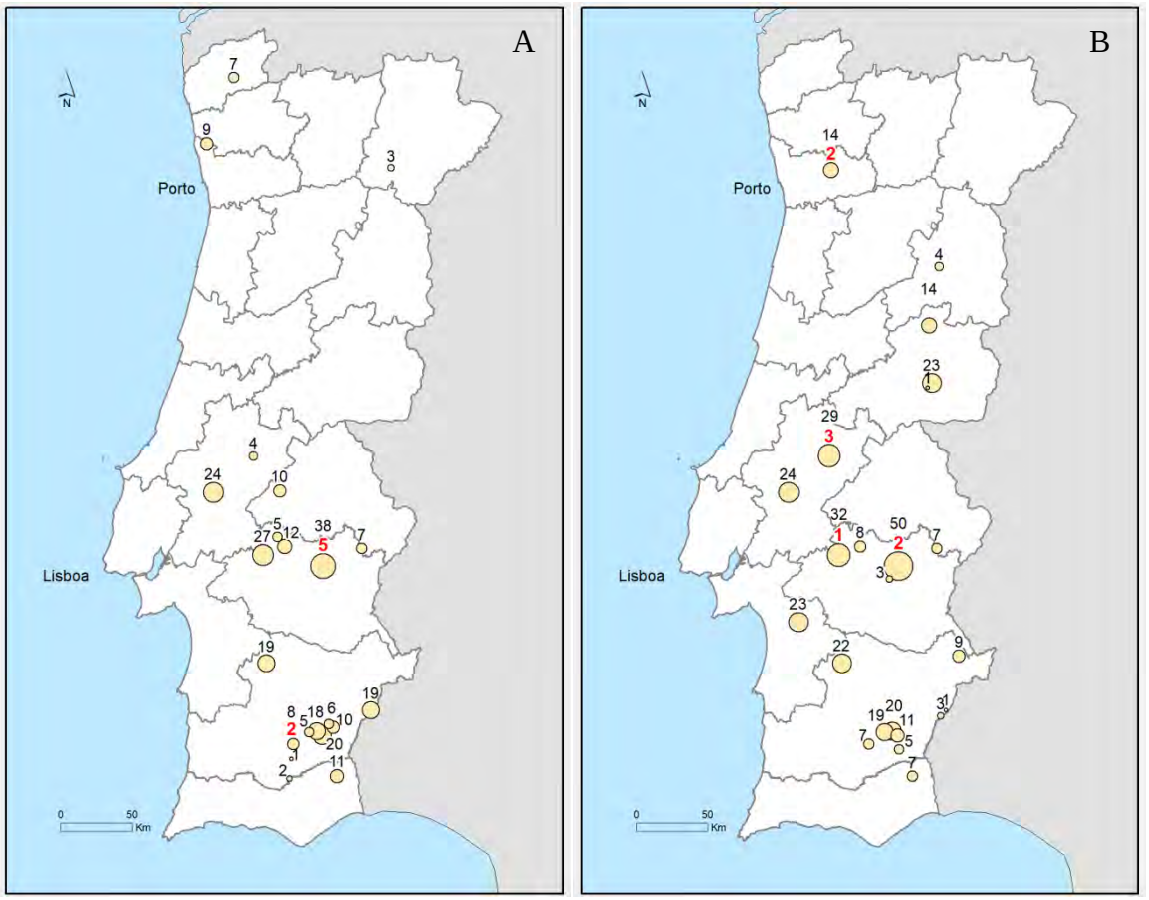


Figura 28. Localização geográfica das amostras de coelho-bravo caçado, positivas ao vírus da mixomatose, obtidas na EV 18/19 (**A**) e na EV 19/20 (**B**). O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto.

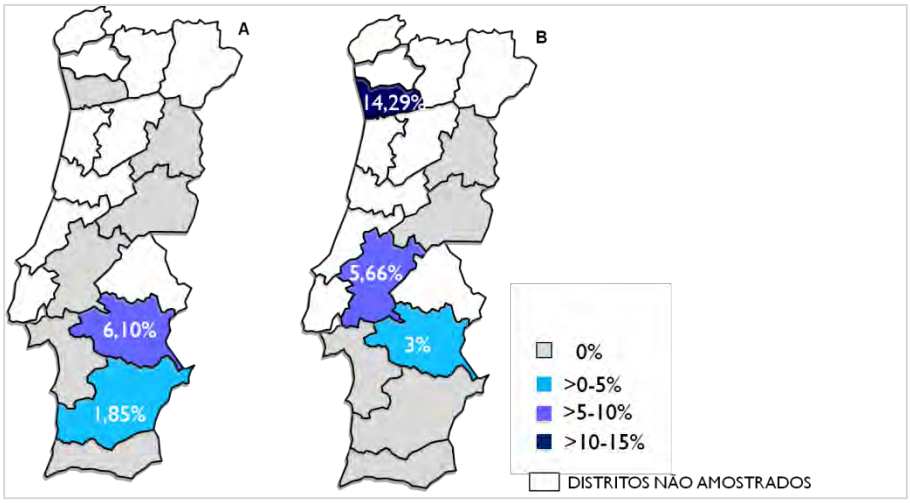


Figura 29. Positividade a mixomatose na amostra de coelho-bravo caçado na EV 2018-19 (**A**) e na EV 2019-20 (**B**), por distrito.

Análise temporal da deteção do vírus da mixomatose em coelhos-bravos caçados

No que toca à análise temporal, a maior parte dos coelhos-bravos caçados que testaram positivos a mixomatose foram detetados nos meses de outubro de 2018 e de 2019.

Com efeito, verificou-se que no mês de outubro de 2018 foram detetados 7 animais positivos a mixomatose, oriundos da ZC nº5671 (ZCT do Monte de Cima n=5) no distrito de Évora, e outros 2 da ZC nº2477 (ZCT Neves da Graça) no distrito de Beja. No mês de outubro de 2019, foram detetados 7 animais positivos ao vírus da mixomatose, dos quais dois foram oriundos da ZC nº 3468 (ZCM de Lousada) no distrito do Porto, três da ZC nº 1772 (ZCA Freguesia do Tramagal), no distrito de Évora, e dois da ZC nº 5671 (ZCT do Monte de Cima), no distrito de Évora e um da ZC nº4 (ZCA Herdade Abrunheira, Paço de Aragão e outras).

No mês de novembro de 2019 foi também recolhido um exemplar de coelho-bravo positivo a mixomatose, oriundo da ZC nº 1772 (ZCA Freguesia do Tramagal), no distrito de Évora (**Figura 30**).

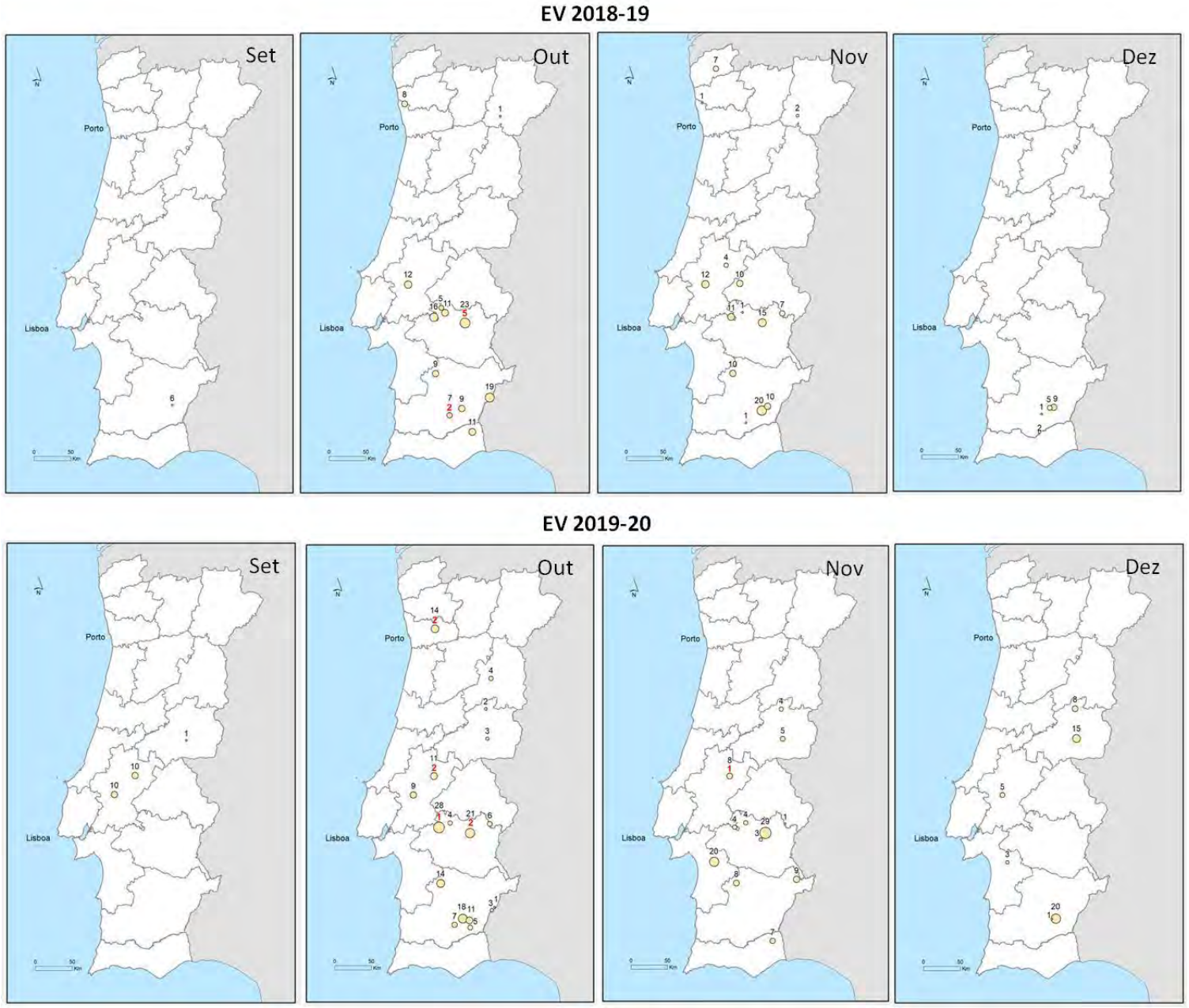


Figura 30. Localização geográfica das zonas de caça (ZC) onde foram caçados os coelhos-bravos amostrados entre os meses de setembro e dezembro de 2018 (EV 18/19) e setembro e dezembro de 2019 (EV 2019-2020). O número de animais caçados por ZC está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem, e o número de animais positivos a **mixomatose** encontra-se indicada a vermelho sobre o círculo correspondente.

Como foi anteriormente referido, apesar das evidências ocasionais recolhidas em Portugal e noutras localizações geográficas apontarem para a substituição das estirpes clássicas pelo novo vírus, RHDV2, entendeu-se necessária a pesquisa sistemática das estirpes clássicas durante esta monotorização para se concluir sobre esta substituição em todo o território nacional amostrado. Assim, foi realizada a pesquisa das estirpes clássicas na totalidade da amostragem de coelhos-bravos obtidos em ato venatório (n=601), sendo que todos os animais foram negativos para a presença de RHDV.

Da totalidade dos **cadáveres de leporídeos** (n=321) recebidos no laboratório de referência entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, 82,24% corresponderam a leporídeos silvestres encontrados mortos no campo (n=264). Conforme evidenciado no fluxograma das amostras, estes animais foram submetidos a necropsia e a exames virológicos, bacteriológicos e parasitológicos. Foram recolhidas amostras de 169 coelhos-bravos e 95 de lebres-ibéricas encontradas mortas. Os restantes coelhos-bravos (n=35,10,90%) rececionados, foram encontrados mortos em três explorações de produção cinegética das espécies, que o Grupo +Coelho teve oportunidade de acompanhar. Vinte e dois cadáveres de lebres-ibéricas recolhidos no núcleo de reprodução criado pelo Grupo de Trabalho +Coelho no âmbito do OE 6, MG 6. Os dados referentes a estas amostragens originárias de centros de reprodução são apresentados separadamente dos restantes animais (seções 9 e 15).

Os **169 cadáveres de coelho-bravo** recolhidos no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 foram sujeitos a **exame anatomopatológico** durante o qual foram recolhidas amostras de fígado e baço para pesquisa de RHDV2, RHDV e de várias matrizes para pesquisa de vírus da mixomatose. Foram colhidas diferentes amostras para exames bacteriológicos e parasitológicos e, em alguns casos, a exame toxicológico.

Dos **169 cadáveres de coelho-bravo** recolhidos no campo, **82 espécimes foram positivos** para **RHDV2** correspondendo a uma positividade amostral de 48,52% (82/169) (**Figura 31**).

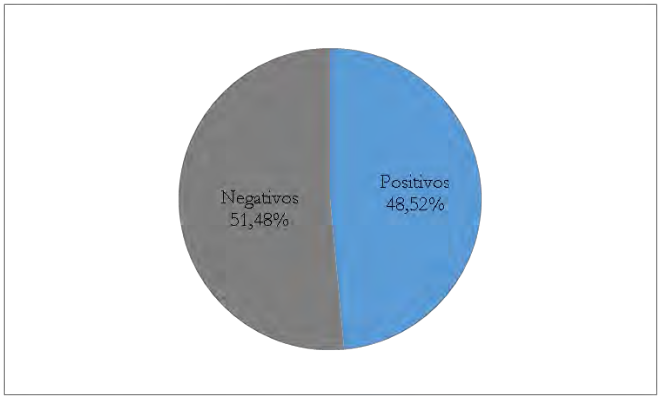


Figura 31. Positividade a RHDV2 na amostra de cadáveres de coelho-bravo recolhidos no campo.

Os cadáveres de coelho-bravo positivos a RHDV2, foram originários dos distritos elencados na **Tabela 4.** Apenas dos distritos de Beja e Évora provieram amostragens iguais ou superiores a 30 espécimes, número considerado estatisticamente significativo. (**Figuras 32 e 33**).

Tabela 4. Distritos onde foi detetado RHDV2 em cadáveres de coelho-bravo encontrados mortos no campo e respetiva percentagem de positividade amostral.

Distrito	Nº de animais positivos	Amostragem/ distrito	Percentagem de positivos na amostra/ distrito (%)
Beja	30	60	50,0
Bragança	1	1	100
Castelo Branco	3	9	33,33
Évora	35	48	72,92
Faro	1	1	100
Guarda	3	5	60,0
Lisboa	2	17	11,76
Santarém	4	9	44,44
Viana do Castelo	1	4	25,0
Vila Real	2	2	100

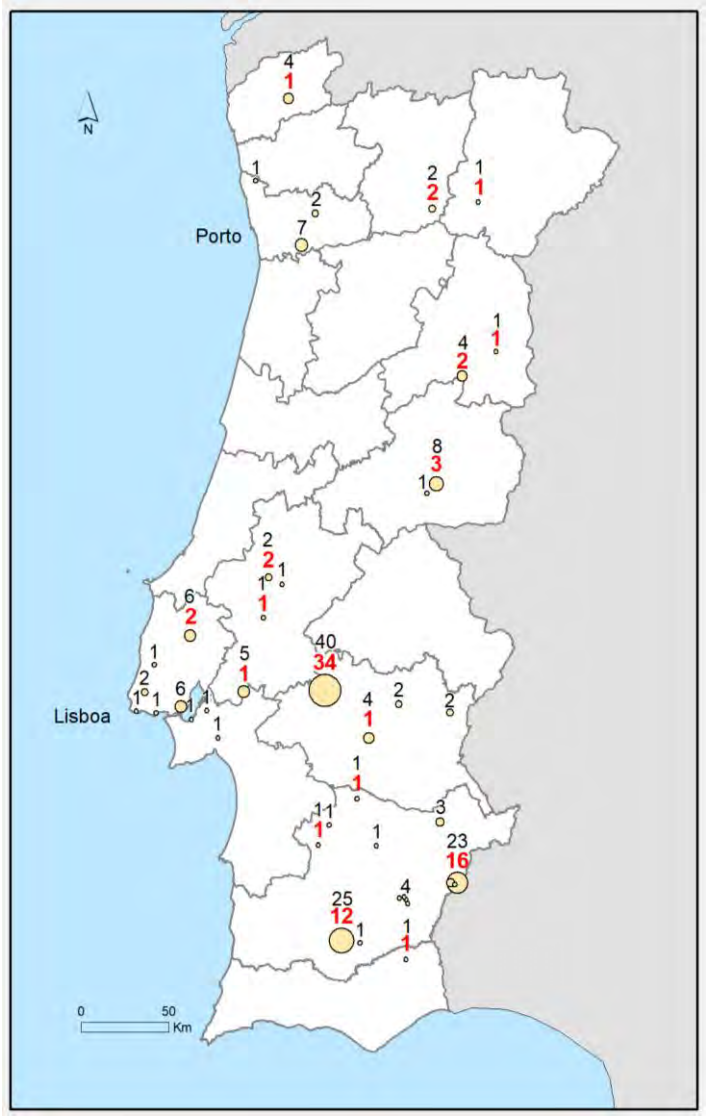


Figura 32. Localização geográfica dos cadáveres de coelho-bravo positivos RHDV2. O número de animas positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto.

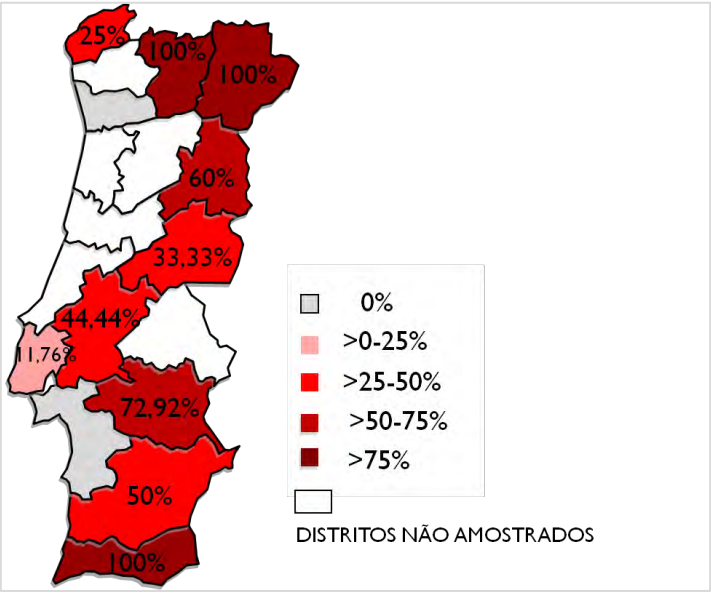


Figura 33. Positividade a RHDV2 na amostra de cadáveres de coelho-bravo recolhidos entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito.

Análise temporal da deteção do vírus da doença hemorrágica dos coelhos em cadáveres de coelho-bravo recolhidos no território continental

A análise temporal revela que no quer no 1º trimestre de 2018, quer no 2º, foram encontrados 4 animais positivos a RHDV2 na ZC nº 188 (ZCT Vale de Perditos) localizada no concelho de Serpa, no distrito de Beja. No 3º trimestre de 2018 foi detetado 1 cadáver de coelho-bravo positivo a RHDV2, na ZC nº 188 (ZCT Vale de Perditos). No decurso do 4º trimestre de 2018, foram detetados 6 cadáveres de coelho-bravo positivos a RHDV2, dos quais, um foi encontrado distrito de Beja, concelho de Ferreira do Alentejo, na ZC nº 5876 (ZCT Herdade do Vale Alarve e Outras), um na ZC nº4103 (ZCA da Parada) no distrito da Guarda, concelho do Sabugal, dois na ZC nº577 (ZCA de Casevel) no distrito de Santarém, concelho de Santarém, e dois na ZC nº188 (ZCT Vale de Perditos).

No 1º trimestre de 2019 foram detetados 17 cadáveres de coelho-bravo positivos a RHDV2. Destes, um foi encontrado na ZC nº 1512 (ZCA Benespera) no distrito da Guarda, um na ZC nº 2210 (ZCT Lotão) no distrito de Faro, um na ZC nº4855 (ZCT Herdade do Infantado) no distrito de Santarém, três na ZC nº 6531 (ZCT da Pedra da Légua) no distrito de Castelo Branco e oito na ZC nº 4 (ZCA Herdade Abrunheira, Paço de Aragão e Outras) no distrito de Évora. Dois dos cadáveres foram encontrados no distrito Vila Real e entregues por um particular e um cadáver no distrito de Bragança, também entregue por um particular.

No 2º trimestre de 2019 foram detetados 27 cadáveres positivos a RHDV2. Os cadáveres positivos neste trimestre foram encontrados nas ZC nº4 (ZCA Abrunheira, Paço de Aragão e Outras, n=7), nº188 (ZCT Vale de Perditos, n=5), ZC nº 366 (ZCA Aldeia Gavinha, n=1), no distrito de Lisboa, ZC nº1512 (ZCA Benespera, n=1) e na ZC nº6894 (ZCT da Herdade da Maruta, Pardieiro e Outras, n=12) no distrito de Beja. Um cadáver foi entregue por um particular oriundo do distrito de Évora.

No 3º trimestre de 2019 foram detetados 2 cadáveres positivos a RHDV2. Estes foram encontrados nas ZC nº 366 (ZCA Aldeia Gavinha) e nº3904 (ZCM Arcos de Valdevez).

No 4º trimestre de 2019 não foram encontrados cadáveres de coelho-bravo positivos a RHDV2.

No 1º trimestre de 2020 foram ainda detetados 21 cadáveres de coelhos-bravos positivos a RHDV2. Destes, 19 provieram da ZC nº 4 (ZCA Abrunheira, Paço de Aragão e Outras), no Distrito de Évora, um foi oriundo da ZC nº 5850 (ZCM Arneiros de Almeirim) no distrito de Santarém, e outro proveio do distrito de Beja, concelho de Alvito e foi entregue por um particular (**Figura 34**).

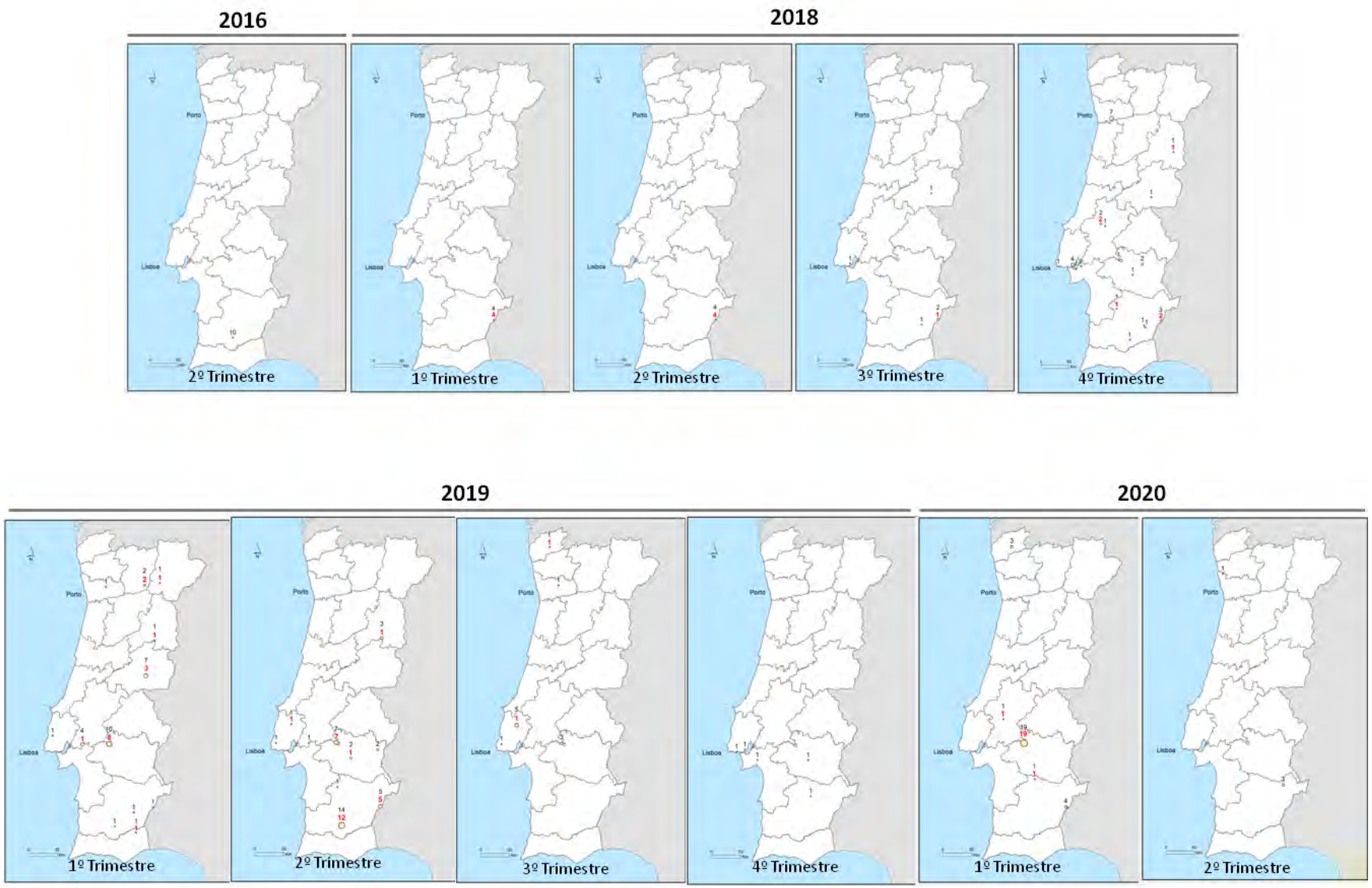


Figura 34. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de coelho-bravo enviados para o INIAV I.P. Alguns animais (n=10), referem-se ao 2º trimestre de 2016. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a **RHDV2**, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente.

Dos **169 cadáveres de coelho-bravo recolhidos no campo** entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, **47** foram positivos para a presença do **vírus da mixomatose**, correspondendo a uma positividade na amostra de 27,81% (47/169).

Os animais positivos foram oriundos dos distritos de Beja (n=10), Évora (n=14), Lisboa (n=10), Santarém (n=4), Castelo Branco (n=4), Porto (n=2), Viana do Castelo (n=2), e Setúbal (n=1). A maior positividade na amostra verificou-se no distrito de Lisboa (58,82%), e Castelo Branco e Santarém (44,44%). [**Tabela 5**, **Figuras 35 e 36**]

Tabela 5. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo e respetiva percentagem de positividade na amostra.

Distrito	Nº de animais positivos	Amostragem/ distrito	Percentagem de positivos na amostra/ distrito (%)
Beja	10	60	6,0
Castelo Branco	4	9	44,44
Évora	14	48	29,17
Lisboa	10	17	58,82
Porto	2	10	20,0
Santarém	4	9	44,44
Setúbal	1	3	33,33
Viana do Castelo	2	4	50,0

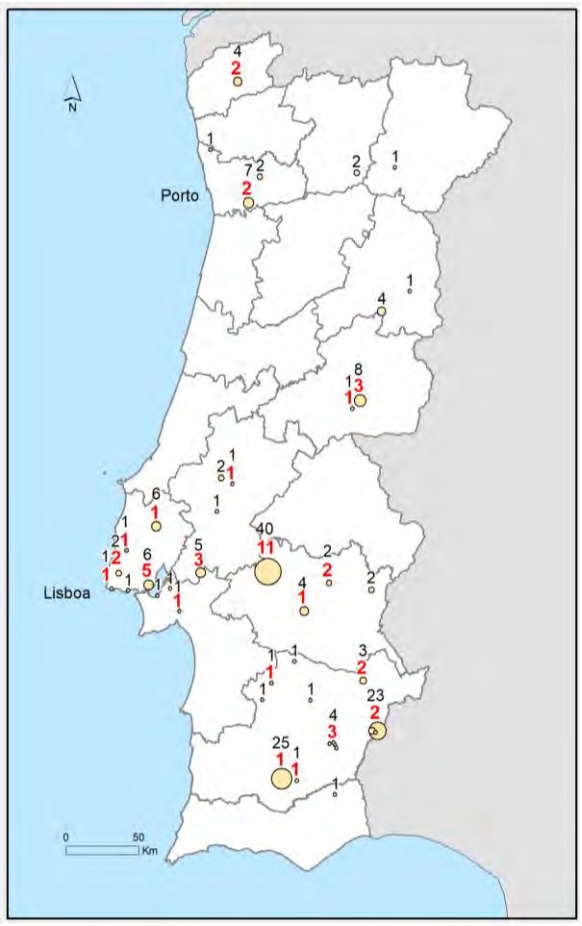


Figura 35. Localização geográfica dos cadáveres de coelho-bravo positivos mixomatose. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege, cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras recolhidas está indicado a preto.

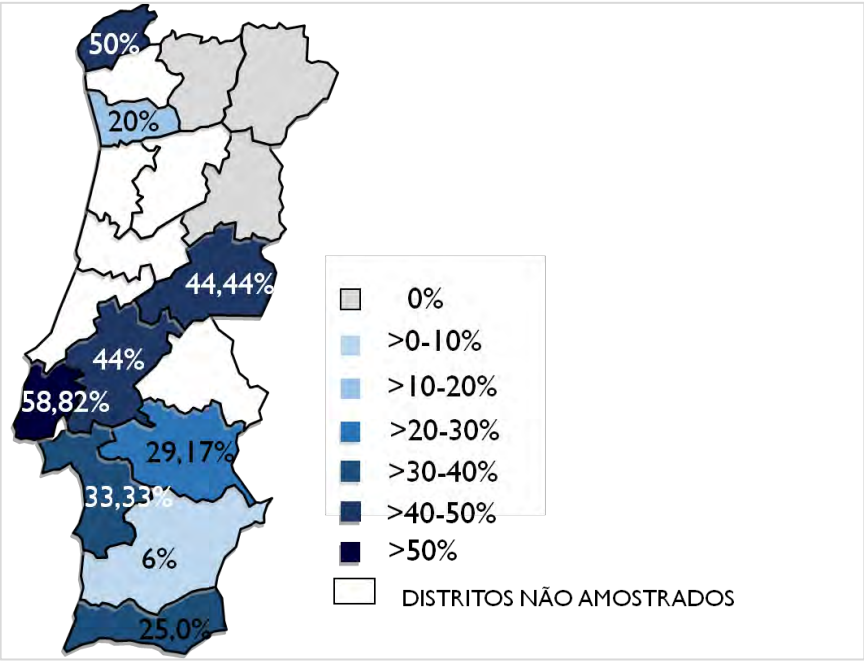


Figura 36. Positividade a mixomatose na amostra de cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito.

Análise temporal da deteção do vírus da mixomatose em cadáveres de coelho-bravo recolhidos no território continental

No que se refere à análise temporal, verificou-se que no 3º trimestre de 2018 foram detetados dois cadáveres positivos ao vírus da mixomatose, um oriundo da ZC n. 5939 (ZCT Moninho) no distrito de Beja, e o outro da ZC nº6531 (ZCT da Pedra da Légua), no distrito de Castelo Branco.

No 4º trimestre de 2018 foram detetados 14 cadáveres positivos a mixomatose, da ZC nº 188 (ZCT Vale de Perditos, n=1) no distrito de Beja, ZC nº 321 (ZCA Herdade do Almarginho e Outras, n=1) no distrito de Beja, na ZC nº 2405 (ZCT Herdade do Monte da Vinha, n=1) no distrito de Beja, ZC nº2561 (ZCM Mouzinho, n=2) no distrito do Porto, da ZC nº5671 (ZCT do Monte de Cima, n=2) no distrito de Évora. Houve 7 cadáveres entregues por particulares, vindos dos distritos de Castelo Branco (n=1), Lisboa (n=5) e Santarém (n=1).

No 1º trimestre de 2019, foram detetados 10 cadáveres positivos a mixomatose. Destes cadáveres três vieram da ZC nº4855 (ZCT Herdade do Infantado) no distrito de Santarém, dois da ZC nº4 (ZCA Herdade Abrunheira, Paço de Aragão e Outras) no distrito de Évora, dois da ZC nº6531 (ZCT da Pedra da Légua) no distrito de Castelo Branco, um da ZC nº314 (ZCA Herdade Corcho, Tacão e Outras) no distrito de Beja, um da ZC nº6894 (ZCT da Herdade da Maruta, Pardieiro e Outras) no distrito de Beja, e um entregue por um particular do distrito de Lisboa.

No 2º trimestre de 2019 foram detetados 2 cadáveres positivos ao vírus, sendo que um foi encontrado na ZC nº622 (ZCT das Cortes) no distrito de Beja, e outro entregue por um particular provindo do distrito de Lisboa.

No 3º trimestre de 2019 foram detetados dois cadáveres positivos a mixomatose, um do proveniente da ZC nº 4 (ZCA Abrunheira, Paço de Aragão e Outras) e outro entregue por um particular, proveniente da região de Lisboa.

No 4º trimestre de 2019 foram detetados 4 cadáveres de coelho-bravo positivos a mixomatose, da ZC nº366 (ZCA Aldeia Gavinha, n=1) no distrito de Lisboa, e três entregues por particulares vindos dos distritos de Évora, Lisboa e Setúbal.

No 1º trimestre de 2020 foram detetados 11 coelhos-bravos positivos ao vírus da mixomatose, oito detetados na ZC nº 4 (ZCA Herdade Abrunheira, Paço de Aragão e Outras) no distrito de Évora, dois detetados na ZC nº 3904 (ZCM Arcos de Valdevez) no distrito de Viana do Castelo, e um cadáver positivo do ZC nº6839 (ZCT da Furada) no distrito de Beja.

No 2º trimestre de 2020 foram detetados dois cadáveres de coelho-bravo positivos a mixomatose, oriundos do distrito de Beja e entregues por particulares.

Desde então, não foram rececionados cadáveres por falta de enquadramento financeiro (**Figura 37**).

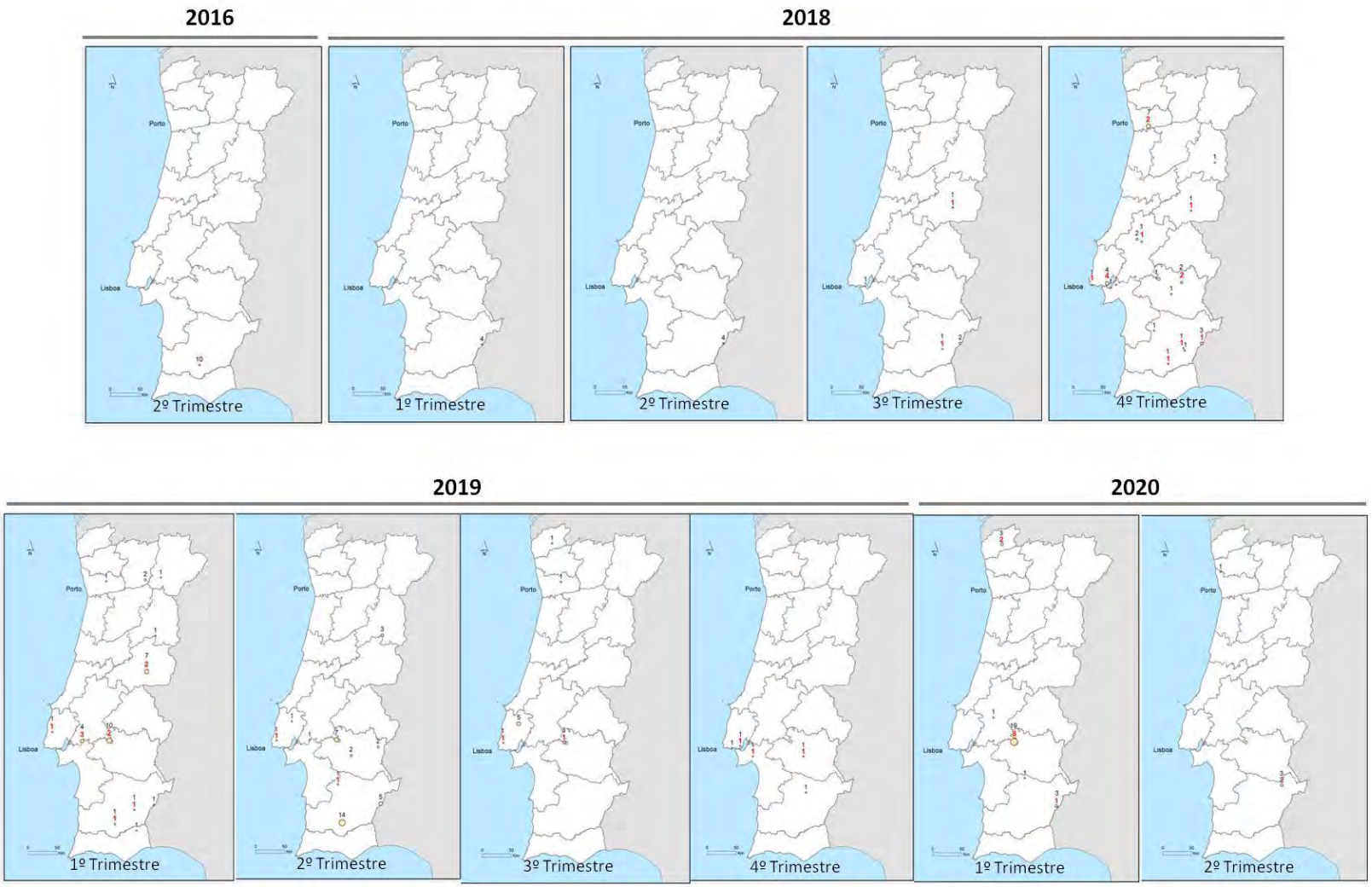


Figura 37. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de coelho-bravo enviados para o INIAV I.P. Alguns animais (n=10), referem-se ao 2º trimestre de 2016. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a mixomatose, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente.

Foi realizada a **pesquisa das estirpes clássicas** (RHDV) na totalidade da amostragem de cadáveres de coelho-bravo recolhidos no campo (n=169) e, tal como verificado no caso dos coelhos-bravos caçados, todos foram negativos para a presença deste vírus.
O **vírus da mixomatose** foi detetado em **1** dos **49** espécimes de **lebre-ibérica** amostradas após **ato venatório** no decurso das épocas cinegéticas 2018/2019 (n=38) e 2019/2020 (n=11), correspondendo a uma positividade na amostra de 2,04% (1/49) em animais caçados. O animal positivo proveio do distrito de Beja, da ZC nº 174 (ZCT Vale Manantio), no concelho de Moura. A amostra foi colhida a 18/12/2019, na EV 19/20, pela OSC ANPC.

Dos **95 cadáveres** de **lebre-ibérica** recolhidos no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, **80** foram positivos para a presença do **vírus da mixomatose**, correspondendo a uma positividade na amostra de 84,21% (80/95).
As lebres positivas foram recolhidas dos distritos de Beja (n=17), Castelo Branco (n=7), Évora (n=20), Faro (n=11), Guarda (n=1), Portalegre (n=6), Santarém (n=3), Setúbal (n=15). A maior positividade na amostra verificou-se no distrito de Faro (91,67%), tendo em vista que do distrito da Guarda apenas foi recolhida uma lebre. (**Tabela 6**, **Figuras 38 e 39**)

Tabela 6. Distritos onde foi detetado o vírus da mixomatose em cadáveres de lebre-ibérica encontrados no campo e respetiva percentagem de positividade na amostra.

Distrito	Nº de animais positivos	Amostragem/ distrito	Percentagem de positivos na amostra/ distrito (%)
Beja	17	23	73,91
Castelo Branco	7	7	100
Évora	20	23	86,96
Faro	11	12	91,67
Guarda	1	1	100
Portalegre	6	8	75
Santarém	3	6	50
Setúbal	15	15	100

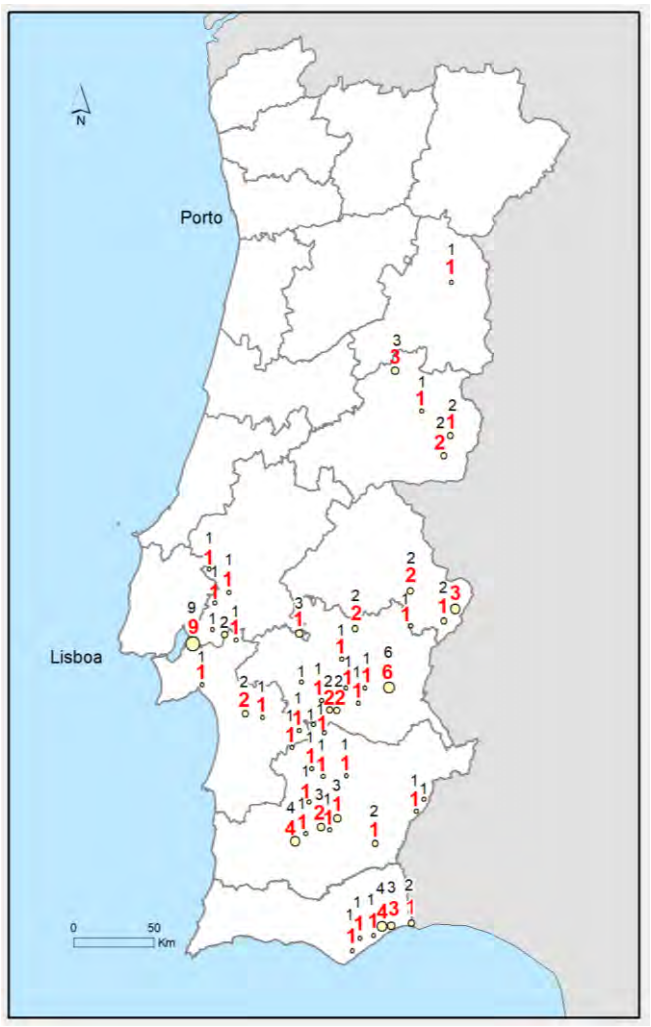


Figura 38. Localização geográfica dos cadáveres de lebre ibérica positivos mixomatose. O número de positivos por zona de caça está indicado a vermelho sobre um círculo bege, cujo diâmetro é proporcional ao tamanho da amostragem. O número de amostras está indicado a preto.

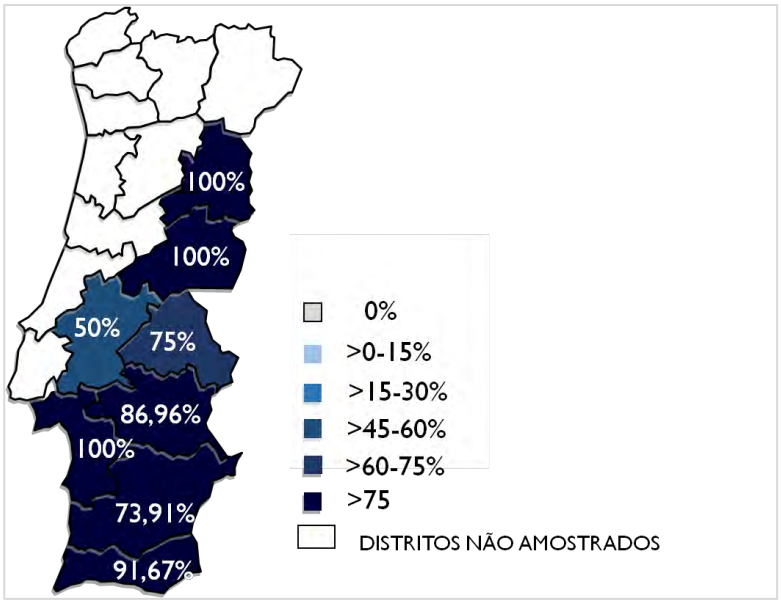


Figura 39. Positividade a mixomatose na amostra de cadáveres de lebre-ibérica encontrados no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito.

Análise temporal da deteção do vírus da mixomatose em cadáveres de lebre-ibérica recolhidos no território continental

No que se refere à análise temporal, verificou-se que no 4º trimestre de 2018 se detetaram 15 cadáveres de lebre-ibérica positivos ao vírus da mixomatose, oriundos da ZC nº 1726 (ZCT Herdade Pães Agua Apariça, n=1) no distrito de Beja, da ZC nº 2400 (ZCA das Solteiras, n=4) no distrito de Faro, da ZC nº3343 (ZCA de Entradas, n=1) no distrito de Beja, da ZC nº4150 (ZCA do Alvisquer, n=2), no distrito de Faro, da ZC nº4202 (ZCA dos Bispos, n=1) no distrito de Beja, da ZC nº5854 (ZCA Herdade da Esteveira, n=1) no distrito de Évora, da ZC nº6392 (ZCA Monte da Barrameira, n=1) no distrito de Beja, da ZC nº6431 (ZCT Vale Gonçalo, n=2) no distrito de Beja, e um do Parque Natural da Ria Formosa no distrito de Faro.

No 1º trimestre de 2019 foram detetados 7 cadáveres positivos a mixomatose. Destes cadáveres, um veio da ZC nº632 (ZCT Herdade da Bala) do distrito de Évora, dois da ZC nº5738 (ZCT Herdade da Batalha) no distrito de Setúbal, um da ZC nº5864 (ZCA de Campo Maior) no distrito de Portalegre, e 3 foram entregues por particulares dos distritos de Santarém (n=1) e Beja (n=2).

No 2º trimestre de 2019 foram detetados 8 cadáveres positivos ao vírus da mixomatose, sendo que todos foram entregues por particulares provindos dos distritos de Setúbal (n=6), Beja (n=1) e de Santarém (n=1).

No 3º trimestre de 2019 foram detetados 14 cadáveres positivos a mixomatose da ZC nº326 (ZCT da Herdade da Barrosinha e Outras, n=1) no distrito de Setúbal, da ZC nº397 (ZCA Herdade Braçal e Outras, n=1) no distrito de Santarém, da ZC nº2761 (ZCM de Santo Tirso, n=1) no distrito de Beja, da ZC nº3855 (ZCM de Pinhel, n=1) no distrito da Guarda, da ZC nº4150 (ZCA do Alvisquer, n=1), da ZC nº4677 (ZCA do Clube Caça e Pesca do Bacelo, n=1) no distrito de Évora, e da ZC nº7000 (ZCT da Herdade da Beguina, n=1) no distrito de Beja. Sete cadáveres positivos ao vírus da mixomatose foram entregues por particulares, vindos dos distritos de Beja (n=1), Faro (n=2) e Setúbal (n=4).

No 4º trimestre de 2019 foram detetados 32 cadáveres positivos a mixomatose, da ZC nº4 (ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras, n=1), da ZC nº 457 (ZCA do Rebocho, n=2) no distrito de Évora, da ZC nº5260 (ZCA da Aramada III, n=2) no distrito de Évora, da ZC nº5265 (ZCA da Aramada II, n=2) no distrito de Évora, da ZC nº5347 (ZCA da Acdoe, n=1), da ZC nº5407 (ZCA da Freguesia de Montoito III, n=6) no distrito de Évora, da ZC nº5864 (ZCA de Campo Maior, n=2) no distrito de Portalegre, da ZC nº6365 (ZCA do Pombal, n=2) no distrito de Portalegre, da ZC nº6396 (ZCT Ribeira da Rata, n=2) no distrito de Castelo Branco, da ZC nº6447 (ZCA Corte Baço, n=1) no distrito de Setúbal, da ZC nº7065 (ZCT da Herdade do Mortal e Outras, n=1) no distrito de Évora e da ZC nº7178 (ZCA dos Vilares, n=1) no distrito de Portalegre. Houve 8 cadáveres entregues por particulares, vindos dos distritos de Castelo Branco (n=3), Portalegre (n=1) e Beja (n=4).

No 1º trimestre de 2020 foram detetados quatro cadáveres de lebre-ibérica positivos a mixomatose da ZC nº2176 (ZCT Granja São Pedro, n=1), da ZC nº2182 (ZCA Aldeia de Santa Margarida, n=1), ambas no distrito de Castelo Branco, da ZC nº3947 (ZCM do Torrão, n=1) no distrito de Setúbal e da ZC nº 6838 (ZCT da Fonte do Pelingroso, n=1).

No 2º trimestre de 2020 não foi detetado nenhum cadáver de lebre ibérica positivo a mixomatose.

Desde então, não foram rececionados cadáveres por falta de enquadramento financeiro (**Figura 40**).

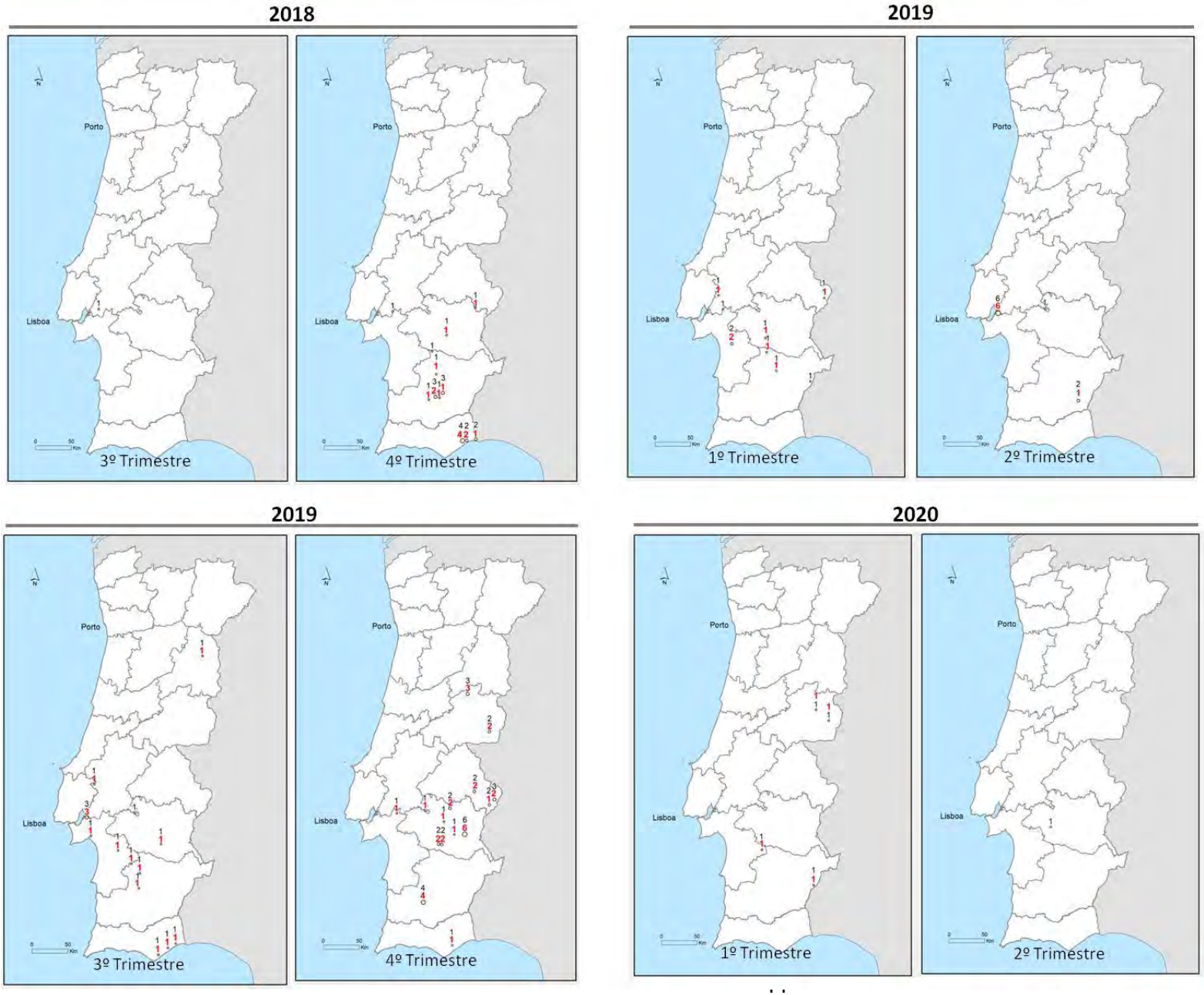


Figura 40. Localização geográfica dos locais onde, entre 1 de setembro de 2018 e 20 de junho de 2020, foram encontrados os cadáveres de lebre-ibérica enviados para o INIAV I.P. Cada mapa corresponde a um trimestre do ano a que se refere. O número total de cadáveres de coelho-bravo encontrado em cada local está indicado a preto sobre um círculo bege cujo diâmetro é proporcional ao número de animais encontrados, sendo que o número de positivos a mixomatose, em cada local, está indicado a vermelho sobre o círculo correspondente.

Em conjunto, os resultados obtidos no primeiro ano do projeto +Coelho permitiram confirmar a distribuição geográfica alargada do RHDV2 e do vírus da mixomatose a todo o território continental (**Tabela 7**, **Figura 41**).

Tabela 7. Tabela 6. Percentagem de positividade a RHDV2 e ao vírus da mixomatose, no total da amostragem recolhida (vigilância ativa e ativa e passiva) entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, por distrito.

		Positivos a RHDV2		Positivos ao vírus da Mixomatose	
Distrito	**Amostragem total/ distrito**	**Nº total de animais positivos**	**Percentagem de positivos na amostra/ distrito (%)**	**Nº total de animais positivos**	**Percentagem de positivos na amostra/ distrito (%)**
Beja	316	30	**9,49**	30	**9,49**
Bragança	6	1	**16,66**	0	**0**
Castelo Branco	47	3	**6,38**	11	**23,40**
Évora	276	35	**12,68**	42	**15,21**
Faro	32	1	**3,13**	11	**34,38**
Guarda	10	3	**30**	1	**10**
Lisboa	17	2	**11,76**	10	**58,82**
Portalegre	8	0	**0**	6	**75**
Porto	33	1	**3,03**	4	**12,12**
Santarém	97	4	**4,12**	10	**10,30**
Setúbal	42	0	**0**	16	**38,09**
Viana do Castelo	11	1	**9,09**	2	**18,18**
Vila Real	2	2	**100**	0	**0**

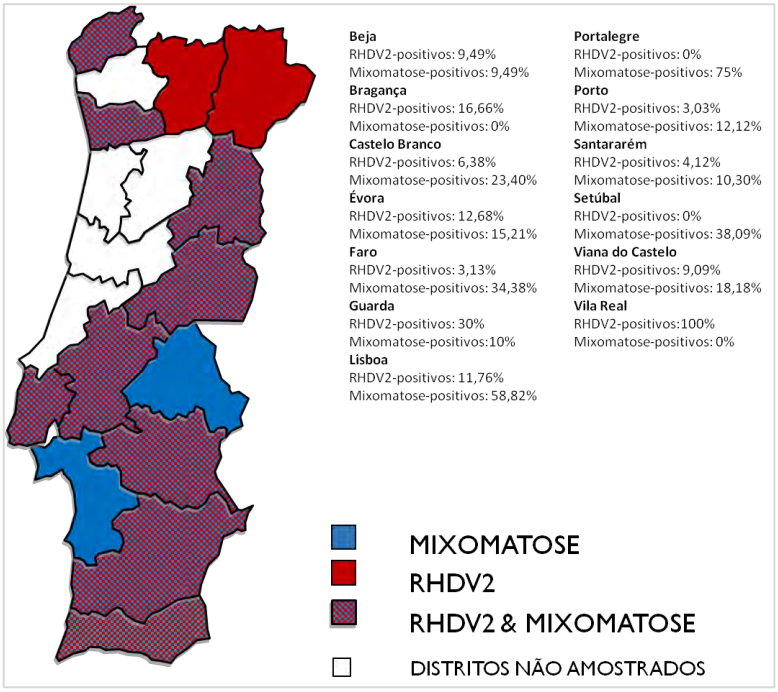


Figura 41. Distribuição do RHDV2 e do vírus da mixomatose em Portugal continental no período entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 de acordo com a amostragem testada. A percentagem de positividade a cada um dos vírus na amostra, por distrito, é indicada na legenda.

Coinfeção pelos vírus da mixomatose e da doença hemorrágica dos coelhos

A sobreposição de áreas geográficas das populações de coelho bravo pelo vírus da mixomatose e pelo RHDV2 foi confirmada no decurso dos Projetos +Coelho 1 e +Coelho 2, sendo de resto um dado há muito conhecido.

No entanto, a coinfeção simultânea do mesmo animal por estes dois vírus foi sempre considerada um evento extremamente raro ou mesmo impossível (Fulford *et al.,* 2011).

No decurso do Projeto +Coelho 2, a equipa do INIAV detetou uma coinfecção por estes vírus num coelho-bravo recolhido em fevereiro de 2019 na ZCA nº4, *Herdade da Abrunheira, Paço de Aragão e Outras*. Este achado foi objeto de publicação em revista internacional. Posteriormente, foram detetados mais oito animais oriundos do mesmo local coinfetados com os dois vírus. Em nenhuma outra localização geográfica foram identificadas coinfecções.

Referências

Fulford GR, Lee XJ, Berman D, et al. Interaction of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease in wild rabbit. 19th international Congress on modelling and simulation, Perth, Australia, 2011.

Avaliação serológica para RHDV2

A avaliação serológica das populações naturais de coelho-bravo enquadra-se no objetivo geral 2. A recolha de amostras para a avaliação serológica das populações decorreu durante as épocas venatórias 2018-2019 e 2019-2020, durante as quais se obteve sangue por colheita intracardíaca ou, em alternativa, da hemorragia presente na cavidade abdominal de animais caçados no ato cinegético. No entanto, fora das épocas venatórias, ou em áreas onde a densidade populacional era baixa, foi possível recolher sangue de animais capturados vivos, fazendo-se assim a vigilância das populações sem diminuição do efetivo populacional. Nestes casos, os animais foram capturados com furão (*Mustela putorius furo*) colocado à entrada das tocas, permitindo a captura com recurso a redes aquando da fuga dos coelhos para o exterior.

Para facilitar a recolha de sangue dos animais, estes foram sedados por via intramuscular, sem recurso a anestesia. O sangue foi colhido da veia jugular externa com uma seringa de 1 mL e transferido para um tubo, tendo-se separado o soro sanguíneo por centrifugação. Os animais foram mantidos em vigilância clínica durante cerca de uma hora, tendo sido posteriormente libertados. Todos estes procedimentos foram efetuados por médicos veterinários ou sob vigilância médico-veterinária.

Para determinar a presença/ausência de anticorpos no soro sanguíneo dos animais foi utilizado o método de ELISA indireta desenvolvido por Bárcena e colaboradores. Resumidamente, partículas virais desprovidas de material genético (virus-like particles, VLPs) do vírus da doença hemorrágica viral, sintetizadas em laboratório, foram ligadas covalentemente aos poços de uma placa de ELISA e incubadas a 4 ºC durante a noite. Em seguida, adicionou-se o soro sanguíneo de leporídeos (coelho-bravo e lebre-ibérica, espécies *Oryctolagus cuniculus* e *Lepus granatensis*, respetivamente). Caso estejam presentes anticorpos específicos para os antigénios das VLPs, ocorre uma ligação VLP/anticorpos. Esta ligação é detetada pela adição de um segundo anticorpo anti-IgG marcado com HRP (horseradish peroxidase), que hidrolisa um substrato, produzindo uma cor típica amarela, cuja intensidade é tanto maior quanto maior for a quantidade de anticorpos presentes no soro. As incubações foram realizadas a 37 ºC durante uma hora. Entre cada incubação, foram efetuadas lavagens com PBS-Tween 0,05% para remoção de anticorpo não ligado, pelo que apenas se produziu cor na presença de anticorpos específicos para o vírus da DHV no soro. A densidade ótica foi depois medida a um comprimento de onda de 450 nm. As amostras foram consideradas positivas quando o valor de densidade ótica obtido foi igual ou superior a 0,2 unidades acima do valor de densidade ótica do controlo negativo. Para determinar o título das amostras positivas foi usado o mesmo protocolo, tendo-se apenas feito diluições sucessivas dos soros (1:2, iniciando em 1:50).

Para este trabalho, foram recolhidas e analisadas 460 amostras de coelho-bravo, 88 amostras de lebre-ibérica e 2 amostras cuja identificação da espécie não foi possível, num total de 550 amostras. As amostras recolhidas abrangem todo o território de Portugal continental (**Figura 42 A** e **B**).

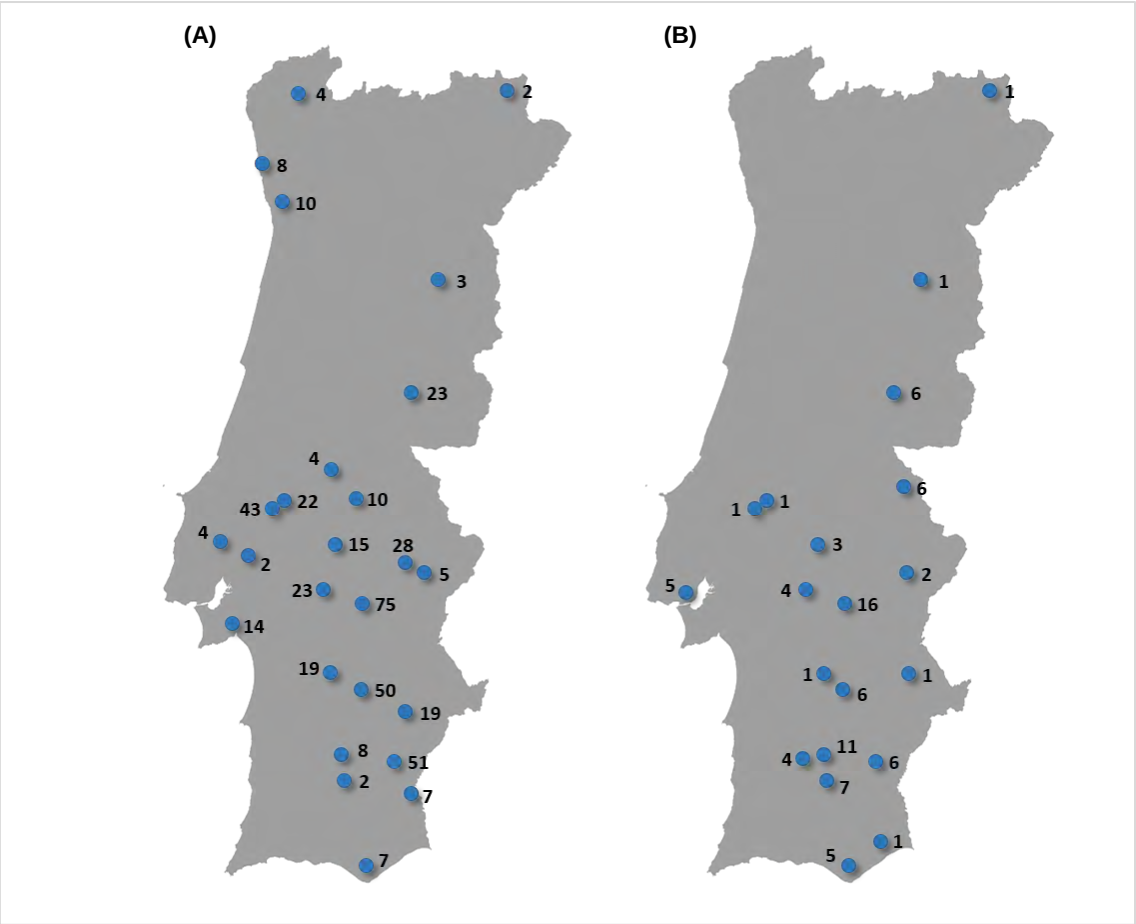


Figura 42. Mapa de Portugal continental com (**A**) número de soros de coelho-bravo analisados por localidade amostrada, (**B**) número de soros de lebre-ibérica analisados por localidade amostrada.

Das 460 amostras analisadas, 161 amostras de coelho-bravo revelaram-se positivas para a presença de anticorpos desenvolvidos especificamente contra lagovírus, correspondendo a 35% do total de amostras de coelho-bravo analisadas. Na Figura 16a apresenta-se a percentagem de resultados positivos por área de amostragem. Da análise da Figura verifica-se que as populações que se situam na região centro-sul de Portugal continental apresentam uma maior percentagem de animais a desenvolver uma resposta imunitária, tal como já havia sido verificado para a época venatória 2017-2018. A percentagem global de indivíduos com anticorpos específicos contra lagovírus aumentou ligeiramente em relação à análise anterior, passando de 32% para 35%.

Relativamente à lebre-ibérica, 12 amostras foram consideradas positivas para a presença de anticorpos anti-lagovírus, correspondendo a 14% do total de amostras de lebre analisadas, o que representa uma diminuição significativa em relação à época venatória 2017-2018 (27%). A **Figura 43 B** mostra o padrão de seropositividade da lebre-ibérica por local de amostragem, na qual se regista um padrão semelhante ao de coelho-bravo (**Figura 43 A**), com a zona sul de Portugal continental a mostrar maior número de animais positivos, apesar da baixa amostragem comparativamente à de coelho-bravo.

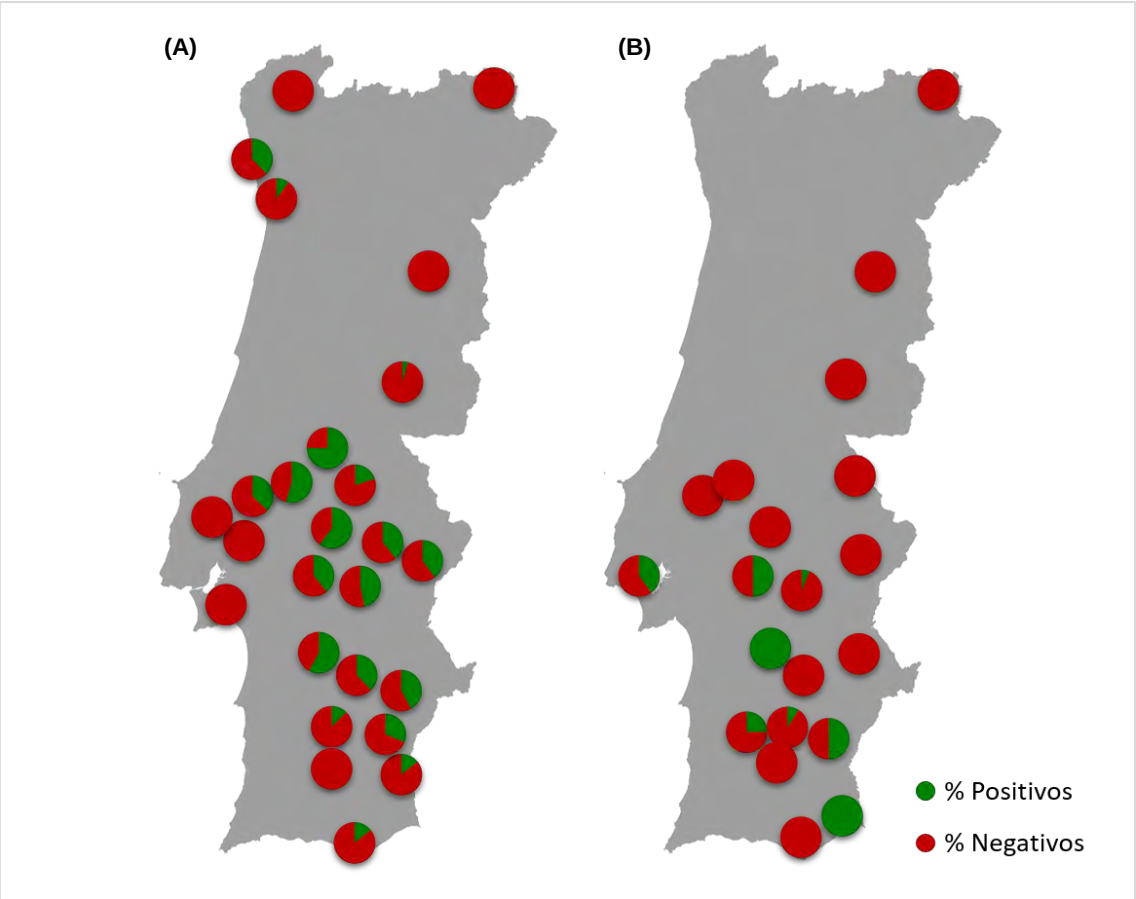


Figura 43. Mapa de Portugal continental com a percentagem de soros positivos/negativos por localidade para (**A**) coelho-bravo e (**B**) lebre-ibérica.

Os dados serológicos permitem determinar se um animal esteve em contacto com o vírus e adquiriu resistência. Para se considerar que uma população está protegida, é necessário que cerca de 85% dos indivíduos sejam seropositivos. Assim, conclui-se que para ambas as espécies de lagomorfos presentes em Portugal (coelho-bravo e lebre-ibérica), nenhuma das populações analisadas está protegida contra o vírus da doença hemorrágica viral.

A titulação das amostras permitiu ainda fazer uma avaliação da magnitude da resposta individual. Assim, quanto maior o título, maior a quantidade de anticorpos contra lagovírus presentes nesse indivíduo. Para coelho-bravo, a maioria dos animais seropositivos apresenta um título entre 1:200 e 1:800 (**Figura 44**), sendo o título mais elevado de 1:12800, embora em apenas um animal. Para lebre-ibérica, verifica-se que o título mais elevado é de 1:800 e o título de anticorpos para a maioria dos animais seropositivos é de 1:400 (**Figura 44**). É de realçar que a quantidade de anticorpos presentes num indivíduo pode diminuir ao longo do tempo, pelo que neste caso o título obtido será influenciado pelo tempo decorrido entre a infeção e o teste serológico.

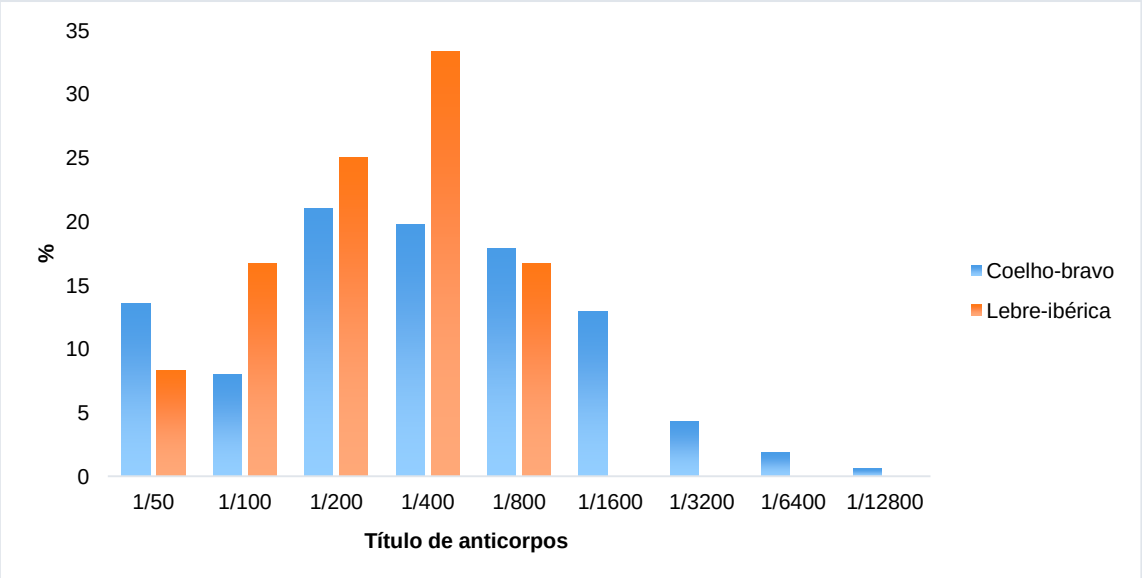


Figura 44. Distribuição dos títulos de anticorpos (em %) para coelho-bravo e lebre ibérica. Eixo dos xx: título de anticorpos obtido através da técnica de ELISA para animais considerados inicialmente positivos por ELISA indireta. Eixo dos yy: proporção d desses animais que apresentam determinado título.

Adicionalmente, a médio/longo prazo, a vigilância serológica das populações contribuirá para a identificação de marcadores genéticos de resistência à infeção por GI.2 através de estudos genómicos. Isto vai de encontro à medida 1.2. (M 1.2. "Identificação de marcadores de resistência no coelho-bravo à doença hemorrágica viral").

Resultados Anatomopatológicos

Nos animais submetidos a **exame anatomopatológico** foi feito registo da **condição corporal** em 169 **coelhos-bravos** e em 83 (de um total de 95) **lebres-ibéricas**. A condição corporal dos animais foi, na maioria dos casos, média (respetivamente 37,28% e 57,83) (**Tabelas 8 e 9**). Dos coelhos-bravo positivos a RHDV2, 35,8% apresentavam uma boa condição corporal e 39,51% uma condição corporal média, evidenciando que a morte dos animais aconteceu geralmente de forma rápida, não permitindo tempo de vida suficiente para a deterioração da condição corporal, o que é característico de formas de doença aguda. A maior percentagem de animais positivos a mixomatose (46,81% no caso do coelho-bravo e 48,78 na lebre-ibérica), apresentava condição corporal média, evidenciando quadros agudos.

Tabela 8. Condição corporal dos cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

			Animais Positivos a RHDV2		**Animais Positivos a Mixomatose**	
Condição corporal	**Nº de animais**	**Percentagem de animais com determinada condição corporal (%)**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**
Boa	60	35,50	29	35,80	9	19,15
Média	63	37,28	32	39,51	22	46,81
Fraca	46	27,22	20	24,69	16	34,04

Tabela 9. Condição corporal dos cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Animais Positivos a Mixomatose	
Condição corporal	**Nº de animais**	**Percentagem de animais com determinada condição corporal (%)**	**Nº**	**(%)**
Boa	25	30,12	24	30,49
Média	48	57,83	40	48,78
Fraca	10	12,05	9	10,98

Nos exames anatomopatológicos efetuados no segundo ano do projeto foram observadas lesões sugestivas de processos infeciosos, parasitários e traumáticos. Neste relatório foram incluídas apenas as mais relevantes.

Dado o reduzido número de animais exibindo cada uma das diferentes lesões identificadas, a associação entre determinada lesão e a positividade a RHDV2 ou a mixomatose é pouco robusta.

Nos 169 **cadáveres de coelho-bravo** analisados, foi observado um total de 12 **traumatismos** ósseos recentes (fratura das costelas, fraturas do crânio, fratura de coluna, fratura da bacia) e dos tecidos moles. Verificou-se que 3 animais que apresentavam traumatismos ósseos e de tecidos moles foram positivos a RHDV2 e 4 animais com traumatismos ósseos testaram positivamente a mixomatose (**Tabela 10**). Relativamente aos 95 **cadáveres de lebre-ibérica,** observaram-se 26 **traumatismos**, maioritariamente ósseos, e em um animal foi detetada a presença de projéteis (**Tabela 11**). O facto de existir uma percentagem significativa de coelhos-bravos com registo de traumatismos positivos a RHDV2 (40%) e de lebre positivas a mixomatose (80,95%) sugere que os animais doentes podem ser alvos mais fáceis de predadores e estar mais sujeitos a outros tipos de trauma, como por exemplo por atropelamento, pelo facto da doença perturbar a orientação e o norma comportamento dos animais.

Tabela 10. Traumatismos observados nos cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais Positivos a RHDV2		Animais Positivos a Mixomatose	
Traumatismos	**Nº total de animais**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**
Ósseos	10	1	10	4	40
Tecidos moles	2	2	100	0	0

Tabela 11. Traumatismos observados nos cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose.

		Animais Positivos a Mixomatose	
Traumatismos	**Nº total de animais**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**
Ósseos	21	17	80,95
Tecidos moles	4	2	50,00
Presença de projeteis	1	1	100

Nos 169 cadáveres de coelho-bravo necropsiados, foram observadas 6 tipos distintos de **alterações intestinais** incluindo enterites com conteúdo líquido, mucoso, pastoso ou parasitário, vacuidade gástrica e presença de coágulos sanguíneos. No caso do coelho-bravo, a lesão intestinal mais frequentemente observada foi a enterite com conteúdo líquido, mucoso, pastoso ou parasitário. Algumas destas lesões foram observadas em animais positivos a RHDV2 e a mixomatose (**Tabela 12**).

Nos 95 cadáveres de lebre, apenas se observaram 3 quadros de alterações intestinais sendo que apenas um animal foi positivo para a mixomatose (**Tabela 13**).

Tabela 12. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Lesões intestinais	**Nº total de animais**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**
Coágulos sanguíneos	1	0	0	1	100
Enterite com conteúdo líquido/mucoso/pastoso/ parasitário	8	2	25	2	25
Vacuidade gástrica/GI	4	0	0	4	100

Tabela 13. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose**.**

		Animais positivos a Mixomatose	
Lesões intestinais	**Nº total de animais**	**Nº**	**(%)**
Distenção do cólon	1	0	0
Vacuidade gástrica/ conteúdo reduzido	1	0	0
Ruptura do Cêco	1	1	100

O **sangramento pelos orifícios naturais**, nomeadamente a presença de sangue nas fossas nasais e região perinasal, foi observado em 73 dos 169 (43,19%) cadáveres de coelho-bravo necropsiados, dos quais 73,97% (54/73) foram positivos a RHDV2 (**Tabela 14**). Estes dados sugerem que a *epistaxis* é um sinal clínico frequente mas não patognomónico de DHV.

Relativamente aos cadáveres de **lebre-ibérica** a presença de sangue na região nasal/perinasal, peribucal, perineal/genital e pavilhão auricular foi registada 23 vezes (**Tabela 15**). Um grande número de lebres apresentando sangramento pelos orifícios naturais, sobretudo na região nasal/perinasal e na região perineal/genital foi positivo a mixomatose. As regiões anatómicas mencionadas encontram-se frequentemente afetadas na mixomatose.

Tabela 14. Número de **coelhos-bravos** em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais Positivos a RHDV2		Animais Positivos a Mixomatose	
Sangramento pelos orifícios naturais	**Nº total de animais**	**Nº Com sangramento**	**(%) Com sangramento**	**Nº Com sangramento**	**(%) Com sangramento**
Região nasal/perinasal	73	54	73,97	10	13,70

Tabela 15. Número de **lebres-ibéricas**, em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a mixomatose.

		Animais Positivos a Mixomatose	
Sangramento pelos orifícios naturais	**Nº total de animais**	**Nº Com sangramento**	**(%) Com sangramento**
Região nasal/perinasal	16	12	75
Região peribucal	1	0	0
Região perineal/genital	5	4	80
Região do pavilhão auricular	1	1	100

Foram observadas **lesões pulmonares hemorrágica, congestivas ou congestivo-hemorrágicas** em coelho-bravo e em lebre-ibérica **(Tabela 16, Tabela 17)**, sendo as lesões congestivas as mais frequentes, quer em coelho-bravo quer em lebre-ibérica.
Uma grande percentagem de coelhos-bravos apresentando lesões pulmonares congestivas e/ou hemorrágicas foram positivos a RHDV2, evidenciando que estas são lesões frequentemente observadas na DHV.

No que toca à lebre-ibérica, também uma percentagem muito significativa de animais apresentando lesões congestivas e/ou hemorrágicas foram positivas a mixomatose.O pulmão foi o órgão mais afetado.

Tabela 16. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e mixomatose.

		Animais Positivos a RHDV2		Animais Positivos a Mixomatose	
Lesões pulmonares	**Nº total de animais**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**
Congestivas	102	60	58,82	23	22,55
Congestivo-hemorrágicas	13	11	84,62	3	23,08
Hemorrágicas	7	3	42,86	2	28,57

Tabela 17. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose.

		Animais Positivos a Mixomatose	
Lesões pulmonares	**Nº total de animais**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**
Congestivas	36	31	91,18
Congestivo-hemorrágicas	5	5	83,33
Hemorrágicas	7	5	71,43
Laceração pulmonar	3	1	33,33
Pontuado esbranquiçado	1	1	100

Quadros hemorrágicos mais **generalizados** (hemorragias internas, presença de coágulo sanguíneo aderente ao lobo pulmonar, hemopericárdio, hemorragias pulmonares, intracranianas, renais e no epicárdio, hemotórax, hemo-abdómen, hemoperitoneu, presença de liquido sanguinolento na cavidade torácica e abdominal e urina sanguinolenta) foram também observados nos cadáveres de coelho-bravo mortos (n=16) e nos cadáveres de lebre-ibérica (n=47) (**Tabela 18** e **Tabela 19**).

Apesar dos quadros hemorrágicos mais generalizados serem frequentemente observados em animais com DHV, essa relação não se espelha nos dados analisados.

No caso dos coelhos-bravos e lebres-ibéricas apresentando lesões hemorrágicas mais generalizadas, uma percentagem significativa foi positiva a mixomatose podendo, tal como acontece com a presença de traumatismos, sugerir lesões traumáticas relacionadas com a maior susceptibilidade dos animais doentes à ação de predadores ou outros traumas. Por outro lado, as lesões observadas podem relacionar-se com potenciais infeções secundárias por outros agentes, em resultado da imunossupressão causada pelo vírus da mixomatose.

Tabela 18. Número de **coelhos-bravos** em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados na necrópsia e sua relação com a positividade a mixomatose e a RHDV2.

		Animais Positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões	Nº Com lesões	(%) Com lesão
Hemotoráx	1	0	0	0	0
Hemoabdómen	9	1	11,11	4	44,44
Hemorragias na parede costal/ subcutâneas	2	1	50	1	50
Hemorragias/congestão dos órgãos internos/peri-renais	4	1	25	2	50

Tabela 19. Número de **lebres-ibéricas** em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados na necrópsia e sua relação com a positividade a mixomatose e a RHDV2.

		Animais positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesão
Hemotoráx	38	34	89,47
Hemoabdómen	2	2	100
Hemoperitoneu	2	2	100
Hemorragias/congestão dos órgãos internos	3	3	100
Hemorragia intracraniana	1	1	100
Hemorragia do epicárdio	1	0	0

Nos 169 cadáveres de coelho-bravo foram registados 80 quadros de **alterações hepáticas** (**Tabela 20**), sendo a alteração mais frequentemente observada a de descoloração hepática. Uma percentagem muito elevada de coelhos-bravos com descoloração hepática testou positivamente a RHDV2 (74,03%), evidenciando que esta alteração hepática é um sinal muito comum na DHV.

Nos 95 cadáveres de lebre, registaram-se 12 quadros de alterações hepáticas. Embora um número reduzido de lebres tenha apresentado alterações hepáticas, as lesões mais frequentemente registadas foram a congestão hepática e a descoloração hepática (**Tabela 21**).

Tabela 20. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **coelho-bravo** e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais Positivos a RHDV2		Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Descoloração hepática	77	57	74,03	8	10,39
Lacerações	2	1	50	0	0
Pontuado/ nódulos esbranquiçados	1	1	100	1	100

Tabela 21. Lesões hepáticas e esplénicas observadas ao exame anatomopatológico em cadáveres de **lebre-ibérica** e sua relação com a positividade a mixomatose.

		Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Congestão	5	5	100
Descoloração hepática	3	2	66,67
Lacerações	2	1	50
Substituição do parênquima por parasitas	1	1	100
Esplenomegália	1	0	0

Na forma nodular de mixomatose, são frequentemente observados **edemas** e **lesões nodulares** nas orelhas e nas regiões periocular, perivulvar, perioral e perinasal. Nos cadáveres de coelho-bravo analisados, uma percentagem muito elevada de animais com edemas e/ou espessamentos testaram positivamente a mixomatose, evidenciando que este tipo de lesões são muito frequentes na mixomatose (**Tabela 22**). O mesmo foi observado no que toca à lebre-ibérica, na qual a mixomatose causa um quadro sintomatológico muito semelhante ao observado no coelho-bravo (**Tabela 23**).

Tabela 22. Número de coelhos-bravos em que se observaram edemas e espessamentos nodulares e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

	Animais Positivos a RHDV2			Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Edema dos lábios, nariz e pálpebras/Blefarite	13	0	100	12	92,31
Edema da genitália externa/ânus	16	0	0	16	100
Edema pulmonar	1	0	0	1	100
Espessamentos nodulares lábios, nariz, pálpebras	12	1	8,33	12	100
Espessamentos nodulares pavilhões auriculares	5	1	20	3	75
Espessamento região intermandibular	1	0	0	1	100
Espessamentos nodulares genitália	5	1	20	5	100

Tabela 23. Número de lebre-ibéricas em que se observaram edemas e espessamentos nodulares e relação destas lesões com a positividade a mixomatose.

		Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Edema dos lábios, nariz e pálpebras/Blefarite	33	32	96,97
Edema da genitália externa/anûs	35	34	97,14
Espessamentos nodulares focinho/lábios, nariz, pálpebras	34	33	97,06
Espessamentos nodulares região perineal/genitália	18	16	88,89

Foram também registadas lesões externas, incluindo lesões na pele, em cadáveres de coelho-bravo (**Tabela 24**) e de lebre (**Tabela 25**). A lesão externa mais frequentemente observada no coelho-bravo e na lebre foi a presença de exsudado purulento ou muco-purulento nas pálpebras ou olhos.

Tabela 24. Número de coelhos-bravos em que se observaram lesões externas, incluindo lesões de pele, e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

	Animais Positivos a RHDV2			Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Alopécia	1	0	0	1	100
Conspurcação do pêlo	1	1	100	0	0
Exsudado purulento/ muco-purulento pálpebras/olhos	6	0	0	6	100
Lesões erosivas pele	1	0	0	0	0
Lesões erosivas comissuras oculares	1	0	0	0	0

Tabela 25. Número de lebres-ibéricas em que se observaram lesões externas, incluindo lesões de pele, e relação destas lesões com a positividade a mixomatose.

	Animais Positivos a Mixomatose		
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Alopécia	3	1	33,33
Ausência pele	2	0	0
Conspurcação do pêlo	1	1	100
Espessamento/congestão do pénis/dos tecidos envolventes do pénis	2	1	50
Exsudado purulento/mucopurulento conjuntiva/olhos/ pálpebra	12	12	100
Exsudado purulento/mucopurulento pénis	3	3	100
Feridas/úlceras nos lábios	1	1	100
Lacerações	2	0	0
Lesões crustosas pálpebras/ nariz	3	3	100
Lesões crustosas região perineal/ genitália	5	5	100
Lesões erosivas/ulcerativas lábios	1	1	100
Lesões purulentas extensas na cabeça	1	0	0
Soluções de continuidade	3	3	100

Foram também registadas outras lesões/ alterações em cadáveres de coelho-bravo (Tabela 26) e de lebre, as quais se elencam respetivamente nas **Tabelas 26** e **27**.

Tabela 26. Número de coelhos-bravos em que se observaram outras lesões/alterações e relação destas lesões com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

	Animais Positivos a RHDV2			Animais Positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Abcessos na parede da cavidade abdominal	1	0	0	0	0
Atrofia dos órgãos internos	1	0	0	0	0
Congestão dos órgãos	3	2	66,67	0	0
Emanciação	1	0	0	1	100
Hemorragia subcutânea cervical ou nas paredes costal/abdominal	9	3	33,33	1	14,29
Perfuração dos músculos intercostais	1	0	0	0	0
Piómetra	1	0	0	0	0
Sobrecrescimento e má coaptação dos incisivos	1	0	0	0	0

Tabela 27. Número de lebres-ibéricas em que se observaram outras lesões/alterações e relação destas lesões com a positividade a mixomatose.

	Animais Positivos a Mixomatose		
	Nº total de animais	Nº Com lesões	(%) Com lesões
Aderência dos testículos à bolsa escrotal	1	1	100
Bexiga c/ urina sanguinolenta	1	0	0
Congestão da mucosa/órgãos internos	5	0	0
Dilatação dos cornos uterinos	1	0	0
Hematoma subcutâneo na parede abdominal/região cervical	2	0	0
Hemorragia musculatura membros/região lombo-aórtica/parede abdominal	8	3	37,5
Hemorragia subcutânea parede costal/membros/região ventral	15	14	93,33
Hemorragia testicular c/ edema sero-fibrinoso na albugínea	1	1	100
Obliteração do lume da traqueia por sangue coagulado	1	1	100
Laceração do escroto/prepúcio	1	1	100
Cianose ligeira mucosa nasal/oral/pavilhões auriculares	1	1	100
Perfuração nos pavilhões auriculares	1	1	100
Fibrossarcoma	1	1	100

Resultados Bacteriológicos

Cerca de 94% (159/160) dos cadáveres de **coelho-bravo** rececionados no INIAV I.P. foram submetidos a **exame bacteriológico.** Em 36,48% (n=58) isolaram-se bactérias patogénicas com potencial zoonótico, pertencentes a 24 espécies diferentes, embora não tenham sido isoladas bactérias em aerobiose na grande maioria dos cadáveres (63,52%, n=101). A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi a que apresentou maior positividade na amostra (36,21%, n=21), seguida por *Ralstonia pickettii* com uma percentagem de positividade na amostra mais baixa (12,07%, n=7), os *Staphylococcus aureus* e *xylosus* (representando cada um destes agentes 8,62% das amostras positivas). O *Vibrio parahaemolyticus* representa 5,2% dos isolamentos e o *Enterobacter amnigenus* e o *Staphylococcus sciuri* representam, cada um, 3,5%. As restantes bactérias foram isoladas em menos de 1,72% da amostragem, não sendo por isso, aparentemente, um fator de impacto significativo na saúde das populações de coelho-bravo analisadas. **[Tabela 28 Figura 45]**.

Quatro coelhos-bravos apresentaram infeções mistas, nomeadamente *E. coli* associada a *Proyeus vulgaris* (n=1) e a *Pasteurela multocida* (n=1), *Enterobacter amnigenus* em simultâneo com *Staphylococcus sciuri* (n=1) e *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus* em simultâneo num só animal.

Vince e cinco coelhos-bravos foram simultaneamente positivos no exame bacteriológico e num ou em ambos os exames virológicos. Seis animais foram simultaneamente positivos para *E. coli*, RHDV2 e Mixomatose, um animal foi positivo para *Enterobacter amnigenus*, RHDV2 e Mixomatose, um animal positivo para *Pantoea spp.*, RHDV2 e Mixomatose, um animal positivo para *Serratia proteamaculans*, RHDV2 e Mixomatose, um animal positivo para *Staphylococcus sciuri*, RHDV2 e Mixomatose e um animal positivo para *Vibrio parahaemolyticus*, RHDV2 e Mixomatose. Sete animais foram simultaneamente positivos para *Ralstonia pickettii* e RHDV2 e, destes, 4 foram também positivos para Mixomatose. Quatro animais foram simultaneamente positivos para *Staphylococcus xylosus* e RHDV2 e destes um foi também positivo a Mixomatose. Em três animais positivos para RHDV2 foram isolados, respetivamente *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae* e *Weeksella virosa*. Em cinco animais positivos para Mixomatose foram também isolados agentes bacterianos, respetivamente, *Bordetella bronchiseptica*, *Morganella morganii*, *Pasteurella pneumotropica*, *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus hyicus*. Em três animais positivos para mixomatose foi isolada a bactéria *Staphylococcus aureus*. Estas infeções poderão ter sido secundárias à infeção viral

Relativamente à vigilância sanitária em **lebre-ibérica**, 96,84% (92/95) dos cadáveres rececionados foram submetidos a exame bacteriológico. Em 51,09% destes (n=47), isolaram-se bactérias patogénicas pertencentes a 19 espécies diferentes com potencial zoonótico, podendo constituir um risco para a Saúde pública, quer por contacto directo quer por ingestão de carne de caça. Também no caso das lebres, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi a que apresentou maior positividade na amostra (38,29%, n=18), seguida por *Staphylococcus xylosus* (17,02%, n=8). Staphylococcus xylosus (17%) e Staphylococcus aureus (8,5%). Cada um dos agentes Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp., Staphylococcus haemolyticus e Staphylococcus warneri foram isolados em 4,3% dos cadáveres de lebre examinados. As restantes bactérias foram isoladas em menos de 2,1% da amostragem, não sendo por isso, aparentemente, um fator de impacto significativo na saúde das populações de lebre analisadas.

Cinco lebres-ibéricas apresentaram infeções mistas, nomeadamente *E. coli* associada a *Salmonella spp.* (n=1), a *Staphylococcus aureus* (n=1), e a *Serratia marcescens* (n=1), e *Staphylococcus xylosus* associado a *Enterobacter amnigenus (n=1) e a Serrratia odorifera* (n=1).

Cerca de metade (n=40) dos cadáveres de lebre-ibérica a partir dos quais foram isoladas as bactérias patogénicas testaram positivamente ao vírus da mixomatose. Em treze cadáveres de lebre positivos para a Mixomatose foi isolada *E. coli*, em sete foi isolado *Staphylococcus xylosus* e em três *Staphylococcus aureus*. Em seis cadáveres de lebre positivos para Mixomatose foram isoladas *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Staphylococcus haemolyticus* (n=2) e *Staphylococcus warneri* (n=2). Cada uma das bactérias *Alcaligenes faecalis, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae ssp. Pneumoniae, Pseudomonas flourescens, Ralstonia pickettii, Serratia marcescens, Serrratia odorífera, Staphylococus hyicus* e *Streptococcus parasanguinis* foi isolada de um cadáver de lebre positivo para a Mixomatose. **[Tabela 28, Figura 46]**.

Tabela 28. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de leporídeos silvestres e respetiva percentagem de positividade na amostra.

	Espécie isolada	Potencial zoonótico	Patogenicidade	Nº de animais c/isolamento	% de isolamentos nas amostras positivas	Nº animais positivos a RHDV2	Nº animais positivos a mixomatose
COELHO BRAVO (n=159)	*Bacillus cereus*	✓	Dependente do serótipo (potencialmente zoonótico)	1	1,72	0	0
	Bordetella bronchiseptica	✓	Ligeiro	1	1,72	0	1
	E.coli	✓	Dependente do serótipo	21	36,21	6	6
	Enterobacter amnigenus	✓	Pouco esclarecido	2	3,45	1	1
	Enterobacter cloacae	✓	Elevada em imunocomprometidos	1	1,72	0	0
	Enterococcus durans	✓	Ligeiro	1	1,72	0	0
	Hafnia alvei	✓	Oportunista	1	1,72	1	0
	Klebsiella pneumoniae ozaenae	✓	Elevada	1	1,72	1	0
	Morganella morganii	✓	Oportunista	1	1,72	0	1
	Pantoea spp.	✓	Oportunista	1	1,72	1	1
	Pasteurella multocida	✓	Elevada	1	1,72	0	0
	Pasteurella pneumotropica	✓	Oportunista	1	1,72	0	1
	Proteus vulgaris	✓	Oportunista	1	1,72	0	0
	Ralstonia pickettii	✓	Ligeira	7	12,07	7	4
	Salmonella spp.	✓	Dependente do serótipo	1	1,72	0	0
	Serratia marcescens	✓	Oportunista	1	1,72	0	0
	Serratia proteamaculans	✓	Oportunista	1	1,72	1	1
	Staphylococcus aureus	✓	Ligeira a severa	5	8,62	0	3
	Staphylococcus equorum	✓	Oportunista	1	1,72	0	1
	Staphylococcus hyicus	✓	Dependente do serótipo	1	1,72	0	1
	Staphylococcus sciuri	✓	Elevada	2	3,45	1	1
	Staphylococcus xylosus	✓	Ligeira	5	8,62	4	2

	Vibrio parahaemolyticus	✓	Elevada	3	5,17	1	1
	Weeksella virosa	✓	Elevada (rara)	1	1,72	1	0
LEBRE (n=92)	*Alcaligenes faecalis*	✓	Ligeira	1	2,13	0	1
	E. coli	✓	Dependente do serótipo	18	38,29	0	13
	Enterobacter amnigenus	✓	Pouco esclarecido	1	2,13	0	0
	Enterobacter cloacae	✓	Elevada em imunocomprometidos	2	4,26	0	1
	Enterococcus faecalis	✓	Oportunista	2	4,26	0	1
	Enterococcus faecium	✓	Oportunista	1	2,13	0	1
	Klebsiella pneumoniae ssp. Pneumoniae	✓	Elevada	1	2,13	0	1
	Pseudomonas aeruginosa	✓	Elevada em imunocomprometidos	2	4,26	0	2
	Pseudomonas flourescens	✓	Ligeira	1	2,13	0	1
	Ralstonia pickettii	✓	Ligeira	1	2,13	0	1
	Salmonella spp.	✓	Dependente do serótipo	2	4,26	0	0
	Serratia marcescens	✓	Oportunista	1	2,13	0	1
	Serrratia odorifera	✓	Elevada	1	2,13	0	1
	Staphylococcus aureus	✓	Ligeira a severa	4	8,51	0	3
	Staphylococcus haemolyticus	✓	Ligeira	2	4,26	0	2
	Staphylococcus warneri	✓	Infeções raras (imunocomprometidos)	2	4,26	0	2
	Staphylococcus xylosus	✓	Ligeira	8	17,02	0	7
	Staphylococus hyicus	✓	Dependente do serótipo	1	2,13	0	1
	Streptococcus parasanguinis	✓	Pouco esclarecido	1	2,13	0	1

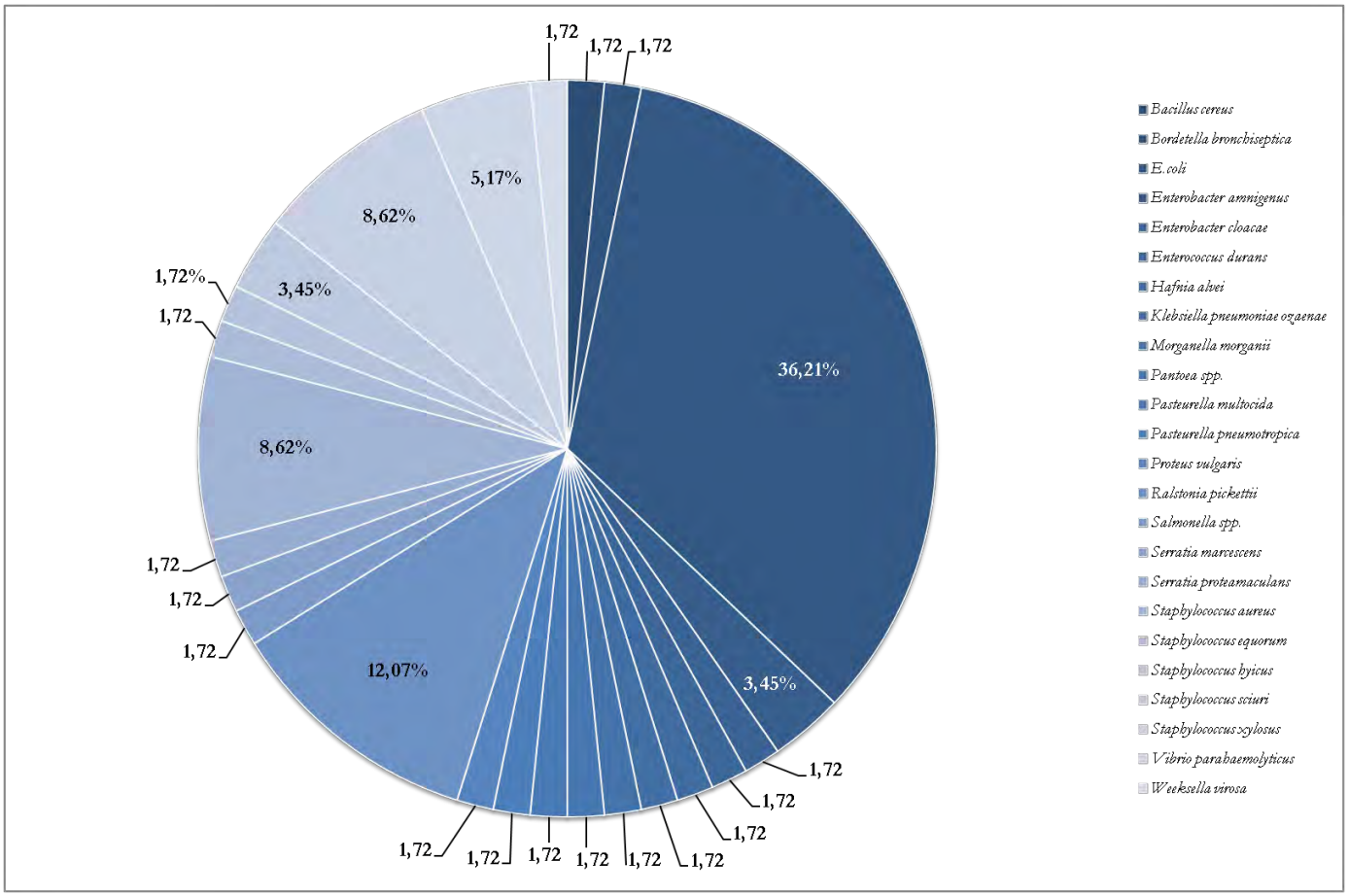


Figura 45. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de coelho-bravo encontrados mortos e respetiva positividade amostral.

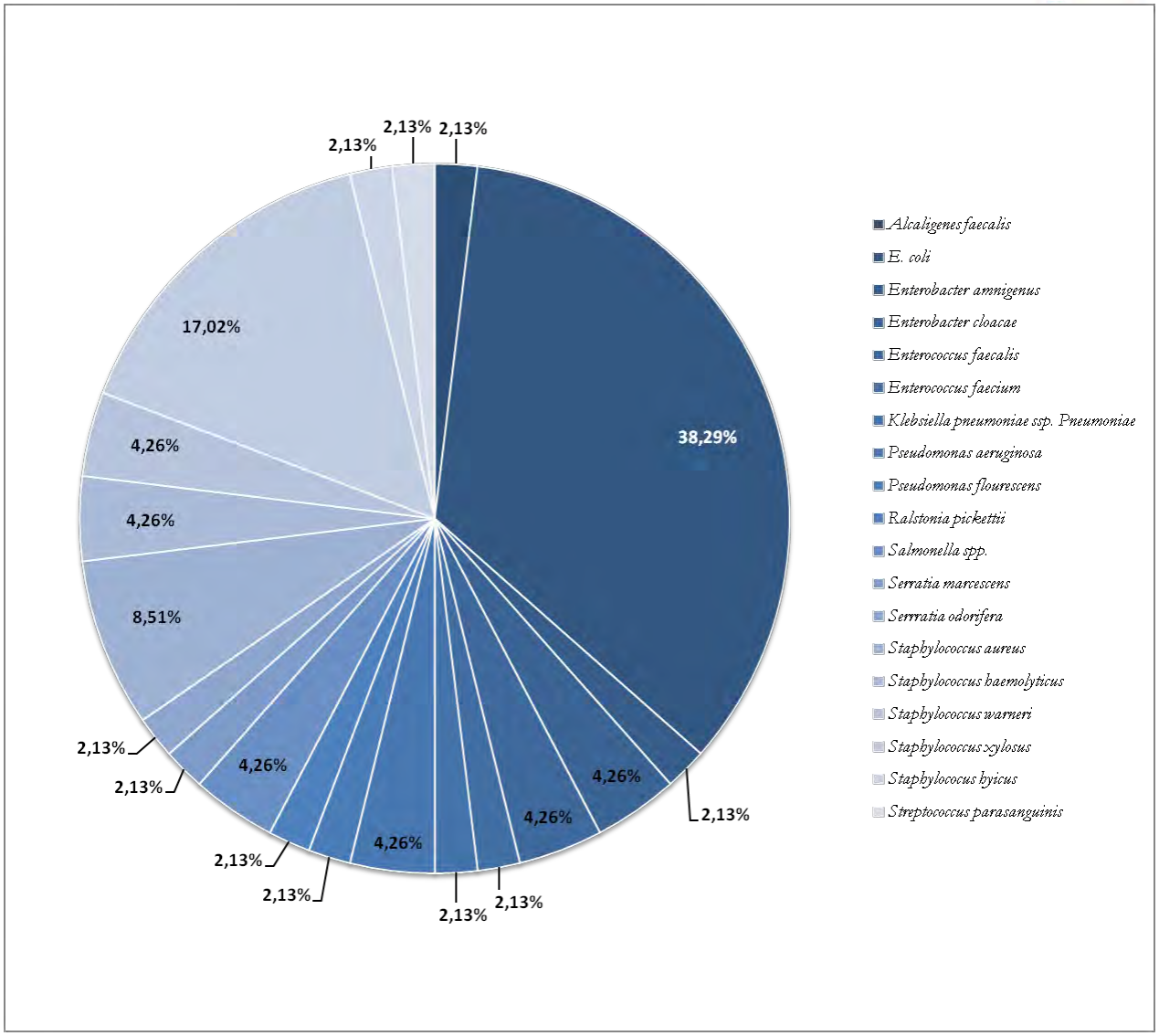


Figura 46. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de lebre-ibérica encontrados mortos e respetiva positividade amostral.

Resultados Parasitológicos

No que toca aos **parasitas internos,** foram efetuadas análises parasitológicas em 95 cadáveres de lebres e em 125 cadáveres de coelhos-bravos. Para 44 cadáveres de coelho-bravo, o pobre estado de conservação impediu a realização de exame parasitológico.

O exame parasitológico teve como objetivo a identificação de parasitas gastrointestinais que possam ocorrer nestas espécies de leporídeos. Das 95 lebres necropsiadas, 60 (63,16%) tinham pelo menos uma espécie de parasita interno (protozoários, nemátodes ou cestodes) e 35 não possuíam parasitas internos. Dos coelhos-bravos, 105 (84%) tinham alguma espécie de parasita interno e 20 não estavam parasitados (**Tabela 29**). Observaram-se frequentemente infeções mistas por céstodes, nemátodes e/ou coccídeas.

Tabela 29. Total de animais necropsiados e nos quais foram efetuadas análises parasitológicas.

	N	Nº de animais parasitados	Protozoários	Céstodes	Nemátodes
Lebres	95	60 (63,16%)	40 (42,11%)	15 (15,79%)	29 (30,52%)
Coelhos-bravos	125	105 (84,0%)	61 (48,8%)	50 (40,0%)	78 (62,4%)

Dos 95 cadáveres de lebres recolhidos no campo, 29 (30,52%) apresentava parasitismo por nemátodes, mas em apenas 13 destes cadáveres foi possível recuperar parasitas adultos. Nos restantes 16, confirmou-se a presença de nemátodes, mas não foi possível identificar a espécie através de provas coprológicas de observação de ovos de parasitas. Apenas as espécies *Graphidium strigosum*, *Passalurus ambiguus* e uma espécie não identificada pertencente do género *Nematodirus* foram encontrados nestas lebres. A maioria dos cadáveres apresentava uma baixa carga parasitária de nemátodes.

No caso dos 125 cadáveres de coelhos-bravos, 74 (62,4%) apresentavam parasitismo por nemátodes. Em apenas 66 foram observadas formas adultas, tendo sido identificadas quatro espécies (*G. strigosum*, *P. ambiguus*, *Trichuris leporis* e *Dermatoxys veligera*), assim como parasitas dos géneros *Trichostrongylus* e *Nematodirus*. A espécie *G. strigosum* foi identificada num maior número de cadáveres (n=44, 35,2%), seguida de *P. ambiguus* (n=21, 16,8%) e *D. veligera* (n=20, 16,0%). Tal como nas lebres, a maioria dos cadáveres de coelhos-bravos apresentou uma baixa carga parasitária por nemátodes. [**Tabela 30**]

Tabela 30. Nemátodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral.

	Lebre (N = 95)				Coelho-bravo (N = 125)			
	n (%)	(+)	(++)	(+++)	n (%)	(+)	(++)	(+++)
Graphidium strigosum	5 (5,26)	3 (3,16)	1 (1,1)	1 (1,1)	44 (35,2)	31 (24,8)	12 (9,6)	1 (0,8)
***Trichostrongylus* spp.**	0	0	0	0	1 (0,8)	1 (0,8)	0	0
Passalurus ambiguus	8 (8,42)	4 (4,21)	3 (3,16)	1 (1,0)	21 (16,8)	14 (11,2)	5 (4,0)	2 (1,6)
Trichuris leporis	0	0	0	0	1 (0,8)	1 (0,8)	0	0
Dermatoxys velígera	0	0	0	0	20 (16,0)	17 (13,6)	1 (0,8)	2 (1,6)
***Nematodirus* sp.**	2 (2,1)	2 (2,1)	0	0	17 (13,6)	13 (10,4)	4 (3,2)	0

Cargas parasitárias: (+) pequena infeção, (++) média infeção, (+++) grande infeção

A caracterização do parasitismo por nemátodes em cadáveres de lebres e coelhos-bravos no que toca ao número de espécies diferentes encontradas em cada indivíduo é apresentada na **Tabela 31**. Foram incluídos desta análise apenas os animais onde foram identificados nemátodes adultos.

Tabela 31. Perfil de parasitismo misto por nemátodes em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos.

Total de espécies de nemátodos	Nº de Lebres parasitadas	Nº de Coelhos-bravos parasitados
0	84	59
1	10	37
2	3	22
3	0	5
4	0	2

Na avaliação do parasitismo por **céstodes**, foram observados 51 coelhos-bravos (40,8%) e 15 lebres (16,5%) parasitadas. Nos coelhos-bravos, a maioria das infeções verificada deveu-se a espécies do género *Cittotaenia* (n=45, 36,0%), com apenas um pequeno número de cadáveres parasitados com céstodes do género *Andrya* ou outras espécies não identificadas da Família Anoplocephalidae. Apenas foram observadas formas larvares (*Cysticercus pisiformis*) em dois cadáveres de coelhos. Em contraste, nas lebres analisadas predominou o parasitismo por *Cittotaenia* e por *Cysticercus pisiformis* e em menor número por outras espécies da Família Anoplocephalidae. [**Tabelas 32** e **33**]

Tabela 32. Céstodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral.

	Lebre (N = 95)				Coelho-bravo (N = 125)			
	n (%)	(+) (%)	(++) (%)	(+++) (%)	n (%)	(+) (%)	(++) (%)	(+++) (%)
***Cittotaenia* sp.**	7 (7,36)	7 (7,36)	0	0	45 (36,0)	32 (25,6)	9 (7,2)	4 (3,2)
***Andrya* sp.**	0	0	0	0	5 (4,0)	4 (3,2)	0	1 (0,8)
Família Anoplocephalidae	2 (2,1)	2 (2,1)	0	0	3 (2,4)	2 (1,6)	0	1 (0,8)
Cysticercus pisiformis	6 (6,31)	1 (1,1)	0	5 (5,2)	2 (1,6)	02 (1,6)	0	0

Tabela 33. Perfil de parasitismo misto por céstodes em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos.

Total de espécies de Cestodes	Nº de Lebre parasitadas	Nº de Coelhos-bravos parasitados.
0	82	74
1	15	47
2	0	4

No parasitismo por **protozoários** do género *Eimeria* (coccídeas), foram identificadas cinco e nove espécies respectivamente nos cadáveres de lebres e de coelhos-bravos (**Tabela 34**). Dos 95 cadáveres de lebres, em 40 (41,2%) foram encontrados oocistos de *Eimeria*, sendo que na maioria não foi possível identificar os oocistos ao nível da espécie. No caso dos coelhos-bravos, em 61 (48,8%) foram encontrados oocistos, e em 36 desses animais foi possível identificar pelo menos uma espécie de *Eimeria*. Na Tabela 34 são apresentados os números de animais parasitados com cada espécie de coccídea. Em duas lebres foram identificadas *Eimeria leporis*. A espécie que causa coccidiose hepática (*E. stiedae*) foi também identificada em dois animais. Nos cadáveres de coelho-bravo, as espécies encontradas num maior número foram *E. perforans* (n=18, 14,4%), *E. media* (n=17, 13,6%) e *E. piriformis* (n=11, 8,8%). As espécies *E. magna* e *E. stiedae* foram identificadas em 7 e 8 animais respetivamente. [**Tabela 34 e 35**].

Tabela 34. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo e lebre-ibérica e respetiva percentagem de positividade amostral.

	Lebre (N = 95)				Coelho-bravo (N = 125)			
	N (%)	(+) (%)	(++) (%)	(+++) (%)	N (%)	(+) (%)	(++) (%)	(+++) (%)
Eimeria coecicola	-	-	-	-	-	-	-	-
Eimeria elongata	-	-	-	-	-	-	-	-
Eimeria exigua	-	-	-	-	-	-	-	-
Eimeria irresidua	-	-	-	-	1	1	-	-
Eimeria leporis	2 (2,10)	2 (2,10)	0	0	-	-	-	-
Eimeria magna	-	-	-	-	7	4	2	1
Eimeria media	-	-	-	-	17	14	3	0
Eimeria orbiculata	1 (1,1)	1 (1,1)	0	0	-	-	-	-
Eimeria perforans	2 (2,10)	0	0	0	18	17	1	0
Eimeria piriformis	-	-	-	-	11	10	11	0
Eimeria stiedae	2 (2,10)	1 (1,1)	0	1	8	7	1	0
Eimeria sp. (Não identificada)	32 (33,68)	21 (22,10)	5	6	29	14	7	8

Tabela 35. Perfil de parasitismo misto por espécies de coccídeas em cadáveres de lebres e de coelhos-bravos.

Total de espécies de Eimeria	Nº de Lebres parasitadas	Nº de Coelhos-bravos parasitados
0	86*	89#
1	11	18
2	0	10
3	0	8

* 29 animais com espécies não identificadas
# 25 animais com espécies não identificadas.

Descoberta de um vírus novo

Durante a vigilância sanitária levada a cabo no Projeto +Coelho 2, a equipa do INIAV I.P. detetou um gamaherpesvirus em lebre-ibérica nunca antes identificado (**Figura 47**).

Até então tinham sido identificados quatro herpesvírus em leporídeos, nomeadamente o herpesvírus leporídeo 1 (LeHV-1), o herpesvírus leporídeo 2 (LeHV-2), o herpesvírus leporídeo 3 (LeHV-3) e o herpesvírus leporídeo 4 (LeHV-4), sendo as infeções de ocorrência natural mais comumente identificadas em coelhos as causadas por LeHV-2 e LeHV-3, que tal como o LeHV-1 pertencem à subfamília Gammaherpesvirinae, ao contrário do LeHV-4 que é um membro da subfamília Alphaherpesvirinae.

Esses distintos herpesvírus têm um impacto amplamente variável no coelho europeu, com as infeções por LeHV-2 e LeHV-3 passando geralmente despercebidas (Barthold *et al.,* 2016), ao contrário das causadas pelo LeHV-4 que causa infeções fatais (Jin *et al.,* 2008).

Os herpesvírus são vírus com invólucro, com 200-250 nm de diâmetro, organizados em quatro camadas concêntricas (Brown et al., 2011), 1) um núcleo central com o genoma de DNA linear de dupla cadeia, 2) uma capsíde de simetria icosaédrica, com cerca de 125 nm de diâmetro envolvido por 3) um tegumento proteico que contém muitas proteínas codificadas por vírus, por sua vez envolto por 4) um envelope lipídico contendo várias glicoproteínas virais.

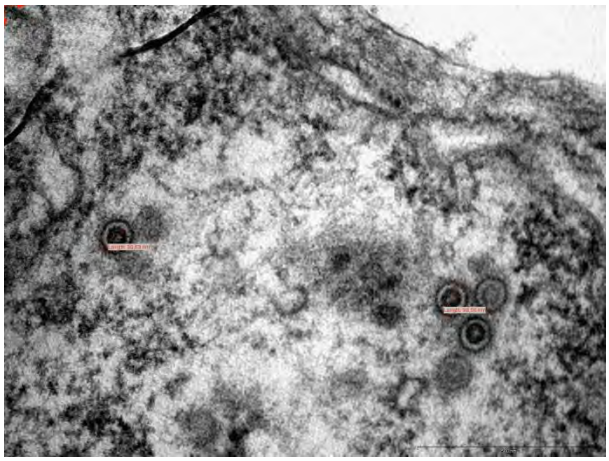


Figura 47. Microscopia eletrónica de amostra de pele de uma lebre LeHV-5 positiva.

Morfologicamente, os herpesvírus distinguem-se de todos os outros vírus (Davison *et al.,* 2009) e, por isso são facilmente reconhecidos por microscopia eletrônica. Os herpesvírus pertencem à ordem Herpesvirales que compreende três famílias, nomeadamente a família Herpesviridae, que inclui mais de 100 vírus de mamíferos, aves e répteis e cujos membros têm grandes genomas variando de 125 a 290kb (Sunohara-Neilson *et al.,* 2013), a família Alloherpesviridae, que inclui os peixes e vírus da rã, e a família Malacoherpesviridae, que contém o vírus bivalve (Davison *et al.,* 2009).

A família Herpesviridae inclui as subfamílias Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae. Os seus membros possuem diferentes propriedades biológicas e classificações distintas, apoiadas pelos dados filogenéticos.

A subfamília Gammaherpesvirinae é dividida em quatro gêneros: Macavirus, Percavirus, Lymphocryptovirus e Rhadinovirus (Davison *et al.,* 2009). Enquanto a subfamília Alphaherpesvirinae causa lise rápida em cultura de células, os membros da subfamilia Betaherpesvirinae crescem lentamente induzindo a formação de células gigantes em cultura, e os Gammaherpesvirinae normalmente infectam tecido linfoide, significando um tropismo primário para células de linhagem linfóide (David *et al.,* 2014), o que pode levar a doenças linfoproliferativas (Jin *et al.,* 2008) e oncogênese (Sunohara-Neilson *et al.,* 2013).

Os primeiros achados foram observados nas necropsias de lebres ibéricas, encontradas mortas ou moribundas em finais de 2018 e inícios de 2019. A par de sinais da forma nodular da mixomatose, foram também observadas outras lesões na genitália, pálpebras, lábios e nariz, não habituais nos casos de mixomatose, incluindo necrose e presença de vesículas [**Figura 48**].



Figura 48. Lesões (vesículas e vesiculo-pústulas) presentes numa lebre morta com LeHV-5.

A histopatologia destes tecidos revelou a presença de corpos de inclusão nucleares em células do estroma, sugerindo a presença adicional de um vírus de replicação nuclear. Por recurso à microscopia eletrônica de transmissão, foi demonstrada ainda a presença de partículas de herpesvírus nos tecidos das lebres afetadas.

Posteriormente, foi confirmada a presença de herpesvírus em 13 lebres com mixomatose, por PCR e sequenciação. O DNA do gamaherpesvírus das lebres ibéricas foi também detetado em sete lebres saudáveis, sugerindo que este vírus possa circular de forma assintomática, e ocorrer reativação em situações de stress ou imunossupressão, como acontece durante a mixomatose.

A análise filogenética baseada em sequências parciais concatenadas do gene da DNA polimerase e do gene da glicoproteína B, revelou uma maior proximidade com vírus de morcegos (**Figura 49**).

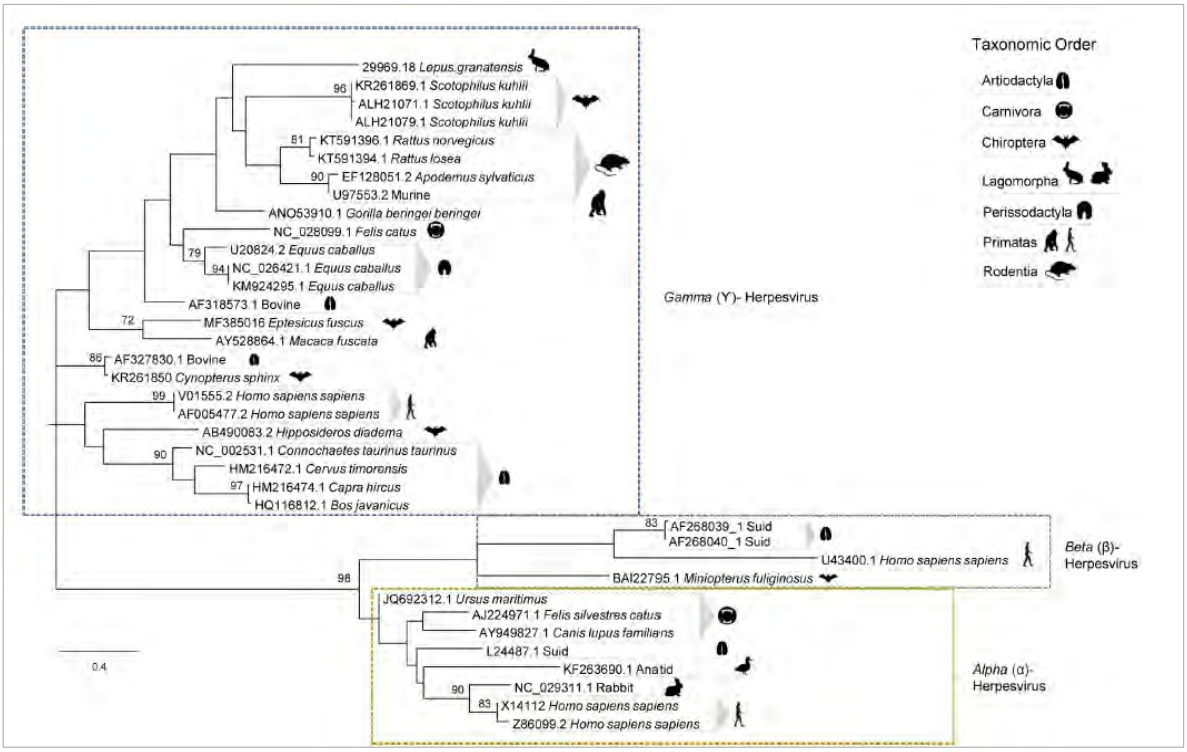


Figura 49. Análise filogenética baseada em 37 sequencias aminoacídicas da enzina DNA polimerase de herpesvirus de várias espécies de vertebrados. A sequência nucleotídica do vírus identificado (no topo da arvore) apresenta uma relação genética mais próxima com herpesvírus de roedores.

O vírus da lebre foi classificado proximamente aos herpesvírus de roedores do gênero *Rhadinovirus* da subfamília *Gammaherpesvirus*.

Propusemos denominar este novo vírus Leporid gammaherpesvirus 5 (LeHV-5), de acordo com os padrões do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, entidade que regulariza e organiza a classificação taxonómica dos vírus.

O impacto da infeção por herpesvírus na reprodução e mortalidade da lebre ibérica é ainda desconhecido, mas pode agravar o declínio das populações selvagens causado pelo vírus mixoma recombinante natural recentemente emergido.

No âmbito da avaliação sanitária de coelho-bravo e lebre-ibérica prevista na medida OE.1, formam publicados 7 artigos internacionais e 4 artigos em revistas nacionais, e encontram-se vários artigos em fase de preparação. A vigilância sanitária efetuada durante o Projecto +Coelho2 gerou informação importante sobre a distribuição e prevalência da doença hemorrágica dos coelhos e do vírus da mixomatose em coelho-bravo, e permitiu ao país comunicar em tempo real a emergencia de mixomatose em lebre. Permitiu ainda a descoberta de um gamaherpesvirus, nunca antes reportado.

Referências:

Barthold SW, Griffey SM, Percy DH. Rabbit. 4 th. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. 4 th. 2016. p. 258.

Brown J C., NewcombWW. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis. Curr Opin Virol. 2011; 1: 142–149. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.003 PMID: 21927635

David M. Knipe PM. Fields Virology. 6th Editio. In: Williams L, Wilkins, editors. Fields Virology. 6th Editio. Philadelphia, PA, USA; 2013.

Davison AJ, Richard E, Bernhard E, Gary HS, Duncan MJ, Anthony MC, et al. The order of Herpesvirales. Arch Virol. 2009; 154: 171–177. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4 PMID: 19066710

Jin L, Lo¨hr C V., Vanarsdall AL, Baker RJ, Moerdyk-Schauwecker M, Levine C, et al. Characterization of a novel alphaherpesvirus associated with fatal infections of domestic rabbits. Virology. 2008; 378: 13–20. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.003 PMID: 18554680

Sunohara-Neilson JR, Brash M, Carman S, NagyE´ , Turner P V. Experimental infection of New Zealand white rabbits (Oryctolagus cuniculi) with leporid herpesvirus 4. Comp Med. 2013; 63: 422–431. PMID: 24210019

5. Determinar as abundâncias de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica em zonas de caça selecionadas (OE2)

Objetivo operacional 1: Assegurar condições padronizadas para a realização de avaliações populacionais em áreas modelo;
Atividade 1: Realizar avaliações populacionais de coelho-bravo e lebre em áreas modelo, com variabilidade no que toca a densidade de animais, prevalência de agentes virais patogénicos, fatores bióticos e abióticos; avaliação mensal (contagem de excrementos dispersos (método direto- avaliação mensal);

Caracterização da demografia do coelho-bravo e a epidemiologia da DHV em diferentes biótopos

No âmbito da avaliação das populações naturais de coelho-bravo **foram implementados sistemas de monitorização em 9 áreas de estudo** (**Tabela 36**, **Figura 50**). As metodologias adotadas permitem estimar a densidade de coelho-bravo através da aplicação dos métodos de Contagem de Excrementos e Pontos Fixos e de Contagem Direta de Animais por Distâncias. As 9 áreas de estudo encontram-se em monitorização desde 2018, implementadas no projeto +Coelho, às quais foi adicionada mais uma área em 2020 após a restruturação da metodologia a aplicar, como se encontra descrito mais à frente no presente documento, sendo **10 as áreas** envolvidas a partir do referido período.

As áreas de estudo foram selecionadas tendo em conta os seguintes pré-requisitos: i) presença de coelho-bravo (espécie-alvo do estudo), ii) facilidade logística em termos de monitorização, iii) presença de diferentes tipos de habitat e de gestão, iv) dispersão geográfica no território de Portugal Continental.

Tendo em conta os requisitos acima definidos, as áreas de estudo foram selecionadas em diferentes zonas de caça (ZC) afiliadas a cada uma das OSC de primeiro nível: Associação Nacional de Proprietários Rurais Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC), Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP), Federação Nacional das Zonas de Caça Associativas (FENCAÇA). Cada OSC selecionou entre 2 a 4 zonas de caça para implementação dos sistemas de monitorização como o indicado na **Tabela 36** e **Figura 50**.

Tabela 36. Zonas de Caça onde se realizou a monitorização das populações naturais de coelho-bravo.

Zona de caça	Acrónimo	Início de Monitorização	Concelho	Distrito	OSC responsável
ZC Municipal Mouzinho	PNF	Julho 2018	Penafiel	Porto	Fencaça
ZC Turística de Roubão, Braço de Prata e Outras	BNV	Julho 2018	Benavente	Santarém	ANPC
ZC Associativa das Herdades da Abrunheira, Paço do Aragão e outras	MTN	Junho 2018	Montemor-o-Novo	Évora	Fencaça
ZC Turística do Monte de Cima	EST	Julho 2018	Estremoz	Évora	Fencaça
ZC Turística das Cortes	FAL	Maio 2018	Ferreira do Alentejo	Beja	ANPC
ZC Turística de Vale de Perditos	SRP	Abril 2018	Serpa	Beja	ANPC
ZC Turística Corte Gafo	MRT1	Abril 2018	Mértola	Beja	CNCP
ZC Turística Herdade do Pereiro	ALC	Abril 2018	Alcoutim	Faro	ANPC
ZC Associativa do Cerro da Cabeça	TVR	Abril 2018	Tavira	Faro	CNCP
ZC Turística do Moninho	MRT2	Fevereiro 2020	Mértola	Beja	CNCP

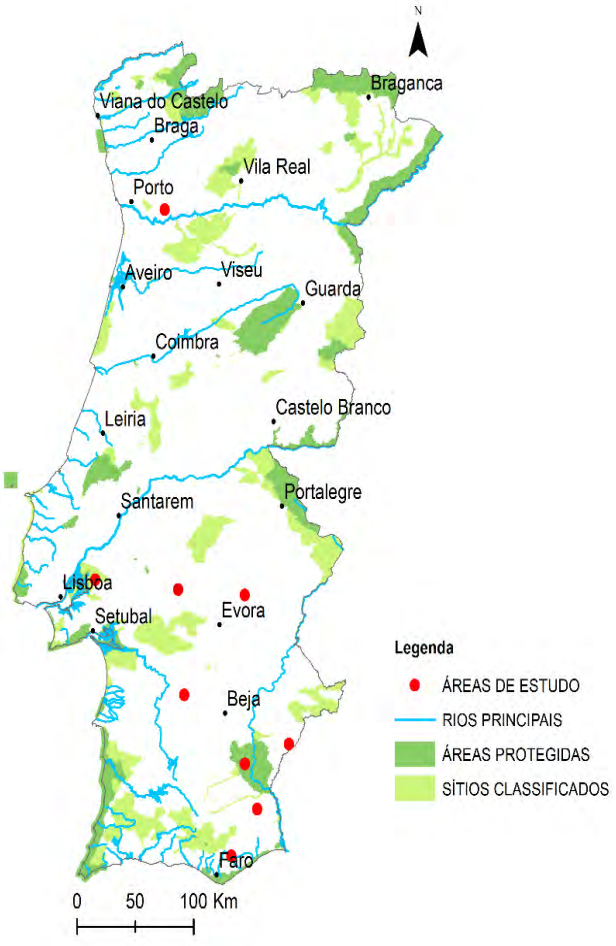


Figura 50. Zonas de Caça (áreas de estudo a vermelho) onde foi estabelecida a monitorização das populações de coelho-bravo.

Metodologia de Contagens de Excrementos em Pontos Fixos

Para proceder à monitorização através do **método de contagem de excrementos** foi selecionada, dentro de cada zona de caça, uma unidade de paisagem com uma superfície entre 15 e 20 ha, identificada pelo técnico da OSC por albergar um núcleo particularmente abundante de coelho-bravo no contexto local. Após avaliação destas unidades, foram selecionadas 3 unidades de amostragem (grelhas), cuja localização exata foi definida de acordo com critérios de maior abundância local de coelho-bravo, de exequibilidade (i.e., facilidade de acesso e estrutura da vegetação que permita a montagem da grelha e a contagem dos excrementos) e menor suscetibilidade a inundações.

Nestas unidades de amostragem foi efetuada uma avaliação mensal da abundância de coelho-bravo através de métodos de contagem de excrementos em pontos fixos, com remoção dos mesmos. Este método indireto é considerado fiável e de simples realização para a monitorização da abundância de populações de coelho-bravo ibéricas (Fernandez-de-Simon *et al.,* 2011). Cada unidade de amostragem consistiu numa grelha de pontos de contagem cobrindo uma superfície de 1 ha (100x100 m). Os pontos de contagem são fixos e espaçados 25 m entre si. Procedeu-se mensalmente à contagem e remoção de excrementos de coelho-bravo presentes numa área circular de 1m^2 centrada em cada um dos pontos fixos (**Figuras 51 e 52**). Em cada um dos pontos de contagem, foi sempre removida a vegetação na área de contagem para facilitar a contagem e a remoção dos excrementos existentes.

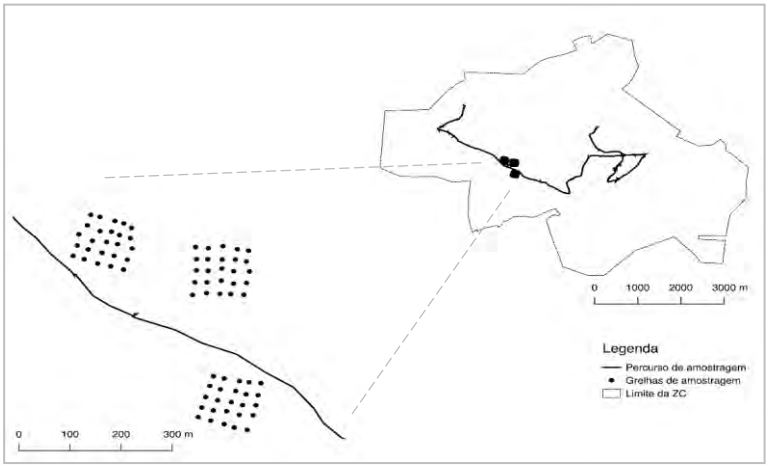


Figura 51. Esquema geral de implementação das unidades de amostragem para monitorização de coelho-bravo e das grelhas de contagem de excrementos.

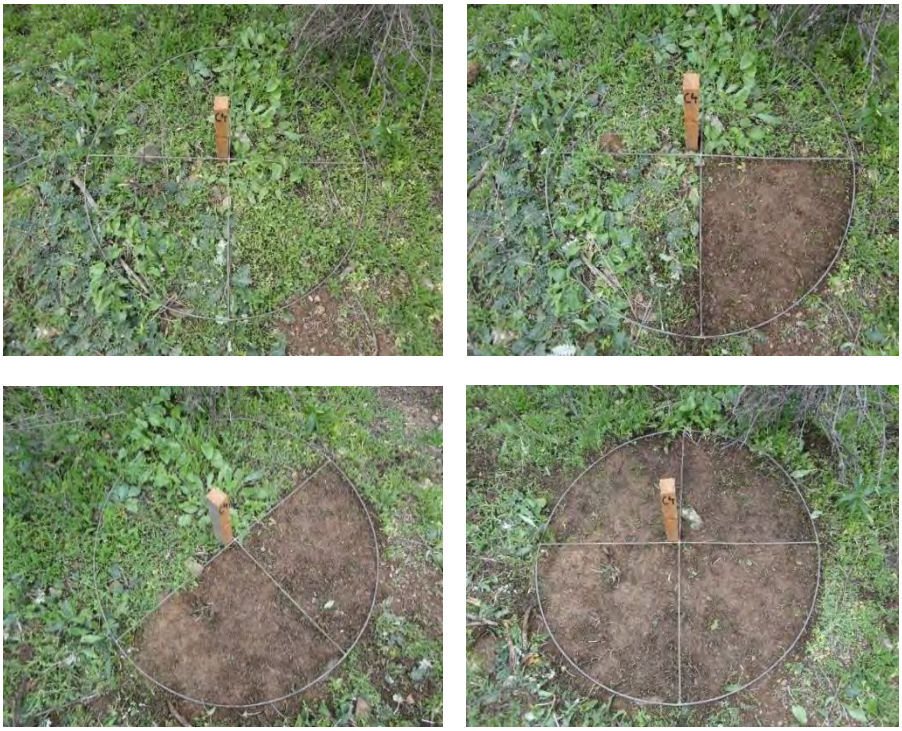


Figura 52. Fotografia de uma unidade de contagem de excrementos, onde o círculo corresponde a uma área circular de 1 m2, com exemplificação de remoção da vegetação para contagem e remoção de excrementos de coelho-bravo.

Em cada sessão foi preenchida uma **Ficha de Contagem de Excrementos** (**Anexo I**), registando-se os excrementos de coelho-bravo detetados em cada unidade circular.
A densidade de coelho-bravo existente em cada uma das grelhas de amostragem foi calculada utilizando a taxa média de defecação diária de coelho-bravo. A densidade foi estimada através da seguinte equação:

$$\widehat{D} = \sum_{i=1}^{n} C \times A^{-1} \times \Delta t^{-1} \times DR^{-1} / n$$

Onde $\widehat{D}$, é a densidade média de coelho-bravo na grelha em número de indivíduos por ha; C é a contagem de excrementos presente numa área de contagem de um determinado ponto fixo da grelha; A é a área de contagem por ponto fixo, Δt é o período de tempo, em dias, decorrido entre a limpeza e a contagem, DR é a taxa de defecação diária de coelho-bravo, e n é o número de unidades de contagem efetivamente contadas. O valor de DR utilizado foi o estimado por Gonzalez-Redondo (2009).
Estas contagens permitem detetar e quantificar as variações populacionais e, em conjunto com os dados obtidos através da prospeção de cadáveres, identificar a sazonalidade dos surtos de RDHV2.

Esta metodologia foi implementada de 2018 a 2019 no âmbito do Projeto +Coelho e +Coelho2, permitindo a avaliação populacional por um período de 2 anos. Contudo, devido à amostragem nas diferentes zonas de caça não ter sido possível de realizar de forma continua no tempo (ver tabela 22), optou-se por uma reformulação da metodologia para acompanhamento das flutuações demográficas das populações naturais de coelho-bravo (descrita mais à frente no presente documento).

Metodologia de Contagens Diretas de Coelhos-bravo 2018-2019

No sentido de se avaliar a dinâmica populacional ao nível da meta-população (i.e. à escala da paisagem), foram realizadas monitorizações através de **contagens diretas de coelhos-bravo**, numa área extensa da zona de caça, centrada nas áreas monitorizadas pela da contagem de excrementos em pontos fixos. Os percursos para contagens diretas foram realizados ao amanhecer, coincidindo com o período de maior atividade do coelho-bravo (Monterroso *et al.*, 2013). A execução destes percursos foi efetuada seguindo os procedimentos necessários para a estimativa de densidade e tamanho populacional através do método de amostragem por distâncias (*Distance sampling*; Buckland *et al.,* 2001). A utilização deste método assume que a espécie-alvo se encontra distribuída aleatoriamente na área de estudo e que existe uma função estimável entre a distância dos indivíduos ao observador e a sua detetabilidade. Para tal, é necessário que o observador efetue um percurso ao longo do qual se regista, para cada animal detetado, a distância ao observador e ângulo com o percurso.

Na sua forma mais simples, a estimativa da densidade é obtida através da seguinte equação:

$$\widehat{D} = {}^{n \times f(x)}/_{2LW}$$

onde $\widehat{D}$ é a densidade média de coelho-bravo na área de estudo, em número de indivíduos por ha; n é o número de animais efetivamente detetados, f(x) é função que descreve a probabilidade de deteção em relação à distância com o percurso; L é comprimento do percurso, e W é a largura da área efetivamente amostrada.

No entanto, neste projeto a estimativa de densidades de coelho-bravo pelo **método das distâncias** foi obtida através de modelos estatísticos mais robustos (Kéry and Royle 2016). Estes modelos permitem avaliar a variação de densidade entre diferentes áreas de estudo e épocas do ano, e modelar a abundância em função de variáveis ambientais (Royle and Dorazio 2008), bem como a possibilidade de estimar a probabilidade de os indivíduos estarem disponíveis para serem contados (i.e., emigração temporária; Chandler *et al.,* 2011) e ter em conta as variáveis quem influenciam a sua detetabilidade (Kéry and Royle 2016).
Neste sentido, desenvolveram-me modelos de estimativa de densidade com uma abordagem bayesiana, onde a amostragem por distância pode ser abordada de várias maneiras diferentes, usando neste caso a formulação condicional (três partes) do modelo usando dados contínuos, integrando modelos abertos com migração temporária e avaliando o *fit* do conjunto de modelos de 'open-population" gerado de tendo em conta o modelos de dinâmica reduzida através com crescimento exponencial simples (Kéry and Royle 2016).

Assim, foi implementado um percurso para este tipo de amostragem em cada área de estudo. Os percursos foram desenhados de forma a amostrar não só a unidade de paisagem onde se inserem as grelhas de amostragem para contagem de excrementos em pontos fixos, mas também a zona limítrofe, até uma distância de aproximadamente 2 km (**Figura 53**). A distância dos percursos variou entre 8 e 12 km, sobrepondo-se às unidades de vegetação ali presentes em proporção aproximada à sua disponibilidade.
Cada percurso para contagem direta de animais foi efetuado sempre que possível por dois observadores em viatura de todo-terreno: um observador conduzia a viatura ao longo do percurso a uma velocidade de cerca de 10 km/h, enquanto o outro observador se localizou na parte traseira da viatura (caixa

aberta), sempre que possível, procurando detetar coelhos e registando a sua localização, distância e ângulo ao percurso. Os percursos foram efetuados mensalmente ao nascer do sol; sendo feitas três réplicas por mês (sempre que possível em dias consecutivos).

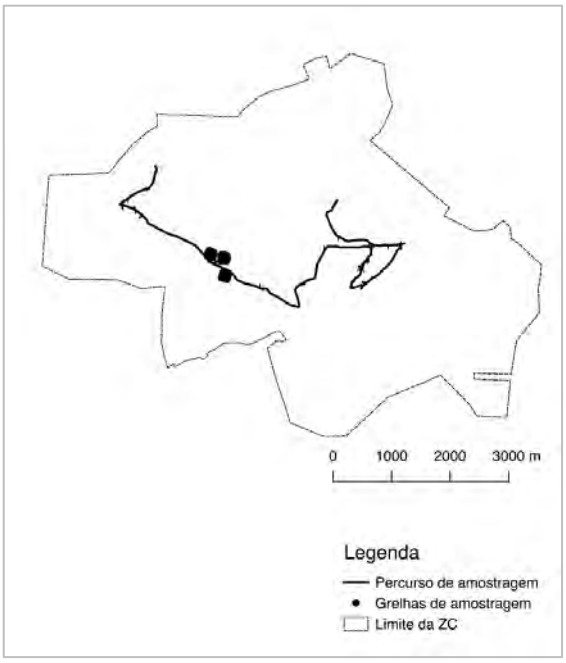


Figura 53. Representação esquemática de percurso para amostragem por contagem direta de animais nas zonas de caça a amostrar.

Estas contagens mensais permitiram detetar e quantificar as variações populacionais numa escala mais abrangente, servindo também para avaliar se a tendência geral da população seguiu as variações dos núcleos populacionais que a constituem.

Como o referido anteriormente, esta metodologia foi implementada de 2018 a 2019 no âmbito do projeto +Coelho e +Coelho2, permitindo a avaliação populacional por um período de 2 anos. Contudo, devido à amostragem nas diferentes zonas de caça não ter sido possível realizar de forma continua no tempo (ver **tabela 37**), optou-se por uma reformulação da metodologia para acompanhamento das flutuações demográficas das populações naturais de coelho-bravo, nas épocas de mínimo e máximo populacional, como descrita mais à frente no presente documento.

Tratamento e Análise de Dados

Os dados recolhidos da contagem de coelhos por distâncias foram informatizados e compilados, e posteriormente reorganizados através do pacote "unmarked" do programa estatístico R (Fiske & Chandler 2011; R Core & Team, 2018). Cada percurso foi assim dividido em segmentos de 500m, para os quais foram contabilizados separadamente o número de coelhos avistados para cada uma das classes de distâncias (0-20; 20-40; 40-60; 60-80 e 80-100) e para as três réplicas efetuadas, em cada um dos meses amostrados.

Foram apenas consideradas apenas duas réplicas de cada amostragem mensal, devido à falta de dados para algumas áreas de estudo, ao longo do período de amostragem, para a terceira réplica de amostragem.

Os dados recolhidos (números de coelhos por distâncias) foram analisados através da implementação de modelos dinâmicos de Amostragem Hierárquica por Distâncias com função de detecção "half-normal", componente de emigração temporária e dinâmica reduzida (*reduced dynamics*) com crescimento exponencial simples. A construção dos modelos foi realizada no programa estatístico R (Fiske & Chandler 2011; R Core & Team, 2018).

Dos modelos desenvolvidos resultou uma estimativa de densidade com abordagem bayesiana, com formulação condicional (três partes), integrando modelos abertos com migração temporária e avaliando o *fit* do conjunto de modelos de 'open-population". O modelo desenvolvido permite estimar a densidade dos meses em que houve recolha de dados pela amostragem por distâncias, mas também estimar (embora com maior erro) os meses em que não ocorreu amostragem, permitindo assim a obter a tendência da densidade populacional ao longo de todo o período em análise (março de 2018 a julho de 2020). A interpretação dos meses com densidade estimada sem recolha de dados será, contudo, feita de forma mais cautelosa, tendo sempre em conta que uma amostragem com recolha de dados contínua no tempo permite sempre uma mais correta estimativa, e por isso mais próxima da realidade populacional, não substituindo os resultados resultantes de uma amostragem contínua e sistemática no tempo e no espaço.

Para a construção dos modelos foram usadas variáveis que influenciam a abundância de coelhos, variáveis que influenciam a detetabilidade e variáveis que influenciam o crescimento populacional. Neste sentido foram obtidas variáveis de coberto e uso do solo, de quantidade de vegetação verde (NDVI – *Normalized Difference Vegetation Índex*), climatéricas, e de ritmo circadiano.

Como variáveis de coberto vegetal e uso do solo, foi calculada a proporção anual (2019) de cobertura de pastagens, de arbustos, de árvores e de áreas cultivadas, através de imagens de satélite com resolução de 100 m do Copernicus Global Land Service (https://land.copernicus.eu/global/products/lc). Para cada segmento de percurso de 500m, obteve-se a proporção média de cada variável para cada segmento numa zona tampão (*buffer)* de 100 m ao redor de cada um. Estas variáveis foram consideradas como variáveis de abundância. Todo o processamento das imagens foi realizado no programa de Sistemas de Informação Geográfica, ArcGIS 10.5©.

Para a obtenção do NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), foram obtidas imagens do satélite MODIS (https://earthexplorer.usgs.gov/), para todos os meses dentro do período de março de 2018 a julho de 2020 para a totalidade da área de estudo. Cada imagem apresenta uma resolução de 300m de *pixel* e uma periodicidade de 21 dias. Para cada segmento de percurso de 500m de cada área de estudo, foi calculado o valor médio de NDVI num *buffer* de 100 m ao redor de cada segmento. Esta variável foi considerada como variável de detetabilidade.

Para a variável de clima, foi apontado o estado do tempo para cada réplica de percurso, segundo as categorias, "Ceu Limpo", "Nublado", "Nevoeiro", "Chuva fraca" e "Chuva forte", e se à data de

realização de réplica cada percurso choveu 3 dias antes. Estas variáveis foram consideradas como variável de detetabilidade e disponibilidade.

Como variável do ritmo circadiano, que influenciam a disponibilidade de indivíduos a contar, foi incluído a hora de Inicio de cada réplica de percurso.

Reformulação da Metodologia de Contagens Diretas de Coelhos-bravo 2020 e Análise Comparativa do Esforço Técnico e Financeiro

Tendo-se verificado uma grande variabilidade na realização das amostragens nas diferentes áreas de estudo (zonas de caça) durante o período inicial do projeto, devido a questões logísticas, não permitindo o necessário registo contínuo de dados (**Tabela 37**), foi proposto pela equipa do CIBIO um método alternativo para a determinação das avaliações populacionais aos parceiros do projeto. Esta proposta, consistindo numa amostragem bianual pelo método de contagens diretas de coelhos e de lebres, incindindo sob a época de mínimo (fevereiro) e de máximo populacional (junho), foi discutida com os parceiros, tendo sido acordado a sua implementação (**Tabela 38**). Por outro lado, pretendeu-se com a alteração da metodologia possibilitar o estudo num maior número de áreas de estudo, bem como em aumentar a sua representatividade espacial ao nível do país, incluindo mais áreas principalmente na região norte e centro. Procurou-se, ainda, fazer coincidir a recolha de informação sobre as avaliações populacionais, com a recolha de informação sobre a prevalência da DHV, nomeadamente através das análises serológicas em animais caçados. Por fim, foi analisada a exequibilidade a nível económico, ficando assumido que esta metodologia iria substituir a de Contagem de Excrementos (**Tabela 37**). Contudo, dada a situação de pandemia provocada pelo SARS-COV-2, e as limitações impostas na circulação de pessoas e na realização de trabalho de campo, apenas foi possível implementar a nova metodologia em 7 áreas de estudo, com a inclusão de uma nova área no Alentejo (MRT2) (**Tabela 38**).

Tabela 37. Monitorizações realizadas em cada zona de caça por mês desde o inicio do projeto +Coelho. Dist – Monitorização por contagem de animais por distâncias (cinza escuro); Exec – Monitorização por contagem de excrementos em pontos fixos (cinza claro).

OSC	ZC	Método	Abr 18	Mai 18	Jun 18	Jul 18	Ago 18	Set 18	Out 18	Nov 18	Dez 18	Jan 19	Fev 19	Mar 19	Abr 19	Mai 19	Jun 19	Jul 19	Ago 19	Set 19	Out 19	Nov 19	Dez 19
ANPC	ZCT Pereiro **Alcoutim**	Dist																					
		Excre																					
ANPC	ZCT Braço de Prata **Benavente**	Dist																					
		Excre																					
Fencaça	ZCT Monte de Cima **Estremoz**	Dist																					
		Excre																					
ANPC	ZCT Cortes **Ferreira do Alentejo**	Dist																					
		Excre																					
CNCP	ZCT Corte Gafo **Mértola**	Dist																					
		Excre																					
Fencaça	ZCA H.Abrunheira **Montemoro Novo**	Dist																					
		Excre																					
Fencaça	ZCM Mouzinho **Penafiel**	Dist																					
		Excre																					
ANPC	ZCT Vale Perditos **Serpa**	Dist																					
		Excre																					
CNCP	ZCT Cerro da Cabeça **Tavira**	Dist																					
		Excre																					

Tabela 38. Monitorizações realizadas, pela nova metodologia adotada, em cada zona de caça por mês pelo método de monitorização por contagem de animais por distâncias realizadas na época de mínimo populacional e na época de máximo populacional para coelho e lebre.

OSC	Zona de Caça	Amostragem mínimo pop (Fev)	Amostragem máximo pop (Jul)	Coelho	Lebre
CNCP	ZCT Corte Gafo - MRT	☐	☐	☒	☒
CNCP	ZCA Cerro da Cabeça - TVR	☒	☒	☒	☐
CNCP	ZCT Moinho – MRT2	☒	☒	☒	☒
ANPC	ZCT Braço de Prata – BNV	☒	☐	☒	☐
Fencaça	ZCT Monte de Cima - EST	☒	☒	☒	☒
ANPC	ZCT Cortes – FAL	☒	☐	☐	☐
Fencaça	ZCA H.Abrunheira – MNT	☒	☒	☒	☒

Com o objetivo de avaliar a dinâmica populacional ao nível da metapopulação (isto é, à escala da zona de caça), foram realizadas monitorizações através de contagens diretas numa área extensa da zona de caça. Toda a metodologia e análise de dados, foi a mesma desenvolvida e descrita na secção acima (Metodologia de Contagens Diretas de Coelhos-bravo 2018-2019).

Na **Tabela 39** é apresentada uma análise comparativa do esforço técnico e financeiro envolvido na aplicação dos dois métodos (Método de Contagem por Distâncias e Método de Contagem de Excrementos). Para o método de amostragem por distâncias é apresentada a opção com 2 réplicas e com 3 réplicas por amostragem, a realizar duas vezes ao ano (peridicidade bianual) entre julho/agosto e entre janeiro/fevereiro. Para o método da contagem de excrementos a amostragem apresentada é mensal, a realizar durante todo o ano.

Tabela 39. Tabela comparativa do esforço requerido por cada método de monitorização.

	Contagens por distâncias						Contagens de excrementos		
	Por amostragem		Anual		Custo médio aproximado/ano		Por amostragem	Anual	Custo médio aproximado/ano
	2 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	3 réplicas			
Nº observadores	2	2	-	-	-	-	2	-	1200€
Nº dias[1]	2	3	4	6	200€	300€	1	12	
Horas(4h)*pessoa	8	12	16	24			16	192	
Nº deslocações até à zona de caça[2]	2	3	4	6	40€	60€	1	12	122€
Kms percorridos na zona de caça[3]	16-24	24-36	32-48	48-72	13€	20€	0	0	0
Total	-	-	-	-	**253€**	**380€**	-	-	**1322€**

[1]Valor estimado em 50€/dia/pessoa com dia de trabalho a 8h (6.25€/h)
[2] Estimativa de 30km em deslocação da sede à zona de caça (0.34€/km)
[3] Estimativa do valor por km percorrido a 0.34€/km

Capacitação dos técnicos das OSC (FENÇAÇA, ANPC e CNCP)

Para capacitação dos técnicos das OSC (FENCAÇA, ANPC e CNCP) para a monitorização das populações, uma vez que a recolha de dados ficou a cargo dos parceiros, realizaram-se algumas tarefas relacionadas com a avaliação das novas áreas de amostragem para coelho e lebre, a aplicar após a reformulação do método de monitorização:

- ✓ 28 de novembro de 2019: reunião do grupo de trabalho onde foi apresentada e discutida a reformulação do método para as avaliações populacionais
- ✓ 7 de janeiro de 2020: definição de percurso na nova área de estudo de Rates para contagem direta de coelho-bravo (dados não enviados pela equipa de recolha e por isso não incluídos para análise)
- ✓ 17 de janeiro de 2020: redefinição do percurso estabelecido para contagem direta de coelho-bravo na ZCA H. Abrunheira (MNT) e definição do percurso para contagem direta de lebres.

Foi elaborado um novo **protocolo de monitorização** onde se encontra descrita a reformulação do método de monitorização de Contagem Direta de Animais por Distâncias (**Anexo III**). O novo protocolo foi disponibilizado por via eletrónica aos técnicos das OSC **Anexo III**.

De modo a uniformizar a informatização e envio dos dados pelos técnicos das OSC, os dados foram inseridos na base de dados, desenvolvida em Microsoft Excel®.

Resultados da Avaliação das Populações Naturais de Coelho-bravo

A amostragem realizada permitiu obter uma avaliação de diversos núcleos populacionais de coelho-bravo (no contexto local), integrados em populações naturais de Portugal continental. Os dois tipos de amostragem (monitorização por contagem de excrementos e monitorização de contagem de animais por distâncias) permitiram uma análise da flutuação das densidades ao longo do tempo ao nível da população local (através da monitorização por contagem de excrementos) e ao nível da meta-população (escala da paisagem, através da monitorização de contagem de animais por distâncias). As densidades encontradas para os núcleos populacionais das diferentes áreas de estudo apresentam intervalos de valores de densidade que variam entre os 0,28-5,86 coelho-bravo/ha para a área de estudo TVR e entre os 22,55-96,42 ha para a área de estudo SRP (coelho-bravo/ha) (**Tabela 40**). Quanto às estimativas de densidade para a meta-população das áreas de estudo, estas variam entre 0,01-0,11 coelho-bravo/ha para a área de estudo PNF e entre 1,19-1,79 coelho-bravo/ha para a área de estudo SRP (**Tabela 40**).

Tabela 40. Valores mínimos e máximos de densidade populacional (coelho/ha), média ± desvio padrão registados em cada uma das áreas em, ao nível dos núcleos populacional (densidade estimada pela contagem em pontos fixos) e ao nível da meta-população da área de estudo (estimada pela contagem direta de indivíduos).

	Núcleo populacional		Meta-população	
	Valor mínimo de densidade±desvio padrão	Valor máximo de densidade±desvio padrão	Valor mínimo de densidade± desvio padrão	Valor máximo de densidade±desvio padrão
PNF	0,75±2,55	5,98±9,36	0,01±0,01	0,11±0,08
BNV	0,73±1,89	1,71±5,55	0,01±0,01	0,19±0,07
MTN	0,67±3,00	1,55±4,92	0,01±0,04	0,45±0,19
EST	7,86±9,62	83,99±77,81	0,43±0,79	0,79±0,04
FAL	21,10±28,67	62,62±75,79	0,36±0,03	0,93±0,04
SRP	22,55±19,98	96,42±97,75	1,19±0,17	1,80±0,23
MRT	3,50±8,37	7,65±19,45	0,35±0,07	1,80±0,17
ALC	2,43±4,04	40,11±48,28	0,12±0,02	0,5±0,04
TVR	0,28±1,97	5,86±12,64	0,11±0,03	0,21±0,07
MRT2	na	na	0,02±0,03	0,58±0,15
MTN2	na	na	0,41±0,24	0,79±0,52

Avaliação individualizada das populações naturais de coelho-bravo

Penafiel (PNF) - ZCM Mouzinho

A **monitorização por contagem de excrementos** dispersos no núcleo populacional de **Penafiel** foi efetuada de julho de 2018 a novembro de 2019 (**Figura 54**). A nível local, as populações de cada grelha apresentaram flutuações semelhantes ao longo do tempo embora com valores de densidade diferentes (menor densidade populacional registada na grelha 2 e maior densidade populacional registada na grelha 1; **Figura 54**). Com uma amostragem continua ao logo de 17 meses, foi possível observar as variações entre meses ao longo que mais um ano de amostragem. A densidade populacional média aumentou nos meses de verão e diminuiu durante os meses de inverno tanto em 2018 como em 2019, apresentando uma flutuação populacional de acordo com o descrito na bibliografia (máximo populacional em junho/julho e mínimo populacional em janeiro/fevereiro; Gonçalves *et al.* 2002) embora sempre com uma densidade populacional baixa, onde o valor mais elevado registado foi de 6 coelho-bravo/ha em julho de 2019. A densidade média registada para todo o período de amostragem foi de 2,7 coelho-bravo/ha.

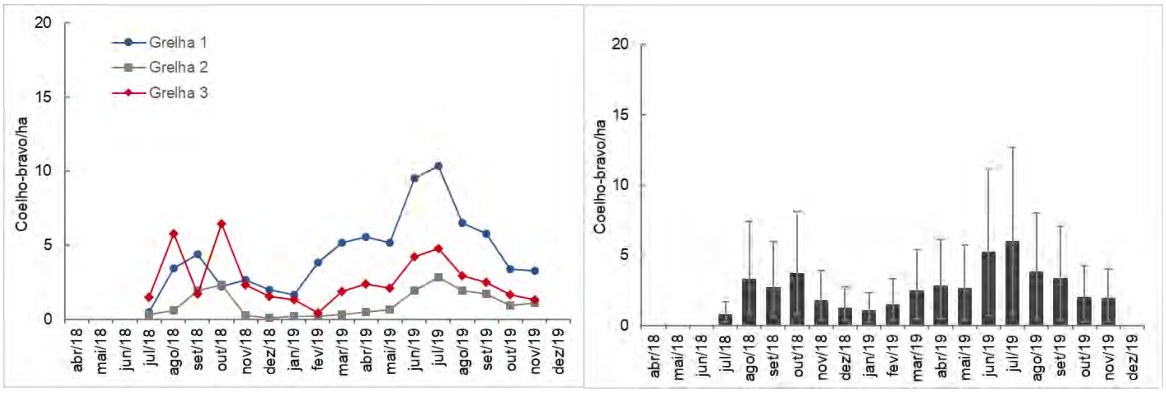


Figura 54. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) de julho de 2018 a novembro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo de Penafiel (PNF).

Relativamente à monitorização de contagem de animais por distâncias para a metapopulação são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de abril de 2018 a julho de 2020 (**Figura 55, Tabela 41**). A densidade estimada para a área de estudo PNF ao longo do período de monitorização apresentou um decréscimo gradual, variando dos 0,11±0,08 coelho-bravo/ha (estimado em abril 2018) para valores muito próximos de 0 (0,01±0,01), registados nos últimos 12 meses de amostragem, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados (probabilidade de estarem ativos) de 0,75±0,38. Contudo, há que ter em consideração que os últimos sete meses não foram amostrados e a densidade apresentada é uma estimativa resultante da modelo estatístico gerado. Apesar dos baixos valores

de densidade estimados para esta área de estudo, observa-se um ligeiro crescimento em julho de 2018 e 2019, coincidindo com o final da época reprodutiva, crescimento este que também se observou, embora com maior evidência e mais tardiamente (agosto 2018), e em simultâneo em 2019, nos núcleos populacionais.

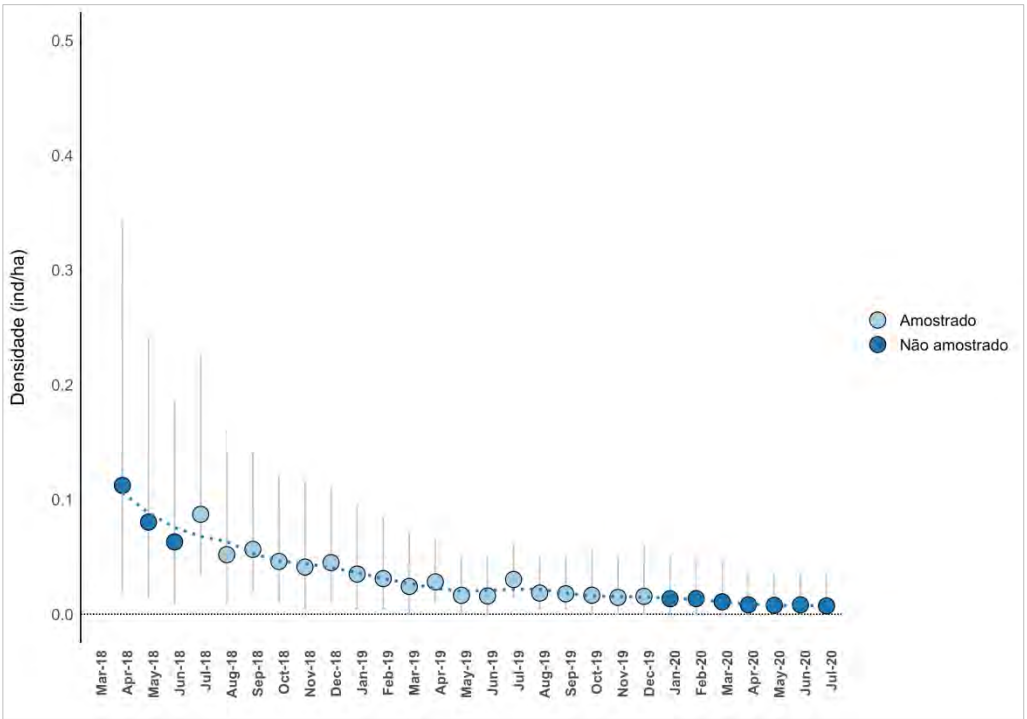


Figura 55. Representação gráfica doa estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de abril de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo PNF.

Tabela 41. Valores de densidade populacional média ± erro médio, estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo PNF.Tabela 24 - Valores de densidade populacional média ± erro médio, estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo PNF.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março	ne	ne
	Abril*	0,11±0,08	[0,02-0,34]
	Maio*	0,08±0,06	[0,02-0,24]
	Junho*	0,06±0,04	[0,01-0,18]
	Julho	0,09±0,05	[0,04-0,22]
	Agosto	0,05±0,04	[0,01-0,16]
	Setembro	0,06±0,03	[0,02-0,14]
	Outubro	0,05±0,03	[0,01-0,12]
	Novembro	0,04±0,03	[0-0,12]
	Dezembro	0,04±0,03	[0,01-0,11]
2019	Janeiro	0,04±0,03	[0-0,1]
	Fevereiro	0,03±0,02	[0-0,08]
	Março	0,02±0,02	[0-0,07]
	Abril	0,03±0,02	[0,01-0,06]
	Maio	0,02±0,01	[0-0,05]
	Junho	0,02±0,01	[0-0,05]
	Julho	0,03±0,01	[0,02-0,06]
	Agosto	0,02±0,01	[0-0,05]
	Setembro	0,02±0,01	[0-0,05]
	Outubro	0,02±0,02	[0-0,06]
	Novembro	0,01±0,01	[0-0,05]
	Dezembro	0,02±0,01	[0-0,06]
2020	Janeiro*	0,01±0,01	[0-0,05]
	Fevereiro*	0,01±0,02	[0-0,05]
	Março*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Abril*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Maio*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Junho*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Julho*	0,01±0,01	[0-0,04]

ne – não estimado; *estimativa para meses não amostrados

Para a presente área de estudo foram avaliadas 7 amostras referentes ao quarto trimestre de 2018, provenientes de coelhos encontrados mortos, sendo todas negativas para a presença do vírus. Para a pesquisa de anticorpos não foram analisadas amostras para esta área de estudo.

Benavente (BNV) - ZCT de Roubão, Braço de Prata e Outras

A **monitorização por contagem de excrementos** dispersos no núcleo populacional de **Benavente** foi realizada durante o mês julho de 2018 e depois de forma contínua de outubro de 2018 a agosto de 2019. A densidade populacional média foi de 1,3 coelho-bravo/ha, registando-se o valor máximo de 4,6 coelho-bravo/ha em abril de 2019 e o valor mínimo de 0,3 coelho-bravo/ha em março e junho de 2019 (**Figura 56**). Durante todo o período de amostragem os valores de densidade mantiveram-se sempre muito baixos

(com exceção do valor registado em abril de 2019, para a grelha 1), sem crescimento populacional nos meses de primavera, onde foi inclusive registado o menor valor de densidade (junho 2019).

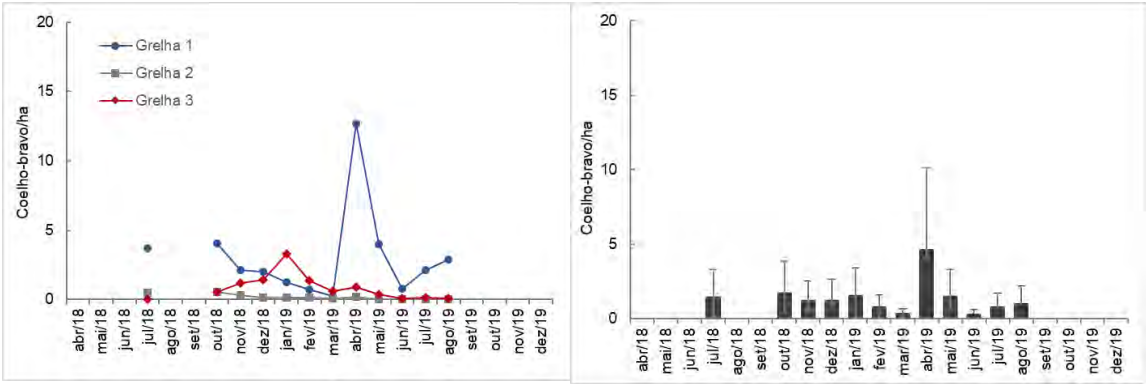


Figura 56. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita), para julho de 2018 e de outubro de 2018 a agosto de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo BNV.

Quanto à **monitorização de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo BNV, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, (**Figura 57**; **Tabela 42**). A densidade estimada para a área de estudo BNV ao longo do período de monitorização apresentou um decréscimo gradual, variando dos 0,2 ± 0,19 coelho-bravo/ha (registado em março 2018) a 0,01 ± 0,01 coelho-bravo/ha, estimados para os três últimos meses de amostragem, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados (probabilidade de estarem ativos durante a amostragem) de 0,88±0,22. Apesar dos baixos valores de erro padrão há que ter em consideração que os últimos cinco meses não foram amostrados e a densidade apresentada é uma estimativa resultante da modelo estatístico gerado.

A dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo apresenta-se coerente com o observado nos núcleos populacionais durante o período amostrado (com excepção, como já referido anteriormente, do mês de abri de 2019 para a grelha 1).

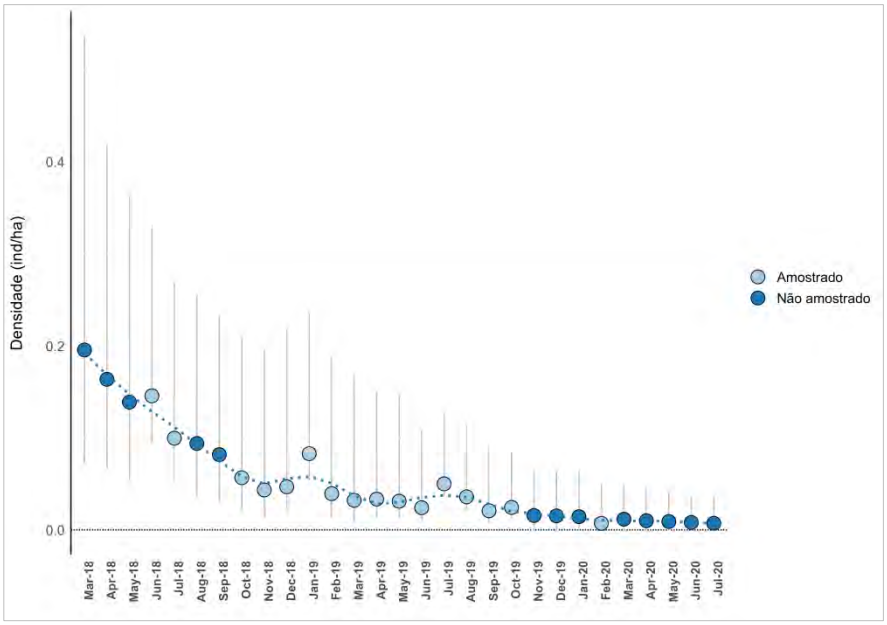


Figura 57. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo BNV.

Tabela 42. Valores de densidade populacional média ± erro médio estimado para cada mês através da metodologia de contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo BNV.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,2±0,19	[0,07-0,54]
	Abril*	0,16±0,15	[0,07-0,42]
	Maio*	0,14±0,12	[0,05-0,36]
	Junho	0,15±0,09	[0,01-0,33]
	Julho	0,1±0,09	[0,05-0,27]
	Agosto*	0,09±0,08	[0,04-0,25]
	Setembro*	0,08±0,07	[0,03-0,23]
	Outubro	0,06±0,06	[0,02-0,21]
	Novembro	0,04±0,06	[0,01-0,20]
	Dezembro	0,05±0,06	[0,02-0,22]
2019	Janeiro	0,08±0,05	[0,05-0,24]
	Fevereiro	0,04±0,05	[0,01-0,19]
	Março	0,03±0,04	[0,01-0,17]
	Abril	0,03±0,04	[0,01-0,15]
	Maio	0,03±0,03	[0,01-0,15]
	Junho	0,02±0,03	[0,01-0,11]
	Julho	0,05±0,02	[0,04-0,13]
	Agosto	0,04±0,03	[0,02-0,11]
	Setembro	0,02±0,02	[0,01-0,09]
	Outubro	0,02±0,02	[0,01-0,09]
	Novembro*	0,02±0,02	[0-0,06]
	Dezembro*	0,02±0,02	[0-0,06]
2020	Janeiro*	0,01±0,02	[0-0,06]
	Fevereiro	0,01±0,02	[0-0,05]
	Março*	0,01±0,02	[0-0,05]
	Abril*	0,01±0,02	[0-0,05]
	Maio*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Junho*	0,01±0,01	[0-0,04]
	Julho*	0,01±0,01	[0-0,04]

*estimativa para meses não amostrados

De referir que a área de estudo de BNV apresentava em 2015 uma abundância de coelho-bravo mais elevada (Monterroso *et al*, 2016) chegando a atingir valores de densidade de 3,6 coelho-bravo/ha, aquando amostrada no âmbito do projeto SOS Coelho. Destaca-se assim a importância de uma monitorização consistente e prolongada no tempo, para deteção de quebras populacionais e seus fatores, para uma eficiente e atempada gestão das populações.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo foram analisadas duas amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, ambas apresentado resultado negativo.

Montemor-o-Novo (MTN) - ZCA das Herdades da Abrunheira, Paço do Aragão e outras

A monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais de Montemor-o-Novo foi feita de junho de 2018 a março de 2019, com densidade média mais elevada registada em julho (2

coelho-bravo/ha). Apesar de se ter registado um crescimento populacional na grelha 3 no início da amostragem, ao longo do tempo a densidade tendeu a ser semelhante para as três grelhas amostradas. A taxa de crescimento foi positiva, com um aumento de junho para julho de 2018, contudo desde então a densidade tendeu sempre a diminuir, embora com ligeiras flutuações (**Figura 58**). O valor de densidade média registada para esta zona de caça, tendo em conta todos os meses amostrados, foi de apenas 1,1 coelho-bravo/ha.

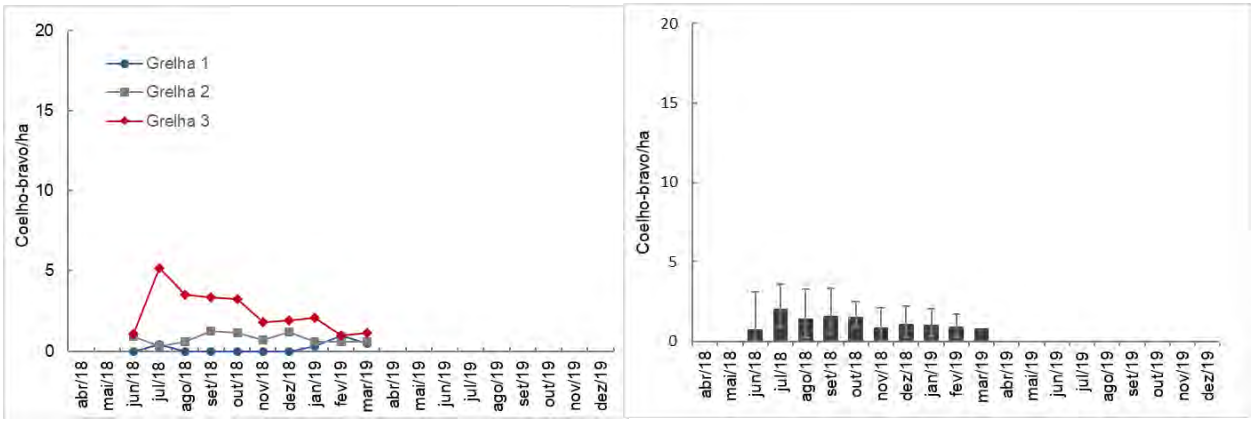


Figura 58. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) de junho de 2018 a março de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo MTN.

Relativamente à **monitorização de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo MTN, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de abril de 2018 a julho de 2020, (**Figura 59**, **Tabela 43**). A densidade estimada para a área de estudo MTN ao longo do período de monitorização sofreu um decréscimo gradual ao longo do período amostrado, variando dos 0,45 ± 0,19 coelho-bravo/ha (estimado para abril 2018) a 0,01 ± 0,01, estimados para os dois últimos meses de amostragem, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,76±0,38.
Apesar dos baixos valores de erro padrão há que ter em consideração que os últimos 10 meses não foram amostrados e a densidade apresentada é uma estimativa resultante da modelo estatístico gerado.
A dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo apresenta-se congruente com o observado nos núcleos populacionais durante o período amostrado.

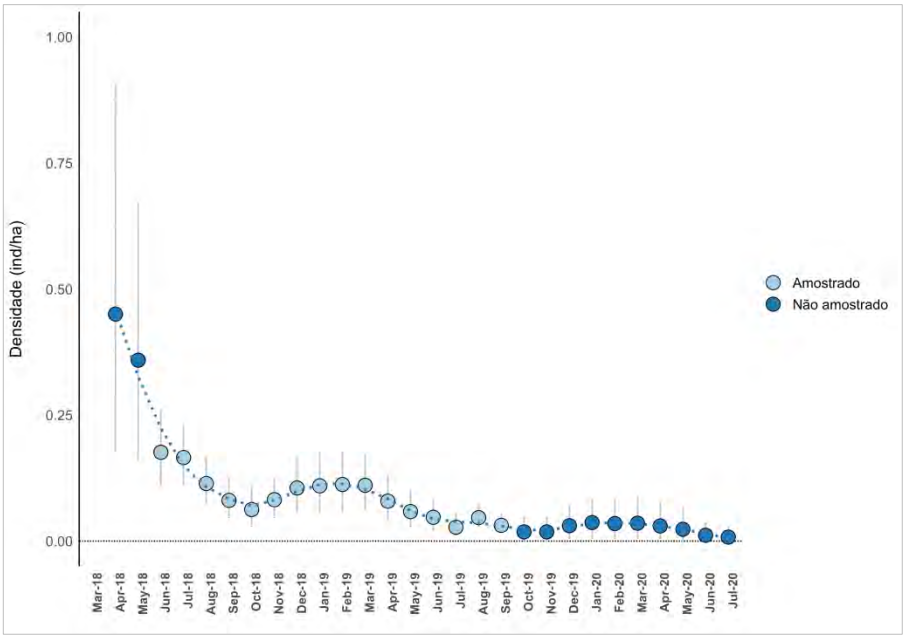


Figura 59. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de abril de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MTN.

Tabela 43. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MTN.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março	ne	ne
	Abril*	0,45±0,19	[0,18-0,91]
	Maio*	0,36±0,13	[0,16-0,67]
	Junho	0,18±0,04	[0,11-0,26]
	Julho	0,17±0,03	[0,11-0,23]
	Agosto	0,11±0,02	[0,08-0,16]
	Setembro	0,08±0,02	[0,05-0,12]
	Outubro	0,06±0,02	[0,03-0,11]
	Novembro	0,08±0,02	[0,05-0,12]
	Dezembro	0,11±0,03	[0,06-0,16]
2019	Janeiro	0,11±0,03	[0,06-0,18]
	Fevereiro	0,11±0,03	[0,06-0,18]
	Março	0,11±0,03	[0,06-0,17]
	Abril	0,08±0,02	[0,04-0,13]
	Maio	0,06±0,02	[0,03-0,10]
	Junho	0,05±0,01	[0,02-0,08]
	Julho	0,03±0,01	[0,01-0,05]
	Agosto	0,05±0,01	[0,03-0,07]
	Setembro	0,03±0,01	[0,02-0,05]
	Outubro*	0,02±0,01	[0,00-0,05]
	Novembro*	0,02±0,01	[0,00-0,05]
	Dezembro*	0,03±0,02	[0,00-0,07]
2020	Janeiro*	0,04±0,02	[0,00-0,08]
	Fevereiro*	0,03±0,02	[0,00-0,08]
	Março*	0,04±0,02	[0,00-0,09]
	Abril*	0,03±0,02	[0,00-0,08]
	Maio*	0,02±0,02	[0,00-0,06]
	Junho*	0,01±0,01	[0,00-0,04]
	Julho*	0,01±0,01	[0,00-0,03]

ne – não estimado; *estimativa para meses não amostrados

Ao longo do período de amostragem foram analisadas amostras para pesquisa de RHDV2, das quais se obteve resultados positivo em 44, das 51 amostras analisadas de cadáveres detetados na área de estudo, e resultado negativo em todas as 32 amostras provenientes de coelhos caçados.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo, foram analisadas 47 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentado 46,5% das amostras resultado positivo.

Na presente área de estudo foi também realizado duas amostragens em 2020, para estimativa de densidades de lebre-ibérica. Contudo, devido ao baixo número de observações e às poucas áreas de estudo com amostragem para este fim, não foi possível desenvolver modelos de estimativa de densidades, sendo por isso apenas apresentado o valor do cálculo do índice quilométrico de abundância (IQA) (**Tabela 44**).

Tabela 44. Valores de IQA em fevereiro de 2020 e em julho de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total para lebre-ibérica, na área de estudo MTN.

	Lebre ibérica		
	km	Fev 20	Jul 20
Réplica 1	19.627	0,30	0,25
Réplica 2	19.627	0,40	0,15
Réplica 3	19.627	0,20	0,25
Valor médio		0,30	0,25

Estremoz (EST) - ZCT do Monte de Cima

A monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais de Estremoz foi efetuada de julho de 2018 a outubro de 2019 (**Figura 60**). As populações das três grelhas monitorizadas, apresentaram tendência idêntica, apesar de se registar sempre maior densidade na grelha 3. Com uma amostragem continua ao logo de 16 meses, foi possível observar as variações entre meses ao longo que mais um ano de amostragem. Assim com uma densidade de cerca de 64 coelho-bravo/ha em julho e agosto de 2018, verificou-se uma diminuição da densidade após a época de máximo populacional que se observou até janeiro de 2019 (7,8 coelho-bravo/ha). Contrariamente ao esperado o mês de fevereiro não foi o mês com menor densidade e sim a partir do qual a população começou (com algumas flutuações) a aumentar o seu efetivo populacional atingindo o máximo em setembro de 2019 com aproximadamente 84 coelho-bravo/ha.

A densidade populacional média tendo em conta todos os meses de amostragem para esta área de estudo foi de 36,2 coelho-bravo/ha (**Figura 60**).

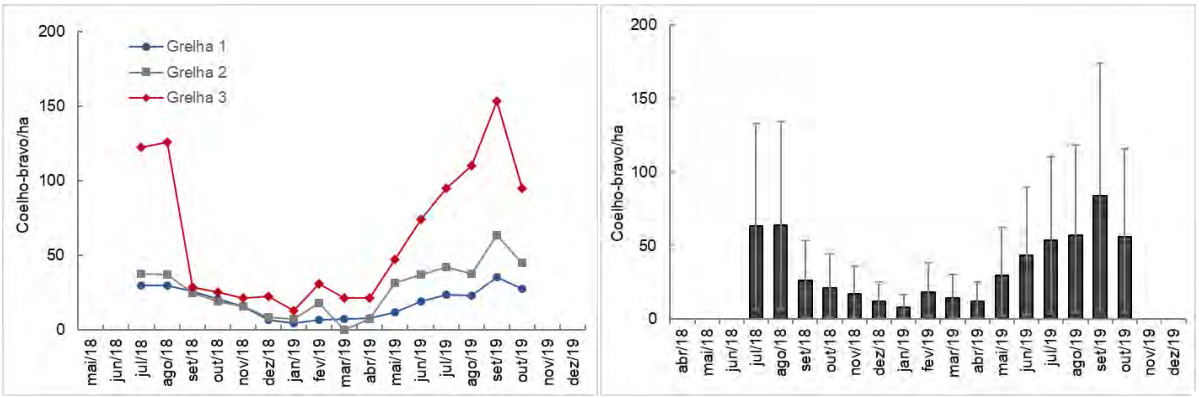


Figura 60. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico superior) e a média entre todas as grelhas (gráfico inferior) entre julho de 2018 e outubro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo EST.

Quanto à **monitorização de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo EST, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, (**Figura 61**, **Tabela 45**). A densidade estimada para a área de estudo EST ao longo do período de monitorização parece apresentar uma tendência geral de decréscimo com flutuações inter-

anuais, variando dos 0,79 ± 0,04 coelho-bravo/ha (estimado para agosto de 2018) a 0,43 ± 0,04, estimados para julho de 2020 (o último mês amostrado), com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 1±0,02.

A dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo foi coerente com o observado nos núcleos populacionais durante o período amostrado, com decréscimo populacional de julho/agosto de 2018 a novembro de 2018 (**Figura 61**; **Tabela 45**). Esta fase foi sucedida de um crescimento populacional até agosto/setembro de 2019, embora com valores ligeiramente mais baixos que os estimados para o período de máximo populacional referente ao ano anterior.

Comparativamente com as restantes áreas de estudo, importa referir que a área de estudo EST, foi das que apresentou estimativas de densidades mais elevadas (ver **Tabela 40**), contudo a realização de amostragem nos últimos meses de monitorização teria permitido uma estimativa da densidade mais robusta e a inferir sobre o decréscimo registado até julho de 2020.

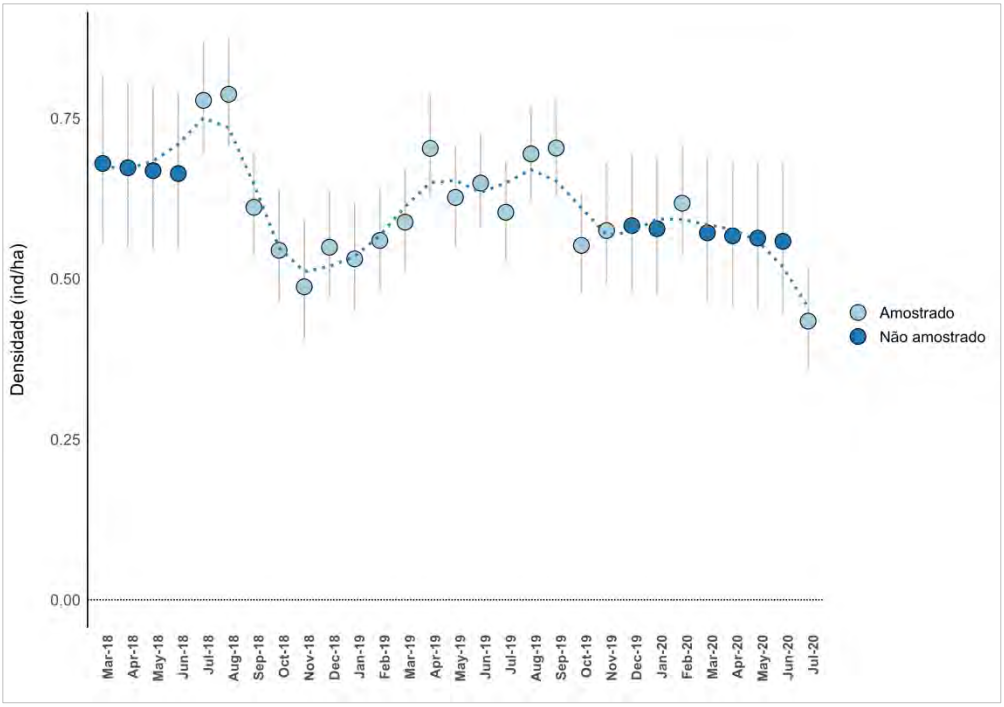


Figura 61. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo EST.

Tabela 45. Valores de densidade populacional média ± erro médio estimado para cada mês através da metodologia de contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo EST.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,68±0,07	[0,56-0,82]
	Abril*	0,67±0,06	[0,55-0,80]
	Maio*	0,67±0,06	[0,55-0,80]
	Junho*	0,66±0,06	[0,55-0,79]
	Julho*	0,78±0,04	[0,70-0,87]
	Agosto	0,79±0,04	[0,71-0,87]
	Setembro	0,61±0,04	[0,54-0,69]
	Outubro	0,54±0,04	[0,47-0,64]
	Novembro	0,49±0,05	[0,41-0,59]
	Dezembro	0,55±0,04	[0,47-0,63]
2019	Janeiro	0,53±0,04	[0,45-0,62]
	Fevereiro	0,56±0,04	[0,48-0,64]
	Março	0,59±0,04	[0,51-0,67]
	Abril	0,70±0,04	[0,63-0,79]
	Maio	0,63±0,04	[0,55-0,71]
	Junho	0,65±0,04	[0,58-0,72]
	Julho	0,60±0,04	[0,53-0,68]
	Agosto	0,69±0,04	[0,62-0,77]
	Setembro	0,70±0,04	[0,63-0,78]
	Outubro	0,55±0,04	[0,48-0,63]
	Novembro	0,57±0,05	[0,49-0,68]
	Dezembro*	0,58±0,05	[0,48-0,69]
2020	Janeiro*	0,58±0,05	[0,48-0,69]
	Fevereiro	0,62±0,04	[0,54-0,71]
	Março*	0,57±0,06	[0,47-0,69]
	Abril*	0,57±0,06	[0,46-0,68]
	Maio*	0,56±0,06	[0,45-0,68]
	Junho*	0,56±0,06	[0,45-0,68]
	Julho	0,43±0,04	[0,36-0,51]

*estimativa para meses não amostrados

Ao longo do período de amostragem foram analisadas amostras para pesquisa de RHDV2, das quais se obteve resultados positivo em 5, das 6 amostras analisadas de cadáveres detetados na área de estudo em 2018, e resultado negativo em todas as 88 amostras provenientes de coelhos caçados em 2018 e 2019.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo foram também analisadas 71 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentado 40,8% das amostras resultado positivo.

Na presente área de estudo foi também realizado duas amostragens, em 2020, para estimativa de densidades de lebre-ibérica (**Tabela 46**). Contudo, como já acima referido, devido ao baixo número de observações e às poucas áreas de estudo com amostragem para este fim, não foi possível desenvolver modelos de estimativa de densidades, sendo por isso apenas apresentado o valor do cálculo do índice quilométrico de abundância.

Tabela 46. Valores brutos de contagem de lebres em fevereiro de 2020 e em julho de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total do número de animais contabilizados em cada réplica, para a área de estudo EST.

		Lebre-ibérica	
	km	Fev 20	Jul 20
Réplica 1	9.745	0,51	0,61
Réplica 2	9.745	0,30	0,30
Réplica 3	9.745	0,41	0,41
Valor médio		0,41	0,44

Ferreira do Alentejo (FAL) – ZCT das Cortes

A monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais nesta área de estudo foi realizada entre maio e julho de 2018 e posteriormente de novembro de 2918 a junho de 2019 (**Figura 62**). A tendência da densidade populacional nas três grelhas monitorizadas foi semelhante ao longo de toda a amostragem, registando-se valores ligeiramente mais elevados na grelha 2 (**Figura 62**). A densidade populacional média variou entre os 21,1 e 62,6 coelho-bravo/ha, tendo-se registado o valor mais baixo durante o mês de fevereiro de 2019 e o mês mais elevado durante o mês de novembro de 2018 (**Figura 62**).

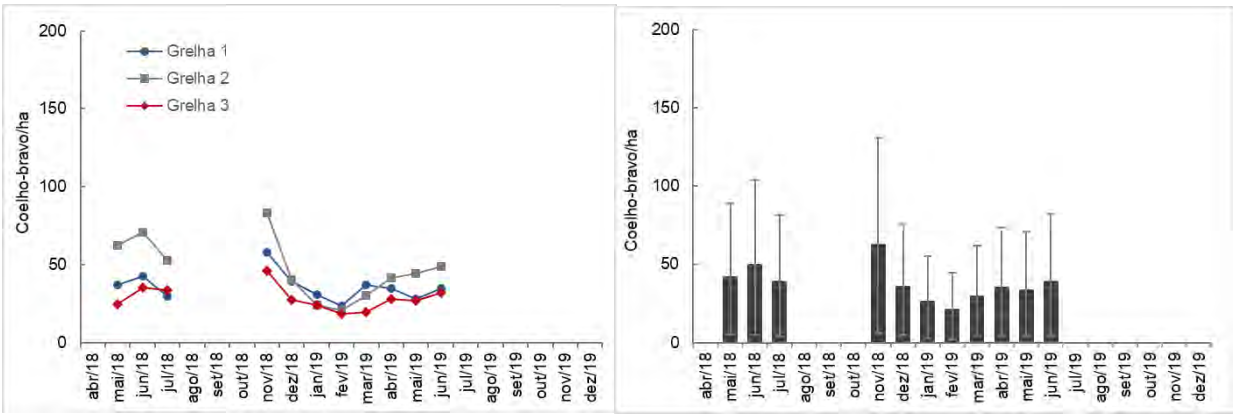


Figura 62. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico superior) e a média entre todas as grelhas (gráfico inferior) entre maio e julho de 2018, e entre novembro de 2018 e junho de 2019, com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo FAL.

Relativamente à **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo FAL, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, (**Figura 63**; **Tabela 47**). Os valores de densidade estimados variam

0,93 ± 0,4, estimado para julho 2018, a 0,36 ± 0,03 estimado para outubro 2018, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,76±0,39. A população apresenta dois picos de densidade bem marcados, um em julho de 2018 e outro em junho de 2019, correspondendo ao fim da época reprodutiva ao incremento de novos indivíduos na população.

A dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo apresenta-se ligeiramente diferente do observado nos núcleos populacionais durante o período amostrado, sugerindo que os núcleos avaliados não deverão influenciar diretamente a dinâmica da meta-população (**Figura 62 e Figura 63**).

Comparativamente com as restantes áreas de estudo, importa referir que a área de estudo FAL foi das que apresentou estimativas de densidades mais elevadas (ver **Tabela 40**), mas os resultados sugerem uma tendência de decréscimo que deverá ser confirmada com amostragem para recolha de dados.

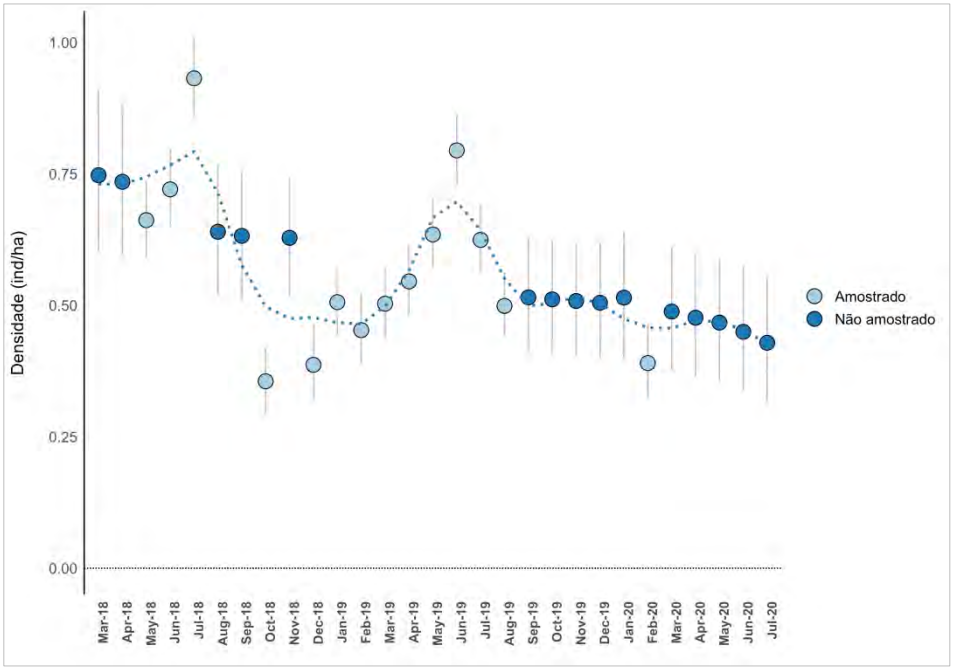


Figura 63. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo FAL. Ver legenda anteriores.

Tabela 47. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo FAL.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,75±0,08	[0,60-0,91]
	Abril*	0,73±0,07	[0,60-0,88]
	Maio	0,66±0,04	[0,59-0,73]
	Junho	0,72±0,04	[0,65-0,80]
	Julho	0,93±0,04	[0,86-1,01]
	Agosto	0,64±0,06	[0,52-0,77]
	Setembro	0,63±0,06	[0,51-0,75]
	Outubro	0,36±0,03	[0,30-0,42]
	Novembro	0,63±0,06	[0,52-0,74]
	Dezembro	0,39±0,04	[0,32-0,46]
2019	Janeiro	0,51±0,03	[0,44-0,57]
	Fevereiro	0,45±0,03	[0,39-0,52]
	Março	0,50±0,03	[0,44-0,57]
	Abril	0,55±0,03	[0,48-0,61]
	Maio	0,63±0,03	[0,57-0,70]
	Junho	0,79±0,03	[0,73-0,86]
	Julho	0,62±0,03	[0,57-0,69]
	Agosto	0,50±0,03	[0,44-0,56]
	Setembro*	0,51±0,05	[0,41-0,63]
	Outubro*	0,51±0,05	[0,41-0,62]
	Novembro*	0,51±0,06	[0,40-0,62]
	Dezembro*	0,50±0,06	[0,40-0,62]
2020	Janeiro*	0,51±0,06	[0,40-0,64]
	Fevereiro	0,39±0,03	[0,33-0,46]
	Março*	0,49±0,06	[0,38-0,61]
	Abril*	0,48±0,06	[0,37-0,60]
	Maio*	0,47±0,06	[0,36-0,59]
	Junho*	0,45±0,06	[0,34-0,57]
	Julho*	0,43±0,06	[0,32-0,55]

*estimativa para meses não amostrados.

Ao longo do período de amostragem foram analisadas amostras para pesquisa de RHDV2, das quais se obteve resultados positivo em uma amostra, das 2 amostras analisadas de cadáveres detetados na área de estudo para apenas o ano de 2018, e resultado negativo em todas as 41 amostras provenientes de coelhos caçados em 2018 e 2019.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo foram analisadas 27 amostras para analisar a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentado 55,5% das amostras resultado positivo.

Serpa (SRP) – ZCT de Vale Perditos

A monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais nesta área de estudo foi efetuada entre maio e julho de 2018 de forma continua e posteriormente pontualmente durante os meses de fevereiro, abril, julho e setembro de 2019 (**Figura 64**). As grelhas de monitorização apresentam entre si a mesma ordem de valores, não havendo grande variância entre si, tendo-se, contudo, observado os valores de densidade mais elevados na grelha 3 (**Figura 64**). A densidade populacional média variou entre os 104,1 e os 22,5 coelho-bravo/ha, em junho de 2018 e setembro de 2019, respetivamente. A tendência populacional foi de diminuir ao longo dos meses de amostragem em que uma amostragem de forma mais continua no tempo teria permitindo uma avaliação da flutuação ao longo dos meses de amostragem. O valor médio de densidade para os meses amostrados foi de 70.3 coelho-bravo/ha.

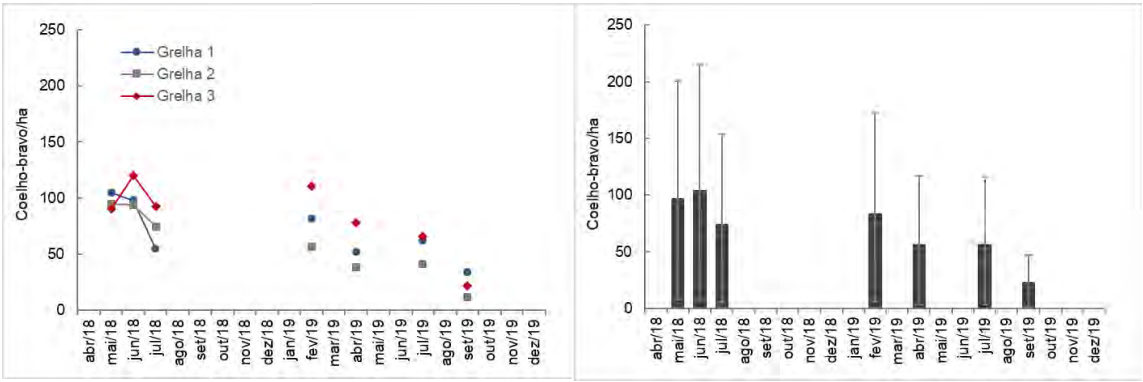


Figura 64. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre junho e julho de 2018 e posteriormente de forma pontual em fevereiro, abril, julho e setembro de 2019, com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo SRP.

Relativamente à **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo SRP, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, (**Figura 65; Tabela 48**). A densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização demonstra uma tendência de crescimento variando entre os 1,19 ± 0,17 estimado para novembro 2018, e os 1,8 ± 0,17 estimado para abril de 2019, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,79±0,06.

Os poucos meses amostrados e a falta de periodicidade regular tornam a tendência desta meta-população e dos núcleos populacionais de difícil análise e comparação (**Figura 64 e Figura 65**).

No entanto, comparativamente com as restantes áreas de estudo importa referir que a área de estudo SRP é a que apresentou uma estimativa de densidades, tanto para o núcleo populacional como para a meta-população, mais elevada (ver **Tabela 40**).

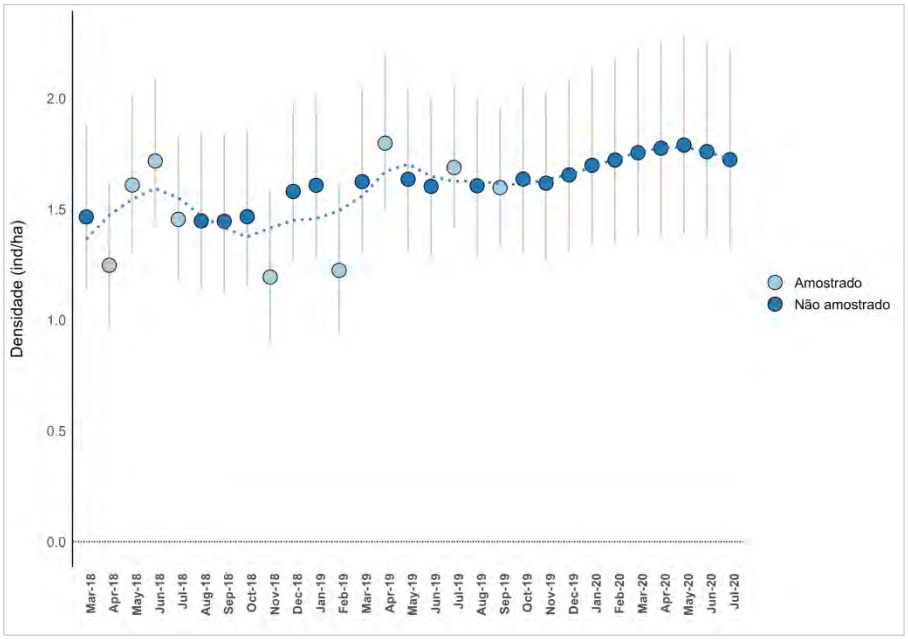


Figura 65. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo SRP.

Tabela 48. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo SRP.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	1,46±0,19	[1,14-1,88]
	Abril	1,25±0,16	[0,98-1,61]
	Maio	1,61±0,18	[1,3-2,01]
	Junho	1,72±0,16	[1,45-2,08]
	Julho	1,45±0,16	[1,19-1,82]
	Agosto*	1,45±0,18	[1,15-1,84]
	Setembro*	1,45±0,18	[1,13-1,83]
	Outubro*	1,47±0,18	[1,16-1,85]
	Novembro	1,19±0,17	[0,90-1,58]
	Dezembro*	1,58±0,18	[1,27-1,98]
2019	Janeiro*	1,61±0,18	[1,29-2,02]
	Fevereiro	1,22±0,17	[0,94-1,6]
	Março*	1,62±0,18	[1,31-2,04]
	Abril	1,80±0,17	[1,5-2,19]
	Maio*	1,63±0,18	[1,31-2,04]
	Junho*	1,60±0,18	[1,29-2,00]
	Julho	1,69±0,16	[1,42-2,06]
	Agosto*	1,61±0,18	[1,29-2,00]
	Setembro	1,60±0,16	[1,34-1,95]
	Outubro*	1,64±0,19	[1,31-2,05]
	Novembro*	1,62±0,19	[1,27-2,03]
	Dezembro*	1,65±0,19	[1,31-2,08]
2020	Janeiro*	1,70±0,20	[1,34-2,13]
	Fevereiro*	1,72±0,21	[1,36-2,17]
	Março*	1,75±0,21	[1,38-2,22]
	Abril*	1,77±0,22	[1,39-2,25]
	Maio*	1,79±0,23	[1,39-2,28]
	Junho*	1,76±0,22	[1,36-2,25]
	Julho*	1,72±0,23	[1,32-2,21]

*estimativa para meses não amostrados

Ao longo do período de amostragem foram analisadas amostras para pesquisa de RHDV2, das quais se obteve resultados positivo em 11 das 13 amostras analisadas em 2018, e em 5 das 6 amostras analisadas em 2019, de cadáveres detetados na área de estudo. Todas as 20 amostras provenientes de coelhos caçados, em 2018 e 2019, apresentaram resultado negativo para a presença de RHDV2.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo, foram analisadas 19 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentado 42% das amostras resultado positivo.

Mértola (MRT) – ZCT Corte de Gafo

A monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais nesta área de estudo foi realizada entre abril e julho de 2018 e posteriormente entre junho e agosto de 2019 (**Figura 66**). As grelhas de monitorização apresentam tendências idênticas durante os meses de amostragem com exceção para os meses de junho a julho, onde os valores de densidade diminuíram na grelha 3 e aumentaram na grelha 2 (**Figura 66**). A densidade populacional média variou entre os 3,6 e 9,1 coelho-bravo/ha, registados em julho de 2018. Comparando os meses de máximo populacional (junho e julho) entre 2018 e 2019, verificou-se uma diminuição da densidade média populacional de 8,4 para 5,6 coelho-bravo/ha. O valor médio de densidade para os meses amostrados foi de 5,6 coelho-bravo/ha. Uma amostragem contínua no tempo teria permitido uma melhor avaliação da diminuição da densidade populacional.

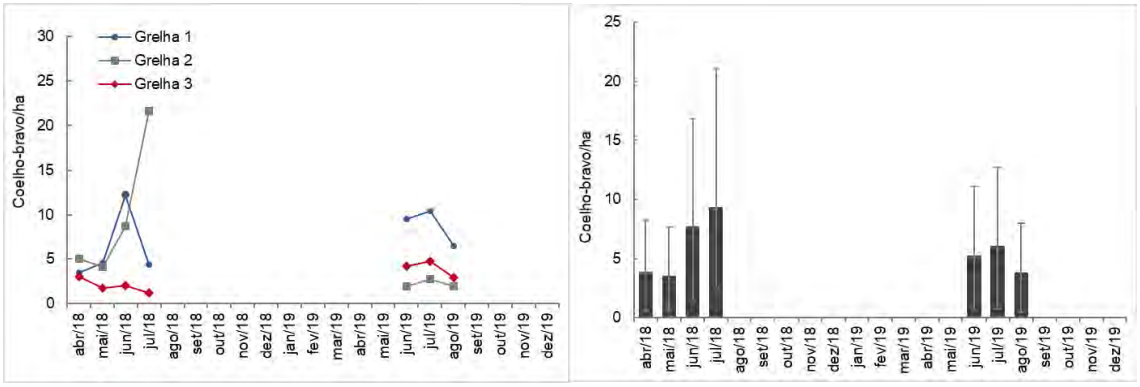


Figura 66. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre abril, maio e junho de 2018 e posteriormente entre junho e agosto de 2019 com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo MRT.

Quanto à **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo MRT, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, (**Figura 67; Tabela 49**). A densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização demonstra uma tendência de decréscimo com algumas flutuações variando entre os 0,35 ± 0,07, estimado para março de 2020, a 0,99 ± 0,13 estimado para julho 2018, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,70±0,41.

Apesar dos poucos meses amostrados e da falta de periodicidade regular na amostragem, verifica-se que a dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo foi coerente com o observado nos núcleos populacionais, com uma ligeira tendência de crescimento populacional de maio a junho de 2018 e de decréscimo de junho a agosto de 2019 (**Figura 66 e Figura 67**).

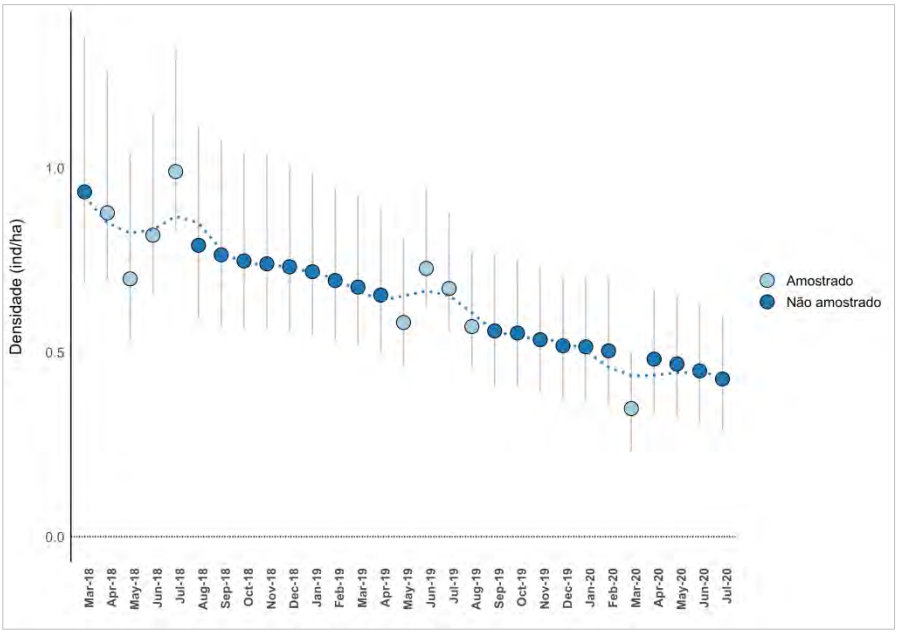


Figura 67. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MRT.

Tabela 49. Tabela 34 - Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MRT.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,94±0,17	[0,69-1,36]
	Abril	0,88±0,15	[0,70-1,26]
	Maio	0,70±0,13	[0,53-1,04]
	Junho	0,82±0,13	[0,66-1,14]
	Julho	0,99±0,13	[0,83-1,32]
	Agosto*	0,79±0,13	[0,59-1,11]
	Setembro*	0,76±0,13	[0,57-1,08]
	Outubro*	0,75±0,12	[0,57-1,04]
	Novembro*	0,74±0,12	[0,57-1,03]
	Dezembro*	0,73±0,11	[0,56-1,01]
2019	Janeiro*	0,72±0,11	[0,55-0,98]
	Fevereiro*	0,69±0,11	[0,53-0,94]
	Março*	0,68±0,10	[0,52-0,92]
	Abril*	0,66±0,10	[0,50-0,89]
	Maio	0,58±0,09	[0,47-0,81]
	Junho	0,73±0,08	[0,63-0,94]
	Julho	0,67±0,08	[0,56-0,88]
	Agosto	0,57±0,08	[0,46-0,77]
	Setembro*	0,56±0,09	[0,41-0,76]
	Outubro*	0,55±0,09	[0,41-0,75]
	Novembro*	0,53±0,08	[0,39-0,73]
	Dezembro*	0,52±0,08	[0,38-0,70]
2020	Janeiro*	0,52±0,08	[0,37-0,70]
	Fevereiro*	0,50±0,08	[0,36-0,70]
	Março	0,35±0,07	[0,23-0,50]
	Abril*	0,48±0,08	[0,34-0,67]
	Maio*	0,47±0,08	[0,33-0,65]
	Junho*	0,45±0,08	[0,31-0,63]
	Julho*	0,43±0,08	[0,29-0,60]

*estimativa para meses não amostrados

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo foram analisadas 10 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentando 30% destas, resultado positivo.

Na presente área de estudo foi realizada uma amostragem em 2020, para estimativa de densidades de lebre-ibérica (**Tabela 50**). Contudo, como já acima referido, devido ao baixo número de observações e às poucas áreas de estudo com amostragem para este fim, não foi possível desenvolver modelos de estimativa de densidades, sendo por isso apenas apresentado o valor do cálculo do índice quilométrico de abundância.

Tabela 50. Valores brutos de contagem de lebres em março de 2020, para cada réplica efetuada, e valor médio do total do número de animais contabilizados em cada réplica, para a área de estudo MRT.

		Lebre ibérica	
	Km	Mar 20	Jul 20
Réplica 1	9.745	0,10	na
Réplica 2	9.745	0	na
Réplica 3	9.745	0	na
Valor médio		0,03	na

Alcoutim (ALC) – ZCT Herdade do Pereiro

A Monitorização por contagem de excrementos dispersos dos núcleos populacionais nesta área de estudo foi realizada entre maio e julho de 2018 e entre dezembro de 2018 e setembro de 2019 (**Figura 68**). As grelhas de monitorização 1 e 3 apresentam tendências iguais ao longo dos três meses de amostragem registando-se um aumento populacional de maio a julho de 2018 e de dezembro de 2018 a junho de 2019, a partir do qual decresce. Já a grelha 2 apresenta sempre valores de densidade média relativamente baixos (**Figura 68**). A densidade populacional média variou entre os 2.4 coelho-bravo/ha registados em dezembro de 2018 e os 40,1 coelho-bravo/ha em junho de 2019. Comparando os meses de junho em ambos os anos, verifica-se um aumento de significativo. Contudo como não foram amostrados os meses de verão em 2018, não se sabe se o aumento populacional foi atingido mais tarde nesse ano. O valor médio de densidade para os meses amostrados foi de 13,3 coelho-bravo/ha.

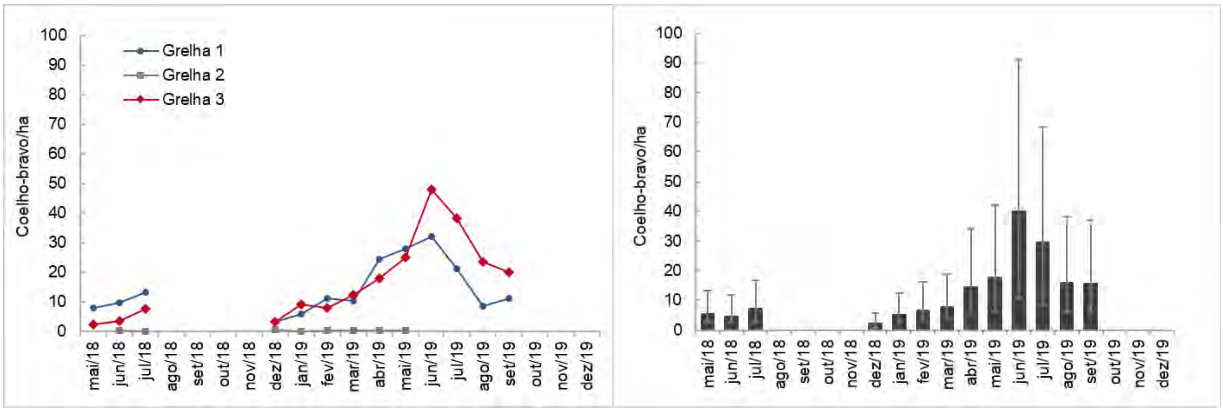


Figura 68. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre maio e julho de 2018 e entre dezembro de 2018 e setembro de 2019, com respetivo Intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo ALC.

Relativamente à **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo ALC, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020 (**Figura 69; Tabela 51**). A densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização apresenta numa tendência de decréscimo com algumas flutuações variando entre os 0,12 ± 0,02 estimado para novembro de 2019, a 0,50 ± 0,13 estimado para junho 2018, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,94 ± 0,12.

A dinâmica da meta-população de coelho-bravo na área de estudo foi coerente com o observado nos núcleos populacionais durante o período amostrado de 2019 (ano onde se amostrou um maior número de meses consecutivos), registando-se um aumento da densidade até junho de 2019 (final da época de reprodução e de incremento de novos indivíduos na população), com decréscimo populacional até setembro do mesmo ano (**Figura 68 e Figura 69**).

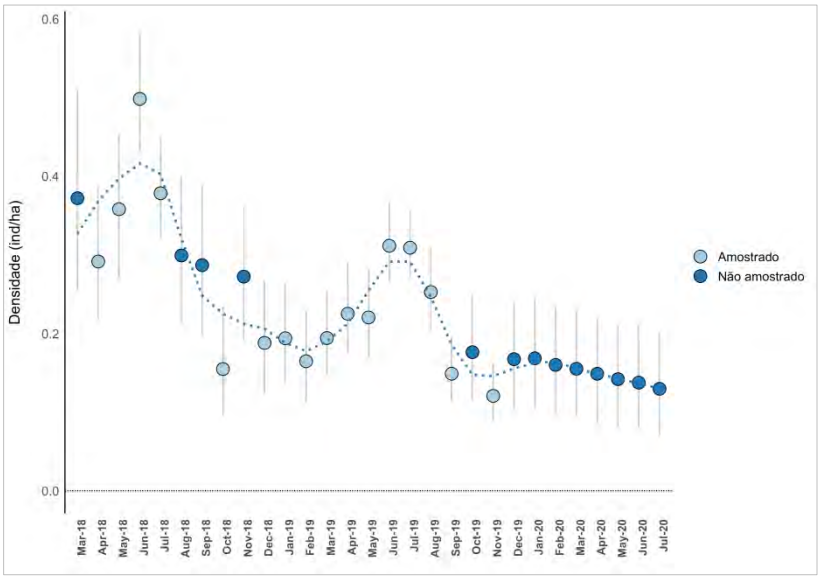


Figura 69. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo ALC.

Tabela 51. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo ALC.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,37±0,06	[0,26-0,51]
	Abril	0,29±0,04	[0,22-0,39]
	Maio	0,36±0,05	[0,27-0,45]
	Junho	0,50±0,04	[0,43-0,58]
	Julho	0,38±0,03	[0,32-0,45]
	Agosto*	0,30±0,05	[0,21-0,40]
	Setembro*	0,29±0,05	[0,20-0,39]
	Outubro	0,15±0,04	[0,10-0,23]
	Novembro*	0,27±0,04	[0,19-0,36]
	Dezembro	0,19±0,04	[0,12-0,27]
2019	Janeiro	0,19±0,03	[0,14-0,26]
	Fevereiro	0,16±0,03	[0,11-0,23]
	Março	0,19±0,03	[0,15-0,25]
	Abril	0,23±0,03	[0,18-0,29]
	Maio	0,22±0,03	[0,17-0,28]
	Junho	0,31±0,03	[0,27-0,37]
	Julho	0,31±0,02	[0,27-0,36]
	Agosto	0,25±0,03	[0,20-0,31]
	Setembro	0,15±0,02	[0,11-0,20]
	Outubro*	0,18±0,03	[0,11-0,25]
	Novembro	0,12±0,02	[0,09-0,16]
	Dezembro*	0,17±0,03	[0,10-0,24]
2020	Janeiro*	0,17±0,04	[0,10-0,24]
	Fevereiro*	0,16±0,03	[0,10-0,33]
	Março*	0,26±0,03	[0,10-0,23]
	Abril*	0,15±0,03	[0,09-0,22]
	Maio*	0,14±0,03	[0,08-0,21]
	Junho*	0,14±0,03	[0,08-0,21]
	Julho*	0,13±0,03	[0,07-0,20]

*estimativa para meses não amostrados

Ao longo do período de amostragem foram analisadas amostras para pesquisa de RHDV2, das quais se obteve resultado positivo em uma das quatro amostras analisadas em 2018. Todas as 18 amostras provenientes de coelhos caçados, em 2018 e 2019, apresentaram resultado negativo para a presença de RHDV2.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo, foram analisadas 15 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, apresentando apenas 15% destas, resultado positivo.

Tavira (TVR) – ZCA Cerro da Cabeça

A Monitorização por excrementos dispersos dos núcleos populacionais nesta área de estudo foi efetuada entre abril e julho de 2018 e posteriormente de dezembro de 2018 a fevereiro de 2019 (**Figura 70**). As três grelhas de amostragem apresentaram tendências iguais durante os meses amostrados, contudo a grelha 2 manteve os valores de densidade baixos e constantes (**Figura 70**). A densidade populacional média variou entre os 0,3 coelho-bravo/ha registados em abril e os 6,2 coelho-bravo/ha, registados em julho, contudo a falta de continuidade de amostragem impede uma avaliação das flutuações da densidade ao longo do tempo. O valor médio de densidade para os meses amostrados foi de apenas 2 coelho-bravo/ha.

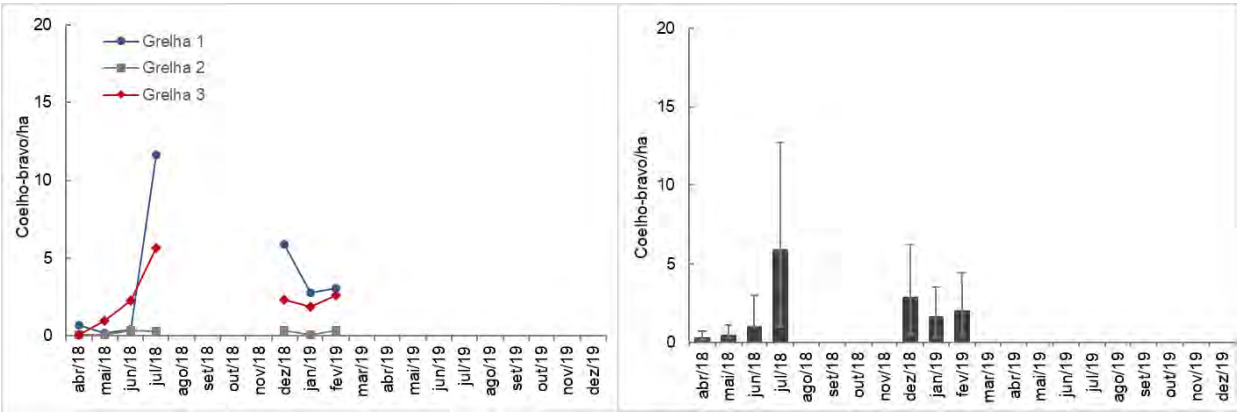


Figura 70. Valores da densidade média de coelho-bravo (coelhos/ha) em cada uma das grelhas avaliadas (gráfico à esquerda) e a média entre todas as grelhas (gráfico à direita) entre abril e junho e julho de 2018 e posteriormente entre dezembro de 2018 e fevereiro de 2019 com respetivo intervalo de confiança 95% associado, estimado por contagem de excrementos nas unidades de amostragem estabelecidas na área de estudo TVR.

Quanto à **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população da área de estudo TVR, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a março-julho de 2020 (**Figura 71; Tabela 52**). A densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização embora apresente valores baixos a população encontra-se estável e com uma ligeira tendência de aumento para os últimos meses estimados. Os valores das estimativas de densidade variam assim entre os 0,11 ± 0,03 estimados para abril e março de 2018 a 0,20 ± 0,05 estimado para julho 2020, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,89 ± 0,27.

Os poucos meses amostrados e a falta de periodicidade regular não torna possível analisar a tendência anual dos núcleos populacionais, impossibilitando assim a comparação com a tendência observada para a meta-população (**Figura 70 e Figura 71**).

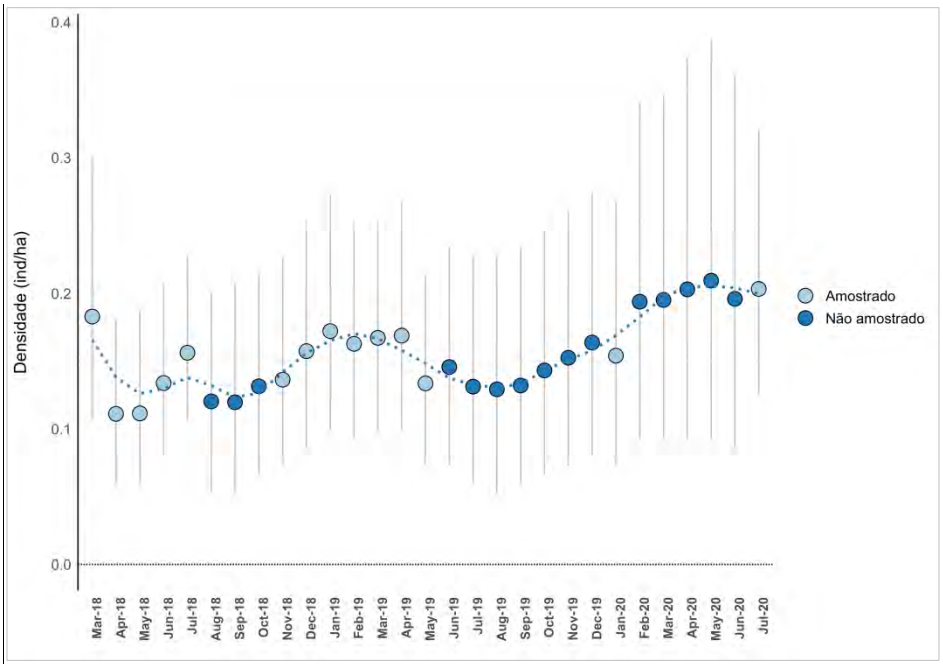


Figura 71. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo TVR.

Tabela 52. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo TVR.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,18±0,05	[0,11-0,30]
	Abril*	0,11±0,03	[0,06-0,18]
	Maio*	0,11±0,03	[0,06-0,19]
	Junho*	0,13±0,03	[0,08-0,21]
	Julho*	0,16±0,03	[0,11-0,23]
	Agosto	0,12±0,04	[0,05-0,20]
	Setembro	0,12±0,04	[005,-0,21]
	Outubro	0,13±0,04	[0,07-0,21]
	Novembro*	0,14±0,04	[0,07-0,23]
	Dezembro*	0,16±0,04	[0,09-0,25]
2019	Janeiro*	0,17±0,04	[0,10-0,27]
	Fevereiro*	0,16±0,04	[0,09-0,25]
	Março*	0,17±0,04	[0,10-0,25]
	Abril*	0,17±0,04	[0,10-0,27]
	Maio*	0,13±0,04	[0,07-0,21]
	Junho	0,15±0,04	[0,07-0,23]
	Julho	0,13±0,04	[0,06-0,23]
	Agosto	0,13±0,04	[0,05-0,23]
	Setembro	0,13±0,04	[0,06-0,23]
	Outubro	0,14±0,05	[0,07-0,25]
	Novembro	0,15±0,05	[0,07-0,26]
	Dezembro	0,16±0,05	[0,08-0,27]
2020	Janeiro*	0,15±0,05	[0,07-0,27]
	Fevereiro	0,19±0,06	[0,09-0,34]
	Março	0,20±0,06	[0,09-0,35]
	Abril	0,20±0,07	[0,09-0,37]
	Maio	0,21±0,07	[0,09-0,39]
	Junho	0,20±0,07	[0,09-0,36]
	Julho*	0,20±0,05	[0,13-0,32]

*estimativa para meses não amostrados

Para esta área de estudo não foram analisadas amostras para a presença de anticorpos contra a Doença com resultado conclusivo.

Mértola 2 (MRT2) – ZCA Moninho

No âmbito da aplicação da nova metodologia, um dos principais objetivos foi o de ampliar as áreas de estudo amostradas de modo não só aumentar o seu número como a ampliar a amostragem a nível de representatividade do país. Neste sentido foi adicionada a área de estudo MRT2.

Neste sentido, foi apenas realizada a **monitorização através de contagem de animais por distâncias** para a meta-população desta área de estudo. São apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, apesar de como já referido, esta área apenas ter sido incluída em 2020, com amostragem na época de mínimo e máximo populacional (**Figura 72; Tabela 53**).

Contudo, foi possível estimar os valores de densidade para a totalidade do período, devendo-se por isso ter cuidado na sua interpretação. Assim, a densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização, embora apresente valores baixos, a população encontra-se estável e com uma ligeira tendência de aumento. Os valores das estimativas para os meses amostrados variam, assim, entre os 0,29 ± 0,04 estimados para janeiro e 0,52 ± 0,05 estimado para julho de 2020, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,68 ± 0,41.

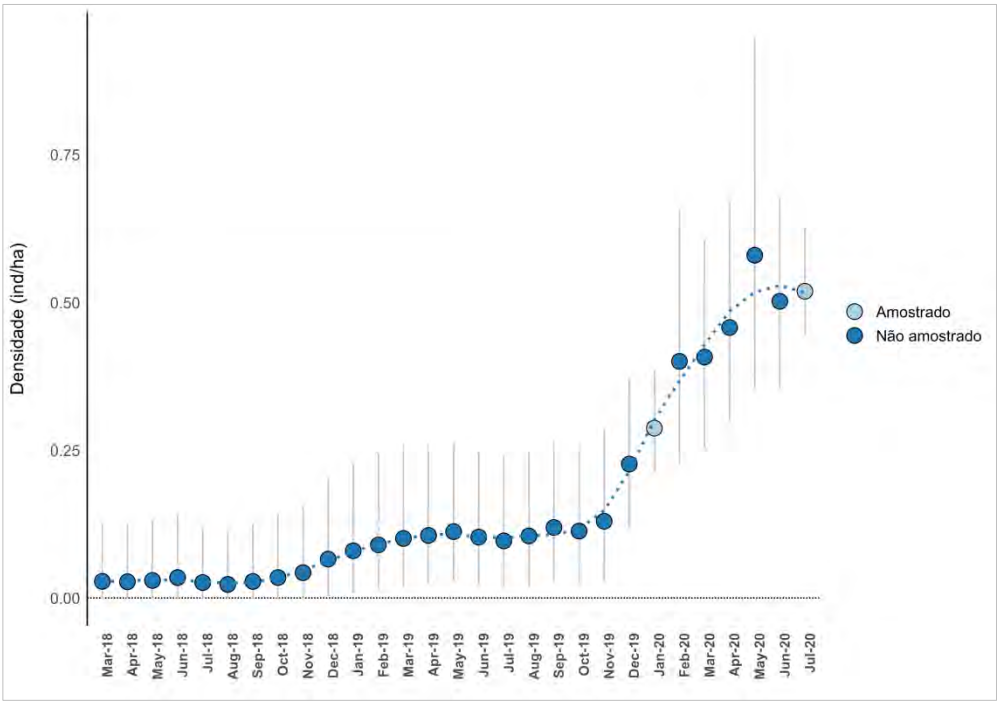


Figura 72. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MRT2.

Tabela 53. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MRT2.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,03±0,04	[0,00-0,12]
	Abril*	0,03±0,04	[0,00-0,12]
	Maio*	0,03±0,04	[0,00-0,13]
	Junho*	0,03±0,04	[0,00-0,14]
	Julho*	0,03±0,04	[0,00-0,12]
	Agosto*	0,02±0,03	[0,00-0,11]
	Setembro*	0,03±0,04	[0,00-0,12]
	Outubro*	0,03±0,04	[0,00-0,14]
	Novembro*	0,04±0,04	[0,00-0,16]
	Dezembro*	0,07±0,05	[0,00-0,20]
2019	Janeiro*	0,08±0,06	[0,01-0,23]
	Fevereiro*	0,09±0,06	[0,02-0,26]
	Março*	0,10±0,06	[0,02-0,26]
	Abril*	0,11±0,06	[0,02-0,26]
	Maio*	0,11±0,06	[0,03-0,26]
	Junho*	0,10±0,06	[0,02-0,24]
	Julho*	0,10±0,06	[0,02-0,24]
	Agosto*	0,10±0,06	[0,02-0,25]
	Setembro*	0,12±0,06	[0,03-0,26]
	Outubro*	0,11±0,06	[0,02-0,26]
	Novembro*	0,13±0,07	[0,03-0,28]
	Dezembro*	0,23±0,07	[0,12-0,37]
2020	Janeiro	0,29±0,04	[0,22-0,38]
	Fevereiro*	0,40±0,11	[0,23-0,66]
	Março*	0,41±0,09	[0,26-0,61]
	Abril*	0,46±0,09	[0,30-0,67]
	Maio*	0,58±0,15	[0,36-0,94]
	Junho*	0,50±0,08	[0,36-0,68]
	Julho	0,52±0,05	[0,44-0,62]

Ao longo do período de amostragem foi analisada uma amostra para pesquisa de RHDV2 proveniente de cadáver, a qual teve resultado negativo. Todas as 6 amostras provenientes de coelhos caçados, em 2018 e 2019, apresentaram resultado negativo para a presença de RHDV2.

No âmbito do +Coelho2, para a presente área de estudo foram analisadas apenas 4 amostras para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Hemorrágica, não apresentado qualquer delas um resultado positivo.

Montemor-o-Novo 2 (MTN2) – ZCA das Herdades da Abrunheira, Paço do Aragão e outras

Para a área de estudo MTN2, apesar de se encontrar na mesma zona de caça (ZCA das Herdades de Abrunheira, Paço do Aragão e outras), o percurso de amostragem sofreu algumas modificações, não sendo por isso comparável com a amostragem anteriormente realizada. Assim, são apresentados os valores de estimativa de densidade para o período de março de 2018 a julho de 2020, apesar de como já referido, esta área apenas ter sido incluída em 2020, com amostragem na época de mínimo e máximo populacional

(**Figura 73; Tabela 54**). Contudo, foi possível estimar os valores de densidade para a totalidade do período, devendo-se por isso que ter cautela na interpretação dos mesmos. Assim, a densidade estimada para a área de estudo ao longo do período de monitorização, embora apresente valores baixos, a população encontra-se estável e com uma ligeira tendência de aumento para os últimos meses estimados. Os valores das estimativas para os meses amostrados variam assim entre os 0,66 ± 0,09 estimados para fevereiro e 0,60 ± 0,09 estimado para o mês de julho de 2020, com uma disponibilidade média dos indivíduos para serem contados de 0,71 ± 0,41.

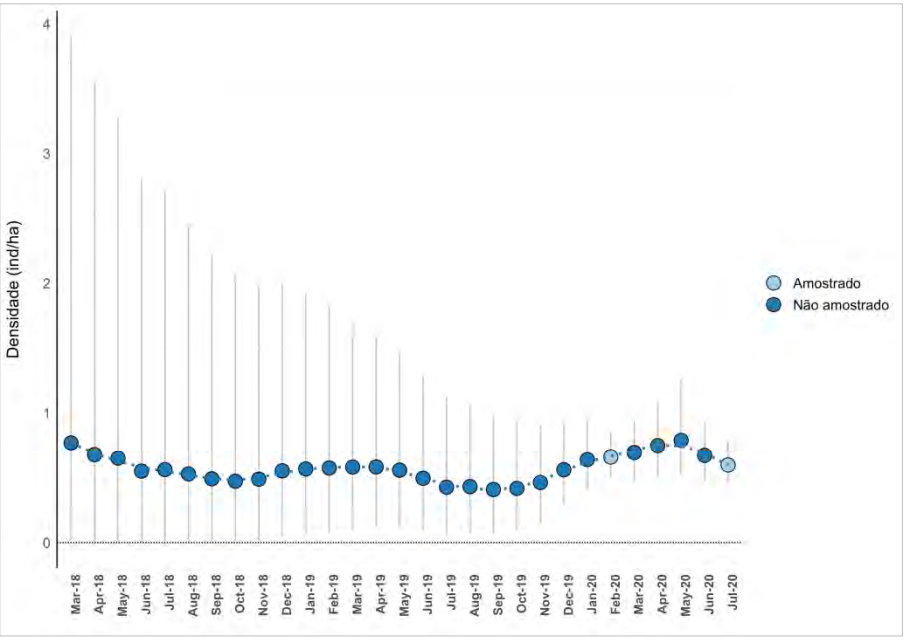


Figura 73. Representação gráfica da estimativa de densidade (indivíduos/ha) número da contagem realizada pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para os meses amostrados (azul claro) e não amostrados (azul escuro) no período de março de 2018 a julho de 2020, para a área de estudo MTN2.

Tabela 54. Valores de densidade populacional média ± erro médio [intervalo de confiança a 95%] estimado para cada mês através da pela metodologia da contagem por distâncias de coelho-bravo, para a área de estudo MTN2.

		Densidade	IC_{95}
2018	Março*	0,77±1,36	[0,02-3,90]
	Abril*	0,68±1,18	[0,01-3,54]
	Maio*	0,65±1,07	[0,01-3,28]
	Junho*	0,55±0,90	[0,01-2,80]
	Julho*	0,56±0,84	[0,02-2,70]
	Agosto*	0,53±0,75	[0,01-2,46]
	Setembro*	0,49±0,67	[0,01-2,21]
	Outubro*	0,47±0,60	[0,02-2,06]
	Novembro*	0,49±0,57	[0,02-1,97]
	Dezembro*	0,55±0,55	[0,05-1,99]
2019	Janeiro*	0,57±0,51	[0,07-1,91]
	Fevereiro*	0,58±0,47	[0,09-1,81]
	Março*	0,58±0,43	[0,10-1,69]
	Abril*	0,58±0,40	[0,12-1,60]
	Maio*	0,56±0,36	[0,12-1,45]
	Junho*	0,50±0,32	[0,10-1,28]
	Julho*	0,43±0,28	[0,07-1,11]
	Agosto*	0,43±0,26	[0,08-1,06]
	Setembro*	0,41±0,24	[0,08-0,97]
	Outubro*	0,42±0,22	[0,10-0,93]
	Novembro*	0,46±0,20	[0,15-0,90]
	Dezembro*	0,56±0,16	[0,30-0,91]
2020	Janeiro*	0,64±0,13	[0,41-0,93]
	Fevereiro	0,66±0,09	[0,51-0,84]
	Março*	0,69±0,12	[0,49-0,94]
	Abril*	0,75±0,15	[0,51-1,08]
	Maio*	0,79±0,19	[0,52-1,25]
	Junho*	0,67±0,12	[0,48-0,93]
	Julho	0,60±0,09	[0,48-0,78]

*estimativa para meses não amostrados

Avaliação da presença de anticorpos nas populações naturais das áreas em estudo

Relativamente aos resultados das análises serológicas efetuadas, 190 amostras referem-se às zonas de caça onde foi feita a monotorização das densidades populacionais (**Tabela 55**). Verificou-se que a percentagem mais elevada de positivos se encontra na área de estudo FAL (Ferreira do Alentejo), onde 56% da população amostrada apresenta anticorpos contra a doença viral hemorrágica. Considerando as áreas com cerca de 50% amostras positivas (com anticorpos), destaca-se a área de estudo de MNT (Montemor-o–Novo), e com 40% as áreas de estudo de SRP (Serpa) e EST (Estremoz). Nas restantes áreas a taxa de anticorpos é baixa, contudo em algumas delas o tamanho da amostra é bastante reduzido. De um modo geral, observa-se a tendência de quanto maior a densidade de coelho-bravo presente numa respetiva área de estudo, maior a percentagem de anticorpos, com exceção para a área de estudo MNT. Na área de estudo de MNT também se observou duas lebres com anticorpos contra a mixomatose, área esta onde se observou também um maior número de indivíduos infetados com esta doença.

Tabela 55. Amostras de Coelho-bravo e de Lebre-ibérica com análise serológica para a RHDV2, para cada área de estudo, com indicação de números absolutos de amostras com teste positivo e negativo para pesquisa de anticorpos, e respetiva percentagem.

	Coelho-bravo					Lebre-ibérica				
	Positivo	Negativo	Total	%Positivo	%Negativo	Positivo	Negativo	Total	%Positivo	%Negativo
PNF	na	na	na	**na**	na	na	na	na	na	na
BNV	0	2	2	**0**	100	0	0	0	0	0
MNT	20	23	43	**47**	53	2	2	4	50	50
EST	29	42	71	**41**	59	0	0	0	0	0
FAL	15	12	27	**56**	44	0	0	0	0	0
SRP	8	11	19	**42**	58	0	0	0	0	0
MRT	3	7	10	**30**	70	0	0	0	0	0
ALC	2	12	14	**14**	86	0	1	1	0	100
TVR	0	0	0	**0**	0	0	1	1	0	100
MRT2	0	4	4	**0**	100	0	0	0	0	0

Os resultados das avaliações demográficas mostram que existe uma elevada variabilidade na dinâmica das populações estudadas, verificando-se zonas com valores de densidade para a população local muito baixos como o verificado para a área de estudo BNV e MNT, comparativamente com as áreas de estudo de SRP, EST e FAL.

Das áreas de estudo analisadas desde o início da primeira fase do projeto +Coelho, observa-se uma tendência geral de diminuição das densidades populacional em quatro das áreas (PNF, BNV, MTN, MRT), em que três delas (PNF, BNV e MTN) a densidade encontra-se perto de valores de 0 coelhos/ha. Neste sentido é de extrema importância promover e fomentar as densidades nestas zonas.

Deve ser salientado que as áreas de estudo com maior densidade, são as que apresentam também as taxas mais elevadas de anticorpos contra a RHDV2. Contudo, ao longo das duas fases do projeto +Coelho (apesar de um aumento geral em quase todas as áreas) não se observa um aumento significativo de anticorpos suficiente para garantir a imunidade das populações naturais (**Figura 74**; Duarte *et al* 2018). Uma avaliação sistemática da prevalência do vírus nas populações naturais ao longo do tempo de amostragem das densidades e da quantidade de anticorpos é essencial para uma melhor análise da evolução das populações naturais.

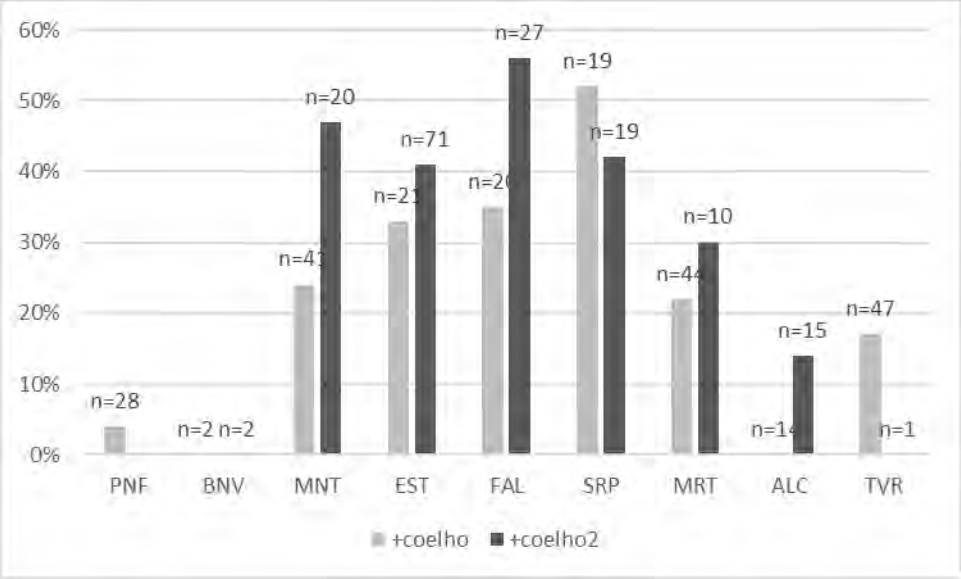


Figura 74. Amostras de Coelho-bravo com % de anticorpos para a RHDV2, para cada área de estudo, em cada uma das fases do projeto (+Coelho e +Coelho2).

Monitorização Demográfica e Epidemiológica Longitudinal de duas Populações-sentinela de coelho-bravo

O estudo tem por objetivo monitorizar, com periodicidade bimestral, os parâmetros demográficos de duas população-sentinela de coelho-bravo (tamanho de população e mortalidade) e, simultaneamente, os parâmetros epidemiológicos de vários agentes infeciosos e parasitários (prevalência, incidência e intensidade).

Metodologia

O desenho de estudo é de tipo corte longitudinal prospetivo, envolvendo a captura de coelhos bravos, marcação individual e recolha de amostras biológicas, a sua libertação e posterior recaptura. As áreas de estudo localizam-se na Companhia das Lezírias, Benavente (população em liberdade), e na Herdade da Coitadinha, Barrancos (população em semi-liberdade), selecionadas devido à disponibilidade de dados demográficos retrospetivos, e pelas condições logísticas. As armadilhas (n=55) estão instaladas na Companhia das Lezírias numa área de 13 hectares, principalmente ocupada por mato e montado de sobreiro (**Figura 75**).



Figura 75. Área de estudo na Companhia das Lezírias, situada na Silha do Matias, com a localização das armadilhas.

O cercado de estudo na Herdade da Coitadinha localiza-se no Resbaloso. As armadilhas (n=15) estão instaladas num cercado de aproximadamente 4 hectares, principalmente ocupado por mato e montado de azinheira.

A captura de coelhos bravos é efetuada com caixas-armadilha com isco, durante 2-4 noites em cada campanha (**Figura 76**).



Figura 76. Caixa armadilha Tomahawk™ iscada para captura de coelho bravo.

Os coelhos capturados são marcados com um *microchip* subcutâneo e são recolhidos vários dados (sexo, idade, estado reprodutivo, biometrias e número de ectoparasitas) e amostras biológicas (**Tabela 56**), para rastreio de macro e microparasitas e de parâmetros fisiológicos, sendo depois os animais libertados no local da sua captura (**Figura 77**).



Figura 77. Captura, manipulação para recolha de amostras e libertação de coelho bravo.

Tabela 56. Lista das amostras biológicas recolhidas de cada coelho bravo capturado. Para cada coelho, apenas é efetuada uma recolha de amostras por campanha de captura, independentemente do número de capturas desse indivíduo. A biópsia de orelha é recolhida apenas na primeira captura.

Amostra	Contentor	Quantidade indicada	Objetivo
Sangue total	Tubo com EDTA	0,20 ml [(1)]	Hemograma
Sangue total	Tubo de coagulação	1-2,5 ml [(1)]	DHV, Mixomatose (anticorpos)
Zaragatoa rectal	Simples	2	DHV, *Coxiella burnettii*
Zaragatoa oronasal	Simples	1	DHV
Zaragatoa conjuntival	Simples	1	Mixomatose
Fezes	Simples	Máximo	Helmintes e protozoários gastro-intestinais
Biópsia de orelha	Tubo com álcool 96%	1	Caracterização genética
Pelo	Simples	2 madeixas	Corticosterona
Carraças	Simples		Ectoparasitas
Pulgas	Simples		Ectoparasitas

[(1)] O volume total de sangue recolhido não pode ultrapassar 0,30% do peso total do animal

São também obtidas fotografias padronizadas para caracterização da pelagem de cada coelho. Paralelamente com as campanhas de captura de coelho bravo, são colocadas 3 armadilhas para recolha de insetos potenciais vetores de DHVv2.

Para os coelhos com <900g na primeira captura, foi estimada a data de nascimento com base na reta de regressão parametrizada para a subespécie *O. c. algirus* por Ferreira & Ferreira (2007).

Os parâmetros demográficos foram estimados utilizando modelos de tipo POPAN/ Jolly-Seber-Schwarz-Arnason, com sobrevivência, probabilidade de captura e abundância temporalmente variáveis. Os modelos foram implementados com recurso ao package "OpenCR" (Efford, 2018), no programa R (R Development Core Team, 2008) ou, alternativamente, implementados no programa Mark.

Com o objetivo de potenciar à recuperação do coelho-bravo na Companhia das Lezírias, foram efetuadas as análises genéticas e sanitárias dos coelhos bravos translocados de Alpiarça para o cercado do Monte do Bexiga (relatório em anexo). O objetivo foi o de fazer a translocação de animais certificados geneticamente como *O. c. algirus*, bem como com níveis de anticorpos para a DHV e mixomatose

Resultados

Capturas

Em 2020 foi efetuado um esforço de armadilhagem de 421 noites*armadilha na Companhia das Lezírias, distribuído por 9 noites, nos meses de maio, julho, setembro e dezembro. Foram efetuadas apenas 5 capturas de 5 coelhos-bravos individuais, e recolhidas 20 amostras biológicas (**Tabela 57**).

Tabela 57. Resumo das campanhas de captura efetuadas em 2020 na Companhia das Lezírias.

Campanha	Datas	Esforço (noites*armadilha)	Coelhos capturados			Amostras recolhidas
			Total	Juvenis	Recapturas	
Maio	22-24/mai	141	0	0	0	0
Julho	17-18/jul	94	3	0	1	12
Setembro	18-19/set	94	2	0	0	8
Dezembro	8-9/dez	92	0	0	0	0
Total		421	5	0	1	20

Na herdade da Coitadinha foi efetuado, em 2020, um esforço de captura de 225 noites*armadilha, distribuído por 15 noites, em março, maio, julho, setembro e novembro. Foram efetuadas 117 capturas de 75 coelhos- bravos e recolhidas 430 amostras biológicas (**Tabela 58**).

Tabela 58. Resumo das campanhas de captura efetuadas em 2020 na Herdade da Coitadinha.

Campanha	**Datas**	**Esforço (noites*armadilha)**	**Capturas**				**Amostras recolhidas**
			Total	**Nº coelhos**	**Juvenis**	**Recapturas**	
Março	4-6/mar	45	32	20	1	15	95
Maio	25-27/mai	45	38	30	15	16	146
Julho	14-16/jul	45	41	36	8	18	166
Setembro	20-22/set	45	6	6	0	5	23
Novembro	24-26/nov	45	0	0	0	0	0
Total		225	117	92	24	54	430

Parâmetros demográficos

Estimou-se a abundância de coelho-bravo nas zonas de estudo, para todas as campanhas de captura, confirmando-se a ausência de sinais de recuperação na época de reprodução de 2020, na Companhia das Lezírias (**Figura 78**).

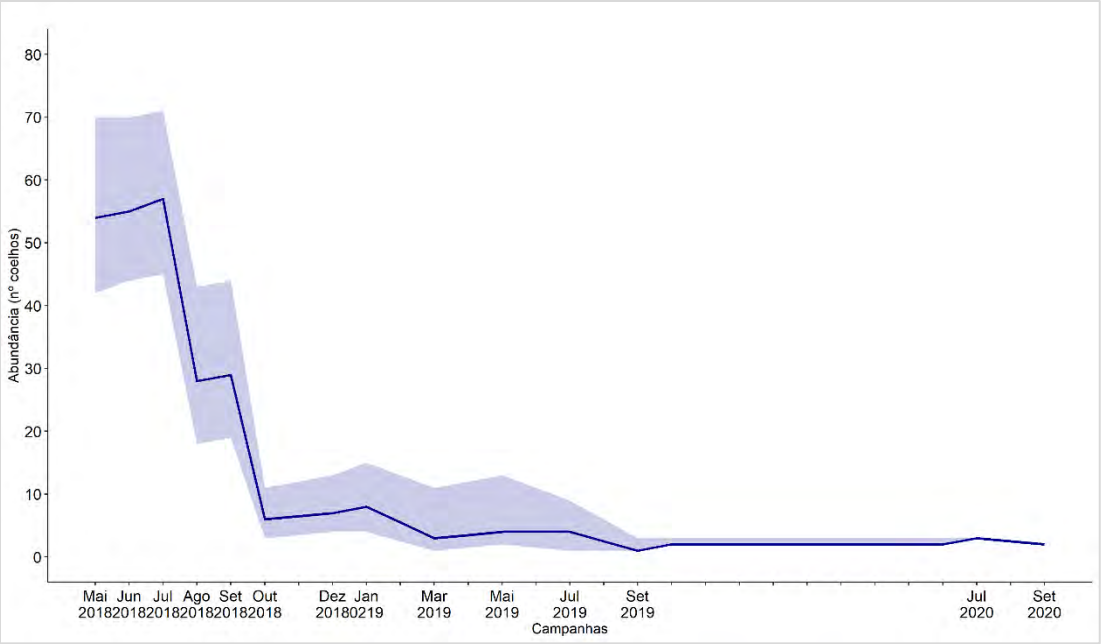


Figura 78. Abundância de coelho bravo estimada para a área de estudo da Companhia das Lezírias, com erro padrão, utilizando modelos POPAN.

Estimou-se a abundância de coelho-bravo no cercado do Resbaloso, Herdade da Coitadinha, em todas as campanhas de captura, com um mínimo de 27 ± 23 coelhos em outubro de 2019 e um máximo de 124 ± 22 coelhos em julho de 2020 (**Figura 79**).

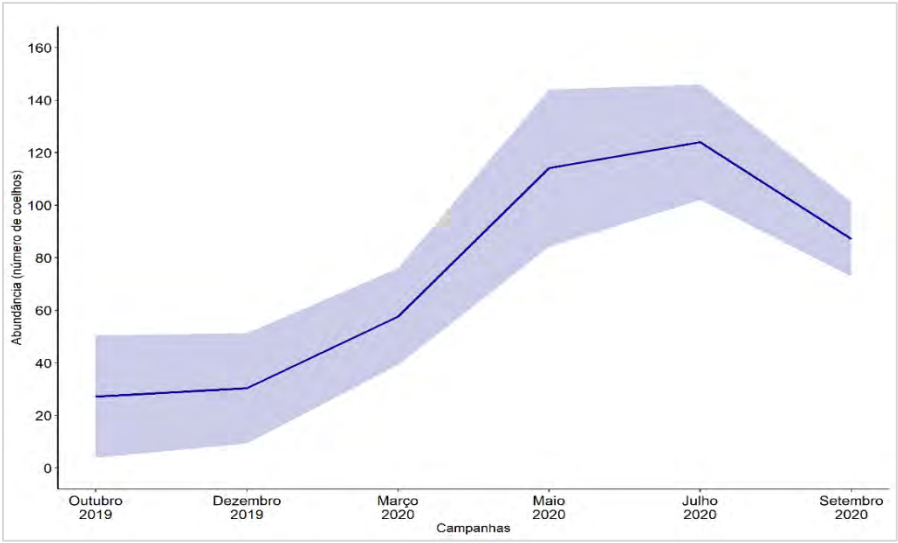


Figura 79. Abundância de coelho-bravo no cercado do Resbaloso, com erro-padrão. Abundância estimada utilizando modelos POPAN.

Os nascimentos dos coelhos para os quais foi possível estimar a respetiva data, concentram-se sobretudo nos meses de fevereiro e de abril (**Figuras 80** e **81**).

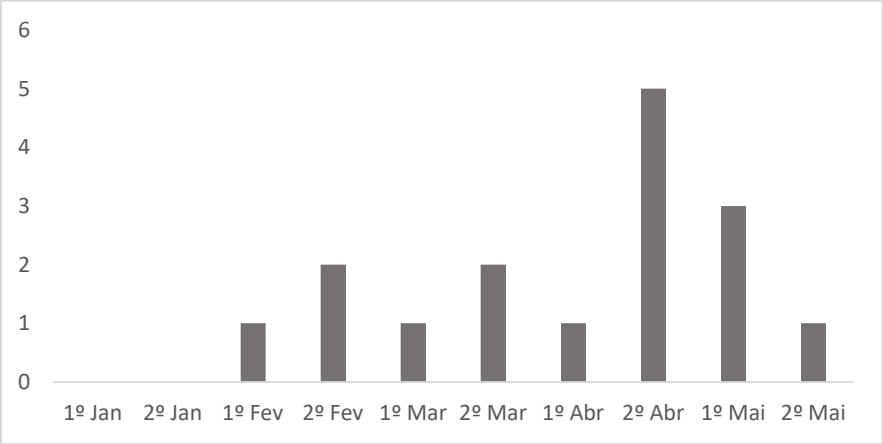


Figura 80. Quinzena de nascimento dos coelhos na área de estudo da Companhia das Lezírias, com <900g à primeira captura, estimadas com base no peso (Ferreira & Ferreira, 2014). Dados de 2018-2020 agrupados.

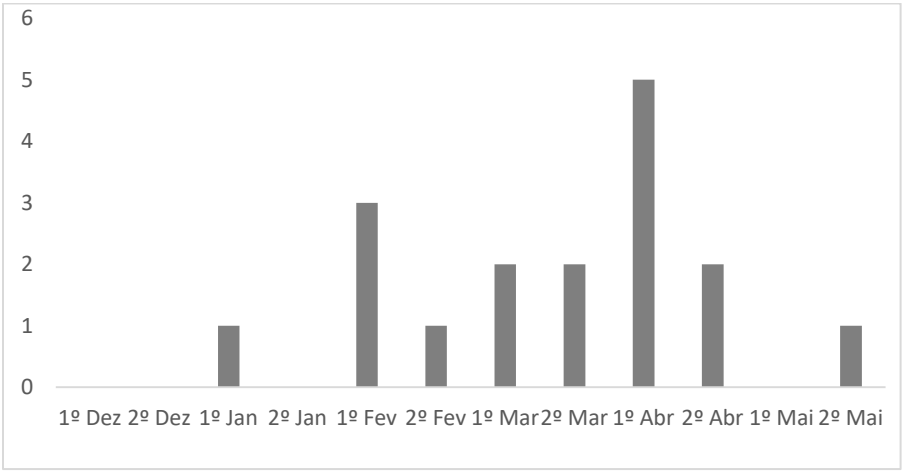


Figura 81. Número de coelhos bravos nascidos no cercado na Herdade da Coitadinha, por quinzena. Datas de nascimento estimadas com base no peso (Ferreira & Ferreira, 2014), para os coelhos com menos de 900g à captura. Dados de 2019 e 2020 agrupados.

A taxa de mortalidade no cercado do Resbaloso, entre outubro de 2019 e julho de 2020, foi estimada como nula, no entanto, detetou-se um pico de mortalidade entre julho e setembro de 2020, afetando apenas uma fração da população de coelhos (os coelhos que foram capturados apenas uma vez).

Parâmetros sanitários

Foram analisadas, até ao momento, 92 amostras fecais (**Tabela 59**) e 81 amostras de soro provenientes de coelhos capturados na Companhia das Lezírias (**Tabela 60**).

Tabela 59. Resumo dos resultados de excreção parasitária dos coelhos capturados na Companhia das Lezírias.

Grupo taxonómico	Endoparasitas	Prevalência (%)	Intensidade (ovos ou oocistos/g de fezes)
Nemátodes	Strongylidae gastro-intestinais	30,4 (22,0 – 40,6)	89 ± 160
	Oxiuridae	22,8 (15,5 – 32,4)	50 ± 50
	Trichuris sp.	1,0 (0,2 – 5,9)	n.a.
Céstodes	Anoplocephalidae	38,0 (28,8 – 48,3)	220 ± 480
Protozoários	*Eimeria* sp.	44,6 (34,8 – 54,7)	5.047 ± 16.182
Total		70,7 (60,7 – 79,0)	

Tabela 60. Seroprevalência de Mixomatose e Doença hemorrágica viral nos coelhos capturados na Companhia das Lezírias.

Parâmetro	Amostra	Seroprevalência (Intervalo de confiança 95%)
Mixomatose	81	65,4 (54,6 – 74,9)
Doença hemorrágica viral	81	29,6 (20,8 – 40,3)

Foram analisadas, até ao momento, 72 amostras fecais (**Tabela 61**) e 108 amostras de soro provenientes de coelhos capturados na Herdade da Coitadinha (**Tabela 62**).

Tabela 61. Resumo dos resultados de excreção parasitária dos coelhos capturados na Herdade da Coitadinha.

Grupo taxonómico	Endoparasitas	Prevalência (%)	Intensidade (ovos ou oocistos/g fezes)
Nemátodes	Strongylidae gastro-intestinais	41,7 (31,0 – 53,2)	391 ± 702
	Oxiuridae	9,7 (4,8 – 18,7)	84 ± 48
Céstodes	Anoplocephalidae	52,8 (41,4 – 63,9)	295 ± 736
Protozoários	*Eimeria* sp.	77,8 (66,9 – 85,8)	5.990 ± 21.228
Total		90,3 (81,3 – 95,2)	

Tabela 62. Seroprevalência de Mixomatose e Doença hemorrágica viral nos coelhos capturados na Herdade da Coitadinha.

Parâmetro	Amostras	Seroprevalência (intervalo de confiança 95%)
Mixomatose	108	53,7 % (44,3 – 62,8 %)
Doença hemorrágica viral	108	30,6 % (22,7 – 39,8 %)

Conclusões

Demografia

Na Companhia das Lezírias confirmou-se a ausência de sinais de recuperação populacional na época de reprodução de 2020. As estimativas de abundância de coelho-bravo em 2020 são pouco fiáveis, devido ao reduzido número de capturas, mas não ultrapassam os 3 coelhos na zona de estudo, no final da época de reprodução. A escassez de recapturas, devida à diminuição extrema da abundância, impediu o cálculo da taxa de mortalidade a partir de outubro de 2018.

A população de coelho-bravo no cercado do Resbaloso apresentou uma dinâmica populacional típica da espécie, com um máximo, em julho de 2020, cerca de 5x superior ao mínimo populacional, no outono de 2019. Os primeiros nascimentos parecem ter ocorrido apenas em Janeiro de 2020, não se tendo detetado criação de outono, possivelmente devido à situação de seca severa na zona de Barrancos ter persistido até novembro de 2019 (IPMA, 2019). A época de criação da primavera decorreu com normalidade. O cercado do Resbaloso manteve em 2020 uma alta densidade de coelho-bravo, de aproximadamente 20 coelhos/hectare em setembro.

As estimativas de mortalidade no cercado do Resbaloso sugerem que a mesma foi negligenciável, na maior parte do período analisado. No entanto, os modelos estatísticos apontam para um pico de mortalidade entre julho e setembro de 2020, abrangendo uma fração não identificada da população do cercado. Esta mortalidade pode ter sido devida a questões nutricionais no final do verão, ou a um surto de mixomatose que ocorreu por volta de junho de 2020.

Avaliação Sanitária

Ambas as populações estudadas apresentam valores de prevalência e intensidade de excreção de parasitas gastrointestinais habituais para coelho-bravo em Portugal.

Relativamente à Mixomatose, a seroprevalência de ambas a população estudadas situa-se abaixo do expectável, o que poderá eventualmente ser devido a uma menor exposição aos artrópodes vetores deste vírus.

No cercado do Resbaloso verificou-se a ocorrência de um surto de mixomatose (detetado através da seroconversão de vários coelhos), entre maio e julho de 2020. É possível que este surto tenha sido responsável pelo pico de mortalidade verificado entre julho e setembro de 2020, apesar do desfasamento temporal entre as seroconversões e a mortalidade.

Para a Doença hemorrágica viral, a seroprevalência em ambas as populações situa-se dentro dos valores que têm sido encontrados em populações de baixa densidade (Rouco *et al.*, 2018), o que sugere que estas

ainda não recuperaram do impacto da introdução da nova variante deste vírus, apresentando níveis de imunidade relativamente baixos, o que dificulta futuros aumentos de abundância.
No cercado do Resbaloso, a seroprevalência de Doença hemorrágica viral baixou consideravelmente entre 2019 e 2020, em resultado da não ocorrência de surtos desta doença neste período, encontrando-se agora ao nível do que é esperado para populações de baixa densidade. Esta população de coelho bravo encontra-se, portanto, vulnerável a um eventual futuro surto desta doença.

Perspetivas futuras

A continuação do estudo integrado demográfico e epidemiológico destas duas populações-sentinela permitirá, a longo prazo, a análise das interações entre a dinâmica populacional e o estado fisiológico e sanitário dos coelhos bravos. Perspetiva-se que será então possível identificar os fatores individuais, populacionais e ambientais que influenciam a dinâmica demográfica e epidemiológica desta espécie, o que permitirá desenhar planos detalhados de gestão populacional e de controlo sanitário. Estas intervenções serão implementadas primeiro, a título experimental, na população em semi-liberdade, e posteriormente, na população em liberdade, para aferir da sua eficácia na recuperação do coelho bravo em Portugal.

Nota:
Os dados obtidos no âmbito do OE.2, encontram-se ainda a ser trabalhados. Será feita uma adenda a este relatório assim que a análise estirver concluída.

Referências bibliográficas

Beldomenico PM, Begon M (2010) Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. Trends in Ecology & Evolution, 25(1): 21-27.

Branco, M., Ferrand, N. & Monnerot, M. Phylogeography of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. Heredity. 85, 307–317 (2000).

Branco, M. & Ferrand, N. Biochemical and Population Genetics of the Rabbit, Oryctolagus cuniculus, Carbonic Anhydrases I and II, from the Iberian Peninsula and France. Biochem. Genet. 41, 391–404 (2003).

Branco, M., Machado, J. C. & Ferrand, N. Extensive genetic polymorphism of peptidases A, B, C, and D, in wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) populations from the Iberian Peninsula. Biochem. Genet. 37, 237–249 (1999).

Carneiro M, Albert FW, Afonso S, Pereira RJ, Burbano H, Campos R, ... & Ferrand N (2014) The genomic architecture of population divergence between subspecies of the European rabbit. PLoS Genetics, 10(8), e1003519.

Carneiro, M. et al. Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. Science. 345, 1074 LP – 1079 (2014).

Carneiro, M. et al. The Genomic architecture of population divergence between subspecies of the European rabbit. Plos Genetics. 10, (2014).

Carneiro, M. et al. The genetic structure of domestic rabbits. Mol. Biol. Evol. 28, 1801–1816 (2011).

Delibes-Mateos M, Delibes M, Ferreras P, Villafuerte R (2008) Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. Conserv Biol, 22(5): 1106-1117.

Delibes-Mateos M, Ferreras P, Villafuerte R (2009) European rabbit population trends and associated factors: a review of the situation in the Iberian Peninsula. Mammal Rev, 39(2): 124-140.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of population Structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164, 1567–1587 (2003).

Ferreira A, Ferreira AJ (2014) Post-weaning growth of endemic Iberian wild rabbit subspecies, *Oryctolagus cuniculus algirus*, kept in a semi-extensive enclosure: implications for management and conservation. World Rabbit Science, 22(2): 129-136.

Fordham DA, Sinclair RG, Peacock DE, Mutze GJ, Kovaliski J, Cassey P, Capucci L, Brook BW (2012) European rabbit survival and recruitment are linked to epidemiological and environmental conditions in their exotic range. Austral Ecology, 37(8): 945-957.

Geraldes, A., Ferrand, N. & Nachman, M. W. Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus). Genetics 173, 919–933 (2006).

Geraldes, A. et al. Reduced introgression of the Y chromosome between subspecies of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) in the Iberian Peninsula. Mol. Ecol. 17, 4489–4499 (2008).

IPMA (2019) Resumo climatológico Dezembro de 2019. https://www.ipma.pt/pt/media/noticias/documentos/2019/resumo_clima_dez2019_REV.pdf

Monterroso P, Garrote G, Serronha A, Santos E, Delibes-Mateos M, Abrantes J, de Ayala RP, Silvestre F, Carvalho J, Vasco I, Lopes AM, Maio E, Magalhães M, Mills, LS, Esteves PJ, Simón MA, Alves PC (2016) Disease-mediated bottom-up regulation: An emergent virus affects a keystone prey, and alters the dynamics of trophic webs. Scientific Reports, 31(6): 36072. Doi: 10.1038/srep36072

Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959 (2000).

Queirós, J., Carneiro, M., Lopes, S. & Alves, P. Wild or domestic? Algirus or cuniculus? a novel genetic approach to infer the genetic integrity of European rabbit subspecies. no First Iberian Congress of Applied Science on Game Resources (CICARC) 52 (2019).

Seabloom EW, Borer ET, Gross K, Kendig AE, Lacroix C, Mitchell CE, Mordecai EA, Power AG (2015) The community ecology of pathogens: coinfection, coexistence and community composition. Ecology Letters, 18(4): 401-415.

Tompkins DM, Dunn AM, Smith MJ, Telfer S (2011) Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. Journal of Animal Ecology, 80(1): 19-38.

White GC, Burnham KP (1999) Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. Bird Study, 46(sup1): S120-S139.

6. Caraterizar a demografia do coelho-bravo e da lebre-ibérica e a epidemiologia dos agentes patogénicos mais relevantes que afetam estas espécies em diferentes biótopos, para ajustar adequadamente as medidas futuras de intervenção a diferentes cenários (OE3)

Objetivo operacional 1: Desenvolver e implementar uma Plataforma *online*
Atividade 1: Concluir o desenvolvimento e implementação da Plataforma em condições de acomodar e processar os dados gerados
Objetivo operacional 2: Desenvolver inquéritos na plataforma Survey 123
Atividade 1: Concluir a adaptação do Inquérito Epidemiológico ao Survey 123
Objetivo operacional 3: **Assegurar as condições para a formação e capacitação material e logística das equipas das organizações do setor da caça (OSC) para colaboração na recolha de dados**
Atividade 1: Instalar o *software* adequado nos dispositivos electrónicos pessoais dos técnicos das OSC
Atividade 2: Efetuar uma ação de formação sobre o conteúdo do Inquérito epidemiológico
Atividade 3: Realizar ações de formação de equipas das OSC em áreas modelo e capacitação material e logística
Objetivo operacional 4: Assegurar os recursos humanos e materiais para a recolha de dados das áreas modelo
Atividade 1: Recolher os dados epidemiológicos, ecológicos, de gestão, climáticos e da paisagem **Objetivo**
Objetivo operacional 5: Assegurar os recursos humanos para compilação e cruzamento dos dados da epidemiovigilância com os fatores bióticos e abióticos da paisagem
Atividade 1: Analisar os dados da epidemiovigilância
Objetivo operacional 6: Integrar os dados demográficos, ecológicos e sanitários
Atividade 1: Analisar e integrar os dados epidemiológicos, demográficos e ecológicos, seu processamento e tratamento gráfico
Objetivo operacional 7: Modelar o risco de DHV com base em variáveis bióticas e abióticas.
Ativiadde 1: Identificar as variáveis de risco para infeção por DHV através de técnicas de modelação estatística

Desenvolvimento de plataforma interativa

Durante o Projeto +Coelho 1, o GT iniciou a construção de um inquérito epidemiológico suportado, pela aplicação Survey 123 *para ArcGIS,* para obtenção de dados de dados diversos, a disponibilizar na Plataforma interativa. O inquérito foi conceptualizado pela DGAV em parceria com o INIAV e a ANCP. Numa fase mais avançada, o Departamento de Logística e Sistemas de Informação do INIAV I.P. (DLSI), passou a colaborar na programação e ajuste da aplicação.

No decurso do 2º ano do Projecto +Coelho este **inquérito epidemiológico** (**Anexo I**) foi concluído. O inquérito, totaliza cerca de 700 perguntas organizadas em 3 áreas, nomeadamente;

- ✓ PARTE I Caracterização da Zona de Caça
- ✓ PARTE II Gestão Cinegética
- ✓ PARTE III Outras Informações

O inquérito foi distribuído às OSC de 1º nível para que, por sua vez, o distribuíssem aos Gestores de Caça das ZC aderentes ao Projeto, sendo previsto que o preenchimento do mesmo fosse assessorado pelos Técnicos das Associações e Confederações de Caça, permitindo assim a recolha correta de dados

edafoclimáticos, de habitat, de disponibilidade de alimento e água, de refúgio, de predação, de abundância local de coelho-bravo e lebre-ibérica, de persistência e disseminação da DHV e mixomatose, ecológicos, epidemiológicos e de esforço de caça.

Durante o Projecto +Coelho 2, foram realizadas várias ações de formação e capacitação material e logística das equipas técnicas das organizações do setor da caça (OSC) (**Figura 82**) para permitir a colaboração no preenchimento do inquérito, nomeadamente:

- Levantamento de dados pessoais dos técnicos das OSCs para gerar contas de utilizadores e credenciais de acesso a aplicações de campo e *BackOffice*;
- Criação de contas de utilizador e atribuição de *passwords* para acesso à aplicação *Survey123*; (João Fernandes, DLSI, INIAV IP)
- Ação de Formação, realizada por Patrícia Tavares Santos (DGAV) sobre a estrutura e objetivo do inquérito, com esclarecimento do questionário, realizada a 28 de novembro de 2019;
- Ação de Formação, realizada por João Fernandes (DLSI, INIAV IP) sobre a funcionalidade e operacionalização da Aplicação, realizada a 28 de novembro de 2019;
- Apoio à instalação de aplicações nos dispositivos pessoais dos (computadores portáteis, telemóveis ou *tablets)* dos técnicos das OSC, a 28 de novembro de 2019;
- Apoio à distância por João Fernandes (DLSI, INIAV I.P.), 24x7 até ao presente sempre
- Inquérito dirigido aos Técnicos das OSCs para avaliação de dificuldades e previsão da data de conclusão do preenchimento (joao.fernandes@iniav.pt , João Fernandes, DLSI, INIAV IP).



Figura 82. Ação de Formação realizada a 28 de novembro de 2019 no INIAV, I.P. em Oeiras.

A maioria dos técnicos revelou estar preparado para iniciar a preenchimento dos inquéritos. No entanto, o confinamento imposto pela pandemia COVID-19, condicionou fortemente as deslocações entre Concelhos.

Pretende-se, portanto, que os dados continuem a ser recolhidos durante o Projecto +Coelho 3, em articulação com os dados da vigilância sanitária e das avaliações populacionais, uma vez integrados, permitam identificar condições naturais favoráveis ao restabelecimento das populações.

Está prevista divulgação pública destes dados em tempo real na forma de mapas georreferenciados e gráficos suportados em análise estatística num *website* do Projecto, criado em Sistema de Gestão de Conteúdo (CMS). Este *website*, cuja construção já foi iniciada, será concluído durante 2021.

Os dados recolhidos através deste inquérito são descarregados de forma automática na base de dados.

Até á data foram recolhidos apenas 2 inquéritos (FENCAÇA).

A emergência da pandémica por SARS-CoV-2, impossibilitou a conclusão desta medida. No entanto, não obstante concluído o Projecto +Coelho2, o GT prosseguirá com a sua implementação.

7. Aumentar a consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos, através do desenvolvimento de ações de educação e sensibilização sobre o estatuto frágil da subespécie *O. c. algirus* e da espécie *Lepus granatensis*, a importância da conservação dos recursos genéticos autóctones e a importância de se limitar a circulação de agentes patogénicos através da adoção de boas práticas no campo (OE.4)

Objetivo operacional 1: Adequar os recursos humanos e materiais para divulgar a importância da pureza genética e estatuto sanitário dos recursos endógenos do nosso país

Atividade 1: Promover ações de comunicação, educação, sensibilização e divulgação da importância de se preservar a genética e a saúde do coelho-bravo e da lebre

As introduções ilegais de animais de proveniência duvidosa, quer para repovoamentos, quer para largadas, com estatuto genético e sanitário indeterminado, constituem verdadeiras ameaças à preservação da subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus*, pelo risco de hibridação que ameaça a pureza genética do coelho-bravo e pela introdução potencial de agentes patogénicos que cumulativamente agravam o estado sanitário das populações selvagens locais.

Interessa, por isso, reforçar junto dos gestores das zonas de caça a responsabilidade e o papel decisivo que têm na preservação do património genético da subespécie *O. c. algirus* e, junto dos caçadores, a importância de exigirem junto das entidades gestoras das zonas de caça, exemplares selvagens de pureza certificada.

Objetivos

O objetivo específico a alcançar visa aumentar a consciência social sobre a importância das boas práticas de gestão nas zonas de caça e dar a conhecer e divulgar a importância da preservação dos recursos genéticos autóctones do nosso país, especialmente no que toca à subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus* ameaçada pela introdução da subespécie *O. c. cuniculus*.

Preconiza-se o estabelecimento de um plano de comunicação com os seguintes objetivos:
- Sensibilizar gestores, caçadores, proprietários agro-florestais, decisores políticos e crianças/jovens para a importância do coelho-bravo nos ecossistemas;
- Informar a sociedade sobre a situação problemática do coelho-bravo, espécie basilar dos ecossistemas mediterrânicos e por isso responsável pela biodiversidade, e envolvê-la nos esforços para a sua recuperação, com enfoque na importância da caça/gestão cinegética para a recuperação da espécie;
- Envolver as OSC de 1º nível em ações de sensibilização dos gestores dos Clubes e Entidades Associativas no processo de dissuasão da introdução de animais no campo sem certificação genética e sanitária;

- Manter permanentemente informados todos os agentes implicados na recuperação da espécie e restantes setores da sociedade;

O envolvimento direto das OSC de 1º nível nas ações de informação e sensibilização dos gestores e caçadores foi considerada fundamental para garantir a interiorização da mensagem que se pretende transmitir.

Foram promovidas várias **ações de sensibilização** sobre a importância da preservação genética e sanitária do coelho-bravo e da lebre, incluídas nas ações de divulgação do Grupo de Trabalho, em diferentes contextos, nomeadamente em:

Feiras de Caça

1. Projecto +Coelho2, 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova, que se realizou de 5 a 7 de outubro de 2018;
2. Divulgação de um *poster* sobre o Projeto Fight 2, na Feira da Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro;
3. Jornadas Xuntos Pola Caza, que se realizaram a 31 de março em Lobios, Galiza, Espanha;
4. Projecto +Coelho2, na Expocaça, 31ªfeira internacional da Caça, Armas e Pesca, Santarém, 3 a 5 de maio de 2019;
5. Projecto +Coelho2, nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana, Toledo, 8 de maio de 2019;
6. Projecto +Coelho2, na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019;
7. Projecto +Coelho2, na Assembleia Geral da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior, em Pinhel, 1 de junho de 2019;
8. "Dois anos de Projeto +Coelho: Objetivos, Estratégia e alguns Resultados", Margarida Duarte, XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, Ponte de Lima, 21 a 23 de junho;
9. "Projeto Mais Coelho", Margarida Duarte, 30º aniversário do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, 22 de junho de 2019;
10. Projecto +Coelho2, na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019;
11. Projecto +Coelho2, no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, que decorreu no Pavilhão Multiusos em Arraiolos, Évora, Portugal, nos dias 28 e 29 de setembro de 2019;
12. "Mixomatose em lebre-ibérica", Carina Carvalho, Patrimónios do Sul, Parque de Feiras e Exposições Manuel de Castro e Brito, em Beja, no dia 12 de outubro de 2019;
13. Margarida Duarte, X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019;
14. "Aspectos genéticos e sanitários das populações de espécies cinegéticas" Paulo Célio Alves, II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020;
15. "Importância social, ambiental e económica da caça", Fernando Castanheira Pinto, II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020.

Workshops

1. Campo de Férias Caça, Gestão Cinegética e Biodiversidade, organizado pela ANPC na Herdade da Barroca d'Álva em Alcochete, a 4 de setembro de 2019, onde estiveram presentes 50 jovens;
2. "Semana das Ciências" na Escola Internacional de Torres Vedras (21 de Novembro de 2018, tendo atendido cerca de 50 crianças);

Palestras nacionais

1. "Aspectos genéticos e sanitários das populações de espécies cinegéticas" Paulo Célio Alves, II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020.
2. "Preservação do património genético das espécies cinegéticas: uma garantia de sustentabilidade e certificação de qualidade", Paulo Célio, Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;

Palestras internacionais

1. "The future of leporids in Europe", Margarida Duarte, Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019;

Foram ainda produzidos 3 artigos de divulgação em revistas nacionais especificamente dedicados a este tema, nomeadamente

1. "Coelho-bravo, como podemos recuperá-lo? +COELHO, um projeto com forte ligação ao terreno", Revista Caça e Cães de Caça, nº 254 / dezembro de 2018;
2. "Translocações e repovoamentos do coelho-bravo: importância da certificação genética e sanitária do coelho-bravo", Revista Caça & Cães de Caça, n.º270, abril de 2020;
3. "Importância dos leporídeos no equilíbrio das cadeias tróficas e na biodiversidade Ibérica", Revista Vida Rural, julho/agosto 2020.

No total, efetuaram-se 23 ações de divulgação, demonstrando o cumprimento cabal deste objectivo específico.

8. Assegurar a melhoria da condição corporal dos leporídeos caçados após suplementação de alimento composto administrado em comedouro para coelho-bravo desenvolvido pelo projeto (e registo de patente) (OE.5)

Objetivo operacional 1: **Garantir os recursos financeiros para a realização de suplementações alimentares em Zonas de Caça aderentes ao Projeto, assim como de desparasitações bianuais no âmbito do Projeto +Coelho 2**
Atividade 1: Concluir os ensaios dos aromatizantes;
Atividade 2: Desenvolver comedouros para coelho-bravo;
Atividade 3: Iniciar as desparasitações bianuais;
Atividade 4: Registar a patente do comedouro +Coelho

Objetivo

A avaliação sanitária de leporídeos (coelho-bravo e lebre-ibérica) efetuada na época venatória 2017/2018 permitiu verificar uma heterogeneidade significativa da condição corporal dos animais caçados e dos cadáveres encontrados no campo. Verificaram-se também elevadas cargas parasitárias intestinais [particularmente, cestodes (citoténias e cisticercos) e nemátodes] em animais de algumas das 46 zonas de caça aderentes ao projeto +Coelho.

Face a estes dados, e por forma a melhorar a condição física dos animais debilitados e, consequentemente, a resposta imunitária aos vários agentes patogénicos em circulação, o Grupo de Trabalho +Coelho, com o apoio da Associação dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA) e alguns dos seus associados (Rações Zêzere, De Heus, Sorgal, Mazel e Rico Gado), desenvolveu um alimento composto (ração +Coelho) adequado às necessidades do coelho-bravo. Esta ração, poderá complementar a alimentação das populações selvagens de coelho-bravo, particularmente quando a disponibilidade de alimento natural for insuficiente ou deficitária, bem como servir de veículo de antiparasitários e vacinas orais.

Características do alimento composto

- Alimento composto não medicamentoso, especificamente formulado e adequado às populações selvagens de coelho-bravo, incluindo aromatizantes específicos que o tornem altamente apetecível para a espécie, mesmo em condições de abundância de outros alimentos;
- Formulação harmonizada entre os fabricantes, por forma a satisfazer as necessidades do coelho-bravo em termos de energia e nutrientes tais como fibra, vitaminas e oligoelementos;
- Adequado à suplementação em contexto de vida livre;
- A distribuir em Zonas de Caça aderentes ao Projeto +Coelho, onde a escassez de alimento é reconhecida como um fator limitante na recuperação das populações;
- Alimento composto, que permita incorporar antiparasitários, a disponibilizar apenas nas áreas comprovadamente afetadas e a ser distribuído às populações afetadas com uma frequência determinada e por um período considerado eficaz, sem compromisso da reprodução ou do cumprimento dos intervalos de segurança associados ao consumo de carne;

- Alimento composto que permita veicular no futuro uma vacina oral (uma das medidas do projeto +Coelho, enquadrada no eixo de investigação).

Enquadramento legal da utilização de alimento medicamentoso

A aplicação de um alimento medicamentoso carece, contudo, sempre de enquadramento legal. Assim, todos e quaisquer alimentos medicamentosos a distribuir às OSC, com vista à correção das cargas parasitárias, terão de ser disponibilizados aos utilizadores finais (gestores de Zonas de Caça), devidamente identificados pela ANPC, CNPC e FENCAÇA. Para o efeito, as três organizações do Sector da Caça de 1º nível foram legalmente habilitadas para distribuírem o alimento medicamentoso, através de protocolo estabelecido com a Divisão de Alimentação Animal da Direção Geral de Alimentação e Veterinária, no âmbito da valoração experimental dos alimentos medicamentosos (Artigo 12º e Artigo 18º do Decreto-Lei 151/2005 de 30 de agosto).

Ensaio de Palatibilidade

Durante o Projeto +Coelho 1 foi iniciado um "Ensaio de Palatibilidade" para avaliar, em nove zonas de caça selecionadas, incluindo diferentes cenários, nomeadamente animais mantidos em cercado e animais de vida livre, qual de 3 aromatizantes diferentes, incorporados em ração é o mais apetecível pelas populações de coelho-bravo.

Este ensaio foi concluído durante o Projeto +Coelho 2, e os resultados obtidos foram divulgados em relatório publicado no *banner* +Coelho a 16 de abril de 2019 (**Anexo IV-A**). Em geral, a ração contendo tomilho foi consumida mais rapidamente do que a contendo fenacho ou anis. Este alimento composto foi integralmente custeado pelas OSC.

Ensaio Piloto de desparasitação

No sentido de ser perceber o efeito real da desparasitação na melhoria da condição corporal das populações de coelho-bravo, foi desenhado um ensaio piloto envolvendo um número limitado de zonas de caça, previsto envolver 6 zonas de caça. Pretendia-se avaliar os efeitos concretos desta medida, antes desta ser estendida às outras populações silvestres do país.

Para auxiliar as OSCs na escolha de 6 populações reconhecidamente parasitadas (duas por OSC), a incluir neste ensaio piloto, foi preparado e divulgado um relatório (28.10.2019) contendo os resultados dos exames parasitológicos realizados durante o 1º ano do Projeto (**Anexo IV-B**). No entanto há que referir que as análises parasitológicas foram essencialmente realizadas em cadáveres encontrados no campo. Com efeito, apenas num número muito reduzido e variável de animais caçados provenientes das diferentes zonas de caça, foram identificados parasitas visíveis a olho nu (ex., ténias, *Grafidium strigosum,* **Figura 83**), ou seus efeitos (ex. Coccidiose hepática) o que dificulta a perceção de quais as zonas de caça mais afetadas.



Figura 83. Estômago de coelho com *Graphidium strigosum*.

Nesse relatório, para cada ZC foram fornecidos os seguintes elementos;

- súmula descritiva dos resultados obtidos nos cadáveres encontrados no campo, com um comentário para os casos de grandes infestações;
- gráfico em piza com a proporção de cadáveres encontrados no campo parasitados e não-parasitados;
- gráfico de colunas com a proporção de classes de parasitas [ténias, nemátodos (lombrigas) ou protozoários (Coccideas)] observados nos cadáveres encontrados no campo;
- indicação de recolha de ténias do local de animais caçados.

Este ensaio piloto foi desenhado para 3 fases, nomeadamente; i) uma fase de amostragem fezes e testagem por exames coprológicos, ii) uma fase de desparasitação, e iii) uma nova fase de amostragem fezes e testagem.

A 1ª fase de um ensaio piloto foi iniciada em dezembro de 2019 e concluída em Fevereiro de 2020, podendo os objetivos, metodologia e resultados ser consultados no respetivo Relatório (**Anexo IV-C**). Devido a alguns constrangimentos decorrentes da COVID-19, apenas foram incluídas 3 populações:

- ZCA nº4 Herdade da Abrunheira, Paço de Aragão e Outras,
- ZCT nº5671 Monte de Cima, Distrito de Évora, Concelho de Estremoz.
- ZCA nº1512 Benespera, Distrito da Guarda, Concelho da Guarda.

A segunda fase (desparasitação através da disponibilização de ração com antiparasitário) foi iniciada em junho de 2020, e teve a duração de 1 mês, período considerado adequado, e que se situa fora do período venatório do coelho (setembro a dezembro) e da lebre (setembro a fevereiro), garantindo-se assim, a salvaguarda do cumprimento dos intervalos de segurança, estabelecidos por lei para consumo público.

Os resultados e as conclusões deste ensaio podem ser consultados no **Anexo IV-C**.

Para este ensaio foi produzida documentação de suporte, e disponibilizada aos parceiros envolvidos, nomeadamente;

- um protocolo de recolha, explicativo do procedimento e identificação das amostras (**Anexo IV-D**)
- uma ficha de registo das recolhas diárias (**Anexo IV-E**)
- uma ficha de recolha cumulativa (**Anexo IV-F**)

A Ração +Coelho como veículo de vacina oral para RHDV2

No futuro, este alimento servirá também de veículo à vacina oral prevista no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho do MAFDR 4757/2017 de 31 de Maio).

Comedouros

Para fazer face à necessidade de se disponibilizar o alimento em zonas de caça para i) suplementação do alimento em meses de maior escassez, ii) veículo de antiparasitários, ou iii) veículo de vacina em zonas de caça selecionadas, capaz de limitar o acesso de outras espécies à ração, nomeadamente ruminantes e suídeos domésticos e silvestres, e protegendo o alimento de condições climatéricas adversas, tais como chuva, humidade e sol. O modelo foi conceptualizado por iniciativa da CNCP, com a colaboração de todos, no âmbito do Projeto +Coelho.

No entanto, e face à pandemia por COVID-19, não foi identificado um fornecedor que fabricasse os comedouros.

Com estas medidas de gestão de alimento e desparasitação, já adotadas isoladamente por algumas zonas de caça, pretende-se concertar e sincronizar esforços à escala nacional, que potenciem a recuperação do coelho-bravo em território ordenado.

O alimento não medicamentoso e medicamentoso, será sempre disponibilizado através um protocolo previamente definido.

Os Projectos +Coelho1 e +Coelho2 permitiram o desenvolvimento de uma ração especificamente adaptada para coelho-bravo, não apenas na sua composição em nutrientes como de palatibilidade, que poderá ser utilizada no futuro como veiculo para a administração de produtos medicamentos e de vacinas. No âmbito da medida do OE.5 do Projecto +Coelho2, foi efectuado um ensaio de desparasitação que se revelou eficaz.

9. Averiguar se as vacinas comerciais contra a mixomatose induzem a produção de anticorpos protetores em lebre-ibérica, tendo em vista a sua utilização no futuro, caso a espécie venha a ser considerada criticamente ameaçada (OE6)

Objetivo operacional 1: **Garantir os recursos financeiros para a realização de suplementações alimentares em Zonas de Caça aderentes ao Projeto, assim como de desparasitações bianuais no âmbito do Projeto +Coelho 2**
Atividade 1: Identificação de infraestruturas para realização de ensaio exploratório de vacinação em lebre-ibérica Atividade 2: Aquisição de exemplares de lebre-ibérica
Atividade 3: Aquisição de vacinas
Atividade 4: Alimentação e manutenção dos animais
Atividade 5: Quarentena e avaliação sanitária e genética
Atividade 6: Vacinação dos animais, recolha de soro e ensaios de seroneutralização

Objetivos da medida

A emergência recente em Espanha e em Portugal, em meados e finais de 2018, de numerosos casos de mixomatose em lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), levantou preocupações sobre a ameaça que este vírus pode constituir ao equilíbrio ecológico futuro das populações deste leporídeo, cujo declínio tem acompanhado a redução verificada nas populações de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*). Os casos esporádicos de mixomatose registados no passado em lebre europeia foram raramente acompanhados de sintomatologia. Por outro lado, a ausência, ou extrema raridade, de evidências de doença em lebre-ibérica, sugeriu a resistência natural desta espécie à mixomatose. No entanto, desde julho de 2018, tem vindo a ocorrer a morte de um grande número de exemplares de lebre-ibérica em Espanha e em Portugal (OIE, 2018), associada à infeção por um novo vírus da mixomatose, naturalmente recombinante. Este vírus, designado ha-MYXV (hare-MYXV) apresenta diferenças genéticas, quando comparado com o vírus da mixomatose que circula nas populações selvagens de coelhos. A principal diferença consiste na inserção de uma região adicional de cerca de 2,8 kpb, localizada na região codificante de proteínas não-estruturais (Dalton et al., 2019), interrompendo o gene M009L.
A vigilância proporcionada pelo Projecto +Coelho 2, permitiu que o GT +Coelho 2 publicasse um artigo na revista *Veterinary Record Case Reports* em 2020; doi:10.1136/vetreccr-2019-001044) sobre a primeira deteção do vírus naturalmente recombinante em lebre-ibérica em Portugal. O grupo publicou no *banner* do Projecto + Coelho, várias Notícias sobre os primeiros casos de mixomatose em Portugal, assim como alertas e recomendações para reforço da vigilância no terreno pelos agentes do campo (gestores, caçadores, proprietários rurais).

Desconhece-se as vacinas atualmente disponíveis para o controlo da mixomatose em coelho doméstico podem constituir ferramentas úteis no controlo da infeção por este novo vírus em lebre e no coelho-bravo, que permitam controlar a doença em alguns núcleos de animais detidos em cativeiro. O objetivo inicial deste ensaio clínico foi esclarecer se estas vacinas comerciais, atualmente disponíveis para o controlo da mixomatose em coelho doméstico, podem vir ser utilizadas no futuro com sucesso, em

reservas genéticas ou em cercados de reprodução que venham a ser criados para garantia da preservação desta espécie. A medida 7.6 (Avaliação da eficácia de vacinas comerciais contra mixomatose em lebre-ibérica) do Projeto +Coelho 2, devidamente contextualizada na respetiva Memória Descritiva, previu a realização de um ensaio clínico em lebres. No entanto, em junho de 2020 o GT identificou o vírus recombinante (ha-MYXV) em coelhos domésticos e em coelhos-bravos exibindo sinais de mixomatose, divulgando também estes achados em revistas internacionais (*Viruses* 2020, 12(10), 1127 (https://doi.org/10.3390/v12101127) e *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020 (https://doi.org/10.1111/tbed.13899). A emergência do ha-MYXV em lebres, e o subsequente alargamento do espetro de hospedeiros deste vírus às duas espécies de leporídeos de Portugal, alterou claramente o cenário anterior, onde as infeções virais não eram consideradas fatores predominantes ou relevantes na redução das populações de lebre-ibérica. A aparente adaptação deste novo vírus da mixomatose à única espécie de lebre existente em Portugal, e a eficiente transmissão intraespecífica (i.e., de lebre-a-lebre) e interespecífica (lebre-a-coelho e coelho-a-lebre), pode potenciar a redução drástica destas populações silvestres, exigindo o desenvolvimento e aplicação de medidas de intervenção específicas para o controlo da mixomatose nestas espécies, tendo em vista a mitigação de ameaças à biodiversidade ibérica.

Enquadramento legal da medida

No que toca à utilização de vacinas comerciais de coelho-doméstico, por constarem já na Lista de Medicamentos Veterinários autorizados pela DGAV, o ensaio foi enquadrado no âmbito dos Ensaios Clínicos previstos no artigo 97º do Capitulo VIII do Decreto-Lei nº 209/09 de 28 de outubro, nomeadamente na sua alínea b) que visa estabelecer a eficácia de uma substância ou medicamento veterinário experimental a realizar em animais saudáveis para uma indicação profilática, e nos moldes especificados nas alíneas a) a h) do n.º 2 do artigo 99º do decreto-lei n.º 148/2008 de 29 de julho.

Para o efeito, foi inicialmente preparado um *dossier* técnico (**Anexo V-A**) e submetido um requerimento ao Sr. Diretor Geral de Alimentação e Veterinária, tendo o pedido sido autorizado, através do seu despacho 79/ECVPT/2019, a 27-12-2019.
Contudo, na sequência da deteção do ha-MYXV em coelhos domésticos e silvestres, o GT do Projecto +Coelho 2, entendeu ser importante determinar também se essas mesmas vacinas têm capacidade de induzir proteção no coelho-bravo contra à infeção por ha-MYXV. Nesse sentido, foi preparado um segundo *dossier* técnico (Anexo B) que veio a ser aprovado em 16 de dezembro de 2020.

Delineamento experimental do Ensaio

Foram definidos 6 grupos de animais:

Grupo 1, constituído por 3 lebres não vacinadas, aos quais é administrado água estéril (equivalente à água de ressuspensão da vacina) por via subcutânea, ao 30º dia de quarentena;

Grupo 2, constituído por 3 lebres vacinadas com a vacina MixoHipra FSA (Laboratórios Hipra) na dose de $10^{4,5}$ $DICC_{50}$ no 30º dia e com Mixohipra-H (Laboratórios Hipra) na dose de 10^{4} $DICT_{50}$* no 51º dia, por via subcutânea;

Grupo 3, constituído por 3 lebres vacinadas com a vacina MixoHipra FSA (Laboratórios Hipra) no 30º dia e com Mixohipra-H (Laboratórios Hipra) no 51º dia; este grupo é vacinado com as doses recomendadas na bula das vacinas, por via subcutânea;
Grupo 4, constituído por 3 coelhos-bravos não vacinados, aos quais é administrada água estéril (equivalente à água de ressuspensão da vacina), por via subcutânea ao 30º dia;

Grupo 5, de 3 coelhos-bravos vacinados com a vacina Mixohipra-FSA (Laboratórios Hipra) ao 30º dia; uma única administração via subcutânea, junto à espátula, nas doses recomendadas para coelho doméstico;

Grupo 6, de 3 coelhos-bravos vacinados com a vacina Mixohipra-FSA (Laboratórios Hipra) ao 30º dia, seguido de vacina Mixohipra-H (laboratórios Hipra) ao 51º dia; uma única administração via subcutânea, junto à espátula, nas doses recomendadas para coelho-doméstico;

Obtenção de exemplares de lebre-ibérica através de eventos de captura no campo

Não existindo atualmente centros de reprodução de lebre-ibérica em Portugal, e não tendo também sido possível adquirir exemplares de lebre-ibérica em Espanha face à incapacidade de fornecimento por parte de criadores oficiais espanhóis devido ao impacto negativo da mixomatose em Espanha que levou à redução dos efetivos de lebre-ibérica, foi necessário organizar e implementar eventos de captura em Portugal. Estes eventos decorreram entre setembro de 2019 e janeiro de 2020, e careceram de pedido de autorização prévia à Divisão de Recursos Cinegéticos e Aquícolas (DRCA) do ICNF. A autorização foi concedida pela DRCA a partir de 31 de agosto de 2019 (**Anexo V-B**).

Os critérios que pautaram a identificação dos locais promissores para a captura de lebres envolveram a avaliação prévia de locais onde recentemente haviam sido avistados de alguns exemplares de lebres. Esta avaliação baseou-se na informação recolhida pelo contacto local com agentes do terreno, nomeadamente com tratoristas que, pela sua atividade, conhecem os comportamentos das populações nas áreas cultivadas, nomeadamente a direção da fuga em situação de perigo, informação crucial para o desenho do sentido da captura. Todas as capturas foram autorizadas pelo ICNF e consentidas pelos proprietários dos terrenos. As capturas foram agendadas em dias com previsão meteorológica favorável, nomeadamente ausência de chuva.
A complicada logística de captura envolveu o contacto e autorização dos proprietários, e requereu a participação de duas equipas (uma para a batida do terreno e outra para as redes), compreendendo cerca de 50 pessoas por evento. Incluíram estas equipas voluntários que generosamente colaboraram gratuitamente connosco.

As capturas exigiram equipamento específico, nomeadamente redes, estacas, caixas transporte, *walkie-talkies*, CCA, equipamento sonoro (apitos, trompetas, etc), vários veículos para transporte de materiais e de pessoas.
Uma vez que estes eventos se iniciam nos locais de madrugada (6:00 e as 7:00 da manhã) prolongando-se até ao final da tarde (geralmente até à 15:00-17:00), foi também necessário assegurar a logística de *catering* para os intervenientes.

A dificuldade de se obterem animais em número suficiente para o referido ensaio, com alguns eventos de captura sem qualquer visualização de animais ou captura (em zonas onde haviam sido avistadas lebres-ibéricas), confirmou a redução muito drástica das populações silvestres desta espécie, e exigiu consequentemente a organização de um número maior de eventos de captura do que o inicialmente previsto. Daí decorreu um esforço muito significativo por parte do GT +Coelho, dada a complexidade da organização destes eventos.

Durante o período mencionado, efetuaram-se 13 eventos de Captura nas seguintes localidades, envolvendo um total de cerca de 500 pessoas (**Figuras 84** a **94**):

1. Canhestros, Beja a 31 de agosto de 2019
2. Almodôvar, Beja a 7 de setembro de 2019
3. Malhada Velha, Beja a 15 de setembro de 2019
4. Serpa, Beja a 2 de outubro de 2019
5. Évora, a 4 de outubro de 2019
6. Linhares e Linharinhos, Beja a 10 de outubro de 2019
7. Campo Maior, Portalegre a 12 de outubro de 2019
8. Elvas, Portalegre a 19 de outubro de 2019
9. Malhada Velha, Beja a 26 de outubro de 2019
10. Santa Clara do Louredo, Beja a 29 de outubro de 2019
11. Vidigueira, Beja a 13 de dezembro de 2019
12. São João Baptista, Beja a 28 de dezembro de 2019
13. Santo Amador, Beja a 9 de janeiro de 2020



Figura 84. Colocação de rede de tresmalhe para captura das lebres. Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, Canhestros, a 31 de agosto de 2019.



Figura 85. Após a linha de rede colocada, deu-se início à batida para direcionar os animais para a rede. Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, Canhestros, a 31 de agosto de 2019.



Figura 86. Colocação junto à rede, à espera do aprisionamento de algum animal. Herdade do Brunhal, 26 de outubro de 2019.



Figura 87. Pessoal a deslocar-se para posicionamento na linha de batida. Herdade do Brunhal, 26 de outubro de 2019.



Figura 88. Alunos da Escola Profissional Agricola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras), envolvidos no evento de captura em Santa Clara do Louredo, 29 de outubro de 2019.



Figura 89. Aluno da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras), envolvido no evento de captura em Santa Clara do Louredo, 29 de outubro de 2019.



Figura 90. Imagens da captura realizada na Herdade dos Pinheirinhos, na Fundação Eugénio de Almeida, a 4 de outubro de 2019. Em cima, Fábio Abade dos Santos, Margarida Duarte e Gonçalo Lopes retirando uma lebre da rede. Em baixo, Gonçalo Lopes e João Carvalho em diferentes momentos.




Figura 91. Sebastião Miguel contendo uma lebre capturada na Fundação Eugénio de Almeida, a 4 de outubro de 2019 (esquerda) e Duarte Nuno em Canhestros, a 31 de agosto de 2019, colaborando na recolha de uma rede (direita).





Figura 92. Sebastião Miguel, Maminho e Gonçalo Lopes (à esquerda em cima) e Sebastião Miguel, Maminho, Ricardo Neto e dois alunos e maninho em Évora, a 4 de outubro de 2019 (esquerda), e João Grosso, em Serpa a 2 de outubro (direita).



Figura 93. Grupo de participantes em Serpa no dia 2 de outubro de 2019 (esquerda), e Pedro Melo, Médico Veterinário da DGAV em Santa Clara do Louredo no dia 29 de outubro de 2019 (direita).

Estes eventos foram individualmente noticiados no *banner* +Coelho 2 (Website do INIAV), onde agradecemos individualmente e institucionalmente a todos os envolvidos, tanto quanto possível. Reforçamos aqui também o agradecimento a várias Escolas pela colaboração; 1) à Escola Profissional ALSUD, na pessoa do Professor João Grosso e de todos os seus incansáveis alunos, 2) à Escola Profissional Agrícola de Torres Vedras Fernando Barros Leal, aos seus simpáticos e audazes Presidente (Luís Caros Lopes) e Professores e energéticos alunos, e 3) à FMV-ULisboa, nomeadamente ao Prof. Jorge Correia e ao Prof. Rui Caldeira, e aos alunos que participaram nesta iniciativa. Agradecemos também ao Dr. João Grave, ao Dr. José Maria Rasquilha, e ao Maninho, pelo contributo essencial, tanto em conhecimento como em recursos e disponibilidade. Um agradecimento especial também a todos os galgueiros e associações galgueiras que participaram nos eventos, e a quem agradecemos individualmente nas notícias respetivas. A todos os restantes amigos, pessoais e institucionais, e família, que foram envolvidos nestes eventos, e que permitiram o cabal cumprimento dos objetivos desta Medida do Plano de Ação. Um agradecimento sentido a todos os proprietários agrícolas e proprietários de concessão de caça que permitiram e colaboraram em todos os eventos de captura de exemplares de lebre-ibérica. Finalmente um agradecimento aos elementos do ICNF (na pessoa do Eng. Gonçalo Lopes), da DGAV (nas pessoas da Dra. Patrícia Tavares, Dra. Ana Paula Martins e Dr. Pedro Melo) e que por um lado possibilitaram a realização dos eventos pela emissão rápida dos documentos necessários às devidas autorizações, e que por outro, pela ajuda que deram participando em alguns eventos.

As capturas foram realizadas através do método de rede de tresmalhe com cerca de 1,5 m de altura e com batida dos animais com recurso a barulho de vozes e apitos. Os animais capturados foram acomodados em caixas individuais, e transportados em veículos devidamente autorizados pelo ICNF.
Foram capturados 40 animais (22 fêmeas e 18 machos). A eficiência média de captura foi de 4 lebres por evento, tendo variado entre 0 e 17. Apenas um animal morreu durante a captura representando 2,5% de mortalidade na rede. Nenhum animal morreu durante o transporte.
Nos 7 dias subsequentes à captura, morreram 4 animais (10%).



Figura 94. Á esquerda- Batedores alinhados e preparados para a enxota na Herdade do Brunhal a 26 de outubro de 2019. À direita-pegada de lebre revela presença de exemplares durante o 8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Elvas, a 19 de outubro de 2019.

Adequação das instalações para manutenção dos animais. Alimentação e Maneio dos Animais

Durante o Projeto foram visitados vários locais com vista à identificação de um espaço adequado para manter os animais durante o ensaio.

Foram visitados parques criados especificamente para criação de coelho-bravo em Mértola, e o Viveiro Florestal de Évora, construído para criação de perdiz-vermelha. No entanto, dada a distância destes locais ao INIAV, cuja equipa coordena e leva a cabo este ensaio, aleada à dificuldade em encontrar alguém residente na área que pudesse garantir o tratamento e manutenção dos animais (altamente sensíveis, mas com comportamento agressivos), e à falta de segurança nas duas instalações, optou-se por abrir uma candidatura para prestação de Serviço que cumprisse um conjunto de requisitos, incluindo de localização e de maneio dos animais (**Anexo V-C**).

Foi selecionado um local, também outrora dedicado à criação de perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*), localizado na Quinta do Almiaro e Infesto, em Torres Vedras, um espaço com 266 hectares de extensão, totalmente vedado, e com um único acesso, e portanto, seguro (**Figura 95**).

Estas instalações dispunham de 8 parques, ideais para acomodar as lebres durante a quarentena e a vacinação. Foram efetuadas várias visitas ao local, por membros das equipas do INIAV, DGAV e ICNF, e identificadas as intervenções necessárias para adequar as instalações à realização do referido ensaio.

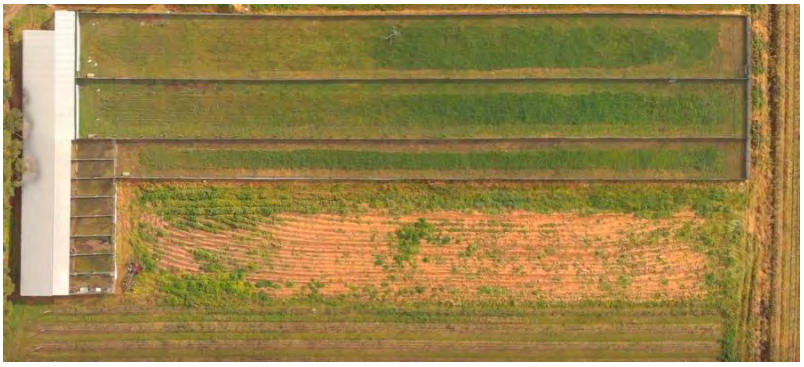


Figura 95. Vista aérea das instalações para a detenção em cativeiro dos exemplares de lebre-ibérica

Os animais formam instalados na Quinta do Almiaro e Investo a partir de 31 de agosto., após emissão de autorização por parte do ICNF para a detenção de lebres em cativeiro (**Anexo V-D**). Foi posta à disposição alimento natural (cereais, nomeadamente aveia, centeio e trigo, gentilmente disponibilizados pelo Doutor Benvindo Maças, Polo de Elvas do INIAV) e luzerna, produzida na Quinta do Almiaro e Infesto.

Para um maneio mais fácil, os animais são mantidos em grupos de 3-4 fêmeas e 1 a 2 machos adultos. É proporcionado refúgio em caixas de madeira, que também funcionam como armadilhas para captura dos animais quando necessário, e para aplicação de anti-parasitários tópicos (ectoparasiticidas). O espaço exterior dos parques foi apetrechado de microaspersores de água para arrefecimento e humidificação, particularmente importante nos dias muito quentes. O controlo de vetores está a ser efetuado com armadilhas de lâmpada UV e difusores de repelente. Os animais estão sob videovigilância 24 horas por dia (**Figuras 96** e **97**).



Figura 96. Imagem diurna captada durante o dia num dos parques da Quinta do Infesto (setembro de 2020).



Figura 97. Imagem noturna, captada durante a noite num dos parques da Quinta do Infesto (setembro de 2020).

Avaliação sanitária das lebres capturadas

Foi recolhida uma amostra de sangue dos 40 animais adultos capturados para pesquisa de anticorpos para o vírus da mixomatose. A percentagem de seropositividade foi de 75% (n=30).

Dezassete (42,5%) dos animais adultos capturados morreram já em cativeiro, nas primeiras semanas após a captura, tendo as suas mortalidades sido atribuídas a bacterioses (cerca de 90%) intestinais ou sistémicas combinadas ou não com mixomatose (4,5%), traumatismo (9%), cisticercose (18%), eimeriose (36,36%) ou disbiose gastrointestinal (30,77%).

Durante o Projecto +Coelho 2, foram analisados 22 cadáveres de lebre-ibérica oriundos do núcleo de reprodução (MG6). Estes animais (17 adultos capturados no campo (77,27%) e 5 nascidos em cativeiro (22,73%) foram necropsiados e testados de acordo com o fluxo definido no Projeto +Coelho.

Nesta amostragem de 22 lebres, verificou-se que 72,73% correspondeu a fêmeas (n=16) e apenas 22,73% a machos (n=5). Num dos cadáveres não foi feita classificação de sexo. **(Figura 98)**

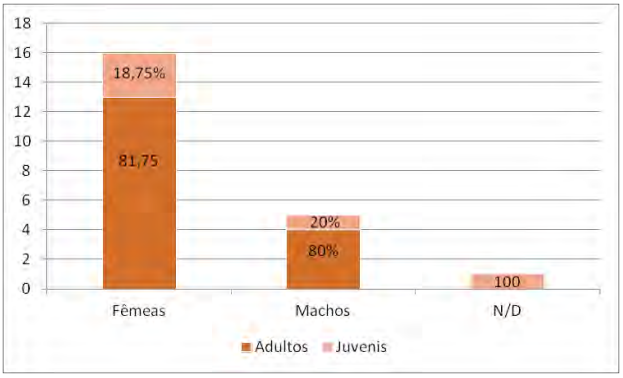


Figura 98. Distribuição por sexo das lebres que morreram na Quinta do Infesto

Apenas um (4,55%; 1/22) dos 5 juvenis apresentava sinais de autólise avançada.

Os espécimes foram pesados durante o **exame anatomopatológico** tendo o peso variado entre 78g e 2300g. O peso dos animais juvenis variou entre 78 e 1300 gramas. Nos juvenis sexados, a amplitude do peso variou entre 78g e 1300g nas fêmeas e o único macho juvenil apresentou um peso de 1000g. No que se refere aos animais adultos, o peso variou entre as 1500g e 2300g. Nos adultos sexados, a amplitude de peso variou entre 1500g e 2200g para as fêmeas, e entre 1700g e 2300g para os machos.

Mais de metade (54,55%, n=16) das 22 lebre-ibérica que morreram no centro de reprodução (MG6), apresentavam **condição corporal média**, das quais apenas uma (8,33%) foi positiva a mixomatose (**Tabela 63**). Este animal adulto foi eutanasiado para impedir o contágio dos restantes. Após a captura, este animal, apresentou conjuntivite muito ligeira, tendo-se procedido a análise por zaragatoa ocular para testagem. Esta lebre foi eutanasiada após conhecimento do resultado positivo. Não foi feito registo da condição corporal para dois animais.

Tabela 63. Condição corporal dos cadáveres de lebre-ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

			Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Condição corporal	**Nº total de animais**	**(%)**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**
Boa	3	13,64	0	0	0	0
Média	12	54,55	0	0	1	8,33
Fraca	5	22,73	0	0	0	0
Não registada	2	9,09	0	0	0	0
TOTAL	22					

Quatro dos animais que morreram (18,18%, 4/22) apresentavam emaciação, dois dos quais emaciação severa (50%). Um animal (25%, ¼) apresentava emaciação e desidratação.

Apenas dois (9,09%, 2/22) cadáveres registaram **traumatismos (Tabela 64)**, nenhum positivo a mixomatose.

Tabela 64. Traumatismos observados em dois cadáveres de lebre-ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Lebres positivas a Mixomatose	
Traumatismos	**Nº total de animais**	**% animais**	**Nº de animais com lesões traumáticas**	**(%) de animais com lesões traumáticas**
Soluções de continuidade nos tarsos e articulação társica com extensa necrose	1	4,55	0	0
Fratura da coluna região lombar	1	4,55	0	0
Total	2			

Apenas foi registado **sangramento pelos orifícios naturais**, na cavidade oral e narinas de um animal (4,5%, 1/22). O exemplar testou negativo a RHDV2 e a MYXV. Por esta razão, o sangramento foi associado ao período agónico.

Foram observadas **hemorragias internas** em quatro dos 22 animais (18,18%, 4/22) encontrados mortos**.** Dois animais apresentavam hemotórax (50%), um deles apresentava hemorragia abdominal (25%) e o outro (25%) uma discreta hemorragia dos músculos da região lombar (**Tabela 65**).

Tabela 65. Número de lebres-ibéricas s do centro de reprodução do OE6, MG6 em que se observaram hemorragias internas e relação deste sinal clínico com a positividade a mixomatose.

			Lebres positivas a Mixomatose	
Hemorragias internas	**Nº total de animais**	**% animais**	**Nº de animais com lesões hemorrágicas**	**(%) de animais com lesões hemorrágicas**
Hemotórax	2	9,1	0	0
Hemorragia abdominal	1	4,55	0	0
Discreta hemorragia dos músculos da região lombar	1	4,55	0	0
Total	4			

Verificaram-se **lesões pulmonares** em sete (31,825; 7/22) dos cadáveres, a maioria correspondendo a lesões congestivas e/ou hemorrágicas (42,86%; 3/7). Além destas, foram ainda registadas as lesões de densificação pulmonar num animal, de colapso de um hemitórax pulmonar num animal e focos de hepatização num terceiro animal. Nenhum dos exemplares apresentando lesões pulmonares foi positivo ao vírus da mixomatose. **[Tabela 66]**

Tabela 66. Lesões pulmonares observadas nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 no exame anatomopatológico e sua relação com a positividade ao vírus da mixomatose.

			Lebres positivas a Mixomatose	
Lesões pulmonares	**Nº total de animais**	**% de animais**	**Nº de animais com lesões pulmonares**	**(%) de animais com lesões pulmonares**
Densificação do pulmão direito	1	4,55	0	0
Hemitórax esquerdo c/ colapso do pulmão	1	4,55	0	0
Congestão e hemorrgais	3	13,64	0	0
Foco de hepatização	1	4,55	0	0
Total	7			

Relativamente à presença de **lesões hepáticas**, um animal (4,55%, 1/22) apresentou substituição do parênquima hepático por vesiculas parasitárias e outro animal (4,55%, 1/22) esmagamento da porção cranial dos lobos mediais com coágulo sanguíneo da face cranial. **[Tabela 67]**
Registou-se esplenomegalia num animal (4,55%, 1/22).

Tabela 67. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Lebres positivas a Mixomatose	
Lesão hepática	**Nº total de animais**	**% de animais**	**Nº de animais com lesões hepáticas**	**(%) de animais com lesões hepáticas**
Substituição do parenquima por vesículas parasitárias	1	4,55	0	0
Esmagamento da porção cranial dos lobos mediais e coágulo sanguíneo da face cranial	1	4,55	0	0
Total	2			

Verificou-se que 18,18% (4/22) dos animais apresentavam conteúdo líquido no ceco. Além desta, que foi a **alteração intestinal** mais frequentemente observada, registaram-se outras afetando apenas um individuo, como enterite severa ou enterite aguda, distensão abdominal, distensão do ceco ou conteúdo intestinal mucoso. Apenas este último animal com conteúdo intestinal mucoso, foi positivo a mixomatose. **[Tabela 68].**

Tabela 68. Alterações intestinais observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Animais positivos a Mixomatose	
Alterações intestinais	**Nº total de animais**	**% de animais**	**Nº de animais com lesões intestinais**	**(%) de animais com lesões intestinais**
Conteúdo líquido no ceco	4	18,18	0	0
Distensão marcada do ceco por fezes pastosas/líquidas	1	4,55	0	0
Enterite severa c/ líquido acastanhado e raios de sangue no ceco e íleo	1	4,55	0	0
Diarreia	1	4,55	0	0
Enterite aguda	1	4,55	0	0
Distensão abdominal por parasitas no epíplon	1	4,55	0	0
Pequena quantidade de alimento no estômago	1	4,55	0	0
Estômago c/ muco sanguinolento	1	4,55	0	0
Conteúdo intestinal mucoso	1	4,55	1	100
Conteúdo gelatinoso no colon e reto; congestão do ID c/ conteúdo líquido no lúmen; estômago dessecado e c/ muitos pelos	1	4,55	0	0
Sem alterações dignas de registo	9	40,91	0	0
Total	22			

Não se registou a presença de **nódulos**, **espessamentos cutâneos** em nenhum dos 22 animais. Um animal apresentava **edema subcutâneo** (4,55%, 1/22). A alteração externa mais frequentemente registada foi a conspurcação do terço posterior por fezes (**Tabela 69**).

Tabela 69. Alterações externas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Animais positivos a Mixomatose	
Lesões externas	**Nº total de animais**	**% de animais**	**Nº de animais com lesões externas**	**(%) de animais com lesões externa**
Conspurcação do terço posterior por fezes	3	16,64	0	0
Hipertrofia ligeira a moderada dos linfonodos axilares	1	4,54	0	0
Conspurcação fecal zona anal e secreção láctea nos mamilos	1	4,55	0	0
Ulceração da pele na região tibio-társicas	1	4,55	0	0
Total	6			

Ao nível da pele verificou-se conspurcação do terço posterior por fezes em 50% (3/6) dos animais em que foi registada alguma alteração cutânea, hipertrofia ligeira/ moderada dos linfonodos axilares (16,6%) e ulceração da pele na região tibiotársica (16,6%). Nenhum dos seis animais em que se observaram estas alterações foi positivo a mixomatose.

Outras lesões registadas incluíram pleuropericardite em dois animais (22,22%), tumefação das regiões tibiotársicas num animal (11,11%), presença de ulceração no lábio superior num animal (11,11%), hemorragia da musculatura lombar num animal (11,11%), hidrotórax num animal (11,11%), alterações ao nível testicular e escrotal numa animal (11,11%), congestão dos órgãos internos num animal (11,11%) e hemorragia subcutânea submandibular e congestão da traqueia num animal (11,11%). Nenhum destes animais foi positivo a mixomatose. **[Tabela 70]**

Tabela 70. Outras lesões observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e sua relação com a positividade a mixomatose.

			Animais positivos a Mixomatose	
Outras lesões	**Nº total de animais**	**% de animais**	**Nº de animais com outras lesões**	**(%) de animais com outras lesões**
Pleuropericardite/Pleuropericardite fibrinopurulenta	2	9,1	0	0
Tumefacção das regiões tibio-társicas	1	4,55	0	0
Úlcera no lábio superior direito	1	4,55	0	0
Hemorragia da musculatura lombar	1	4,55	0	0
Hidrotórax	1	4,55	0	0
Ausência testículo direito, perfuração da bolsa escrotal c/ hemorragia; hemorragia do epidídimo direito	1	4,55	0	0
Congestão dos órgãos internos	1	4,55	0	0
Hemorragia subcutânea na região horizontal da mandíbula esquerda; congestão da traqueia	1	4,55	0	0
Total	9			

Relativamente aos **exames bacteriológicos**, foram isoladas bactérias em aerobiose em 90,91% (20/22) dos cadáveres de lebre ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6. Foram isolados dois tipos diferentes de bactérias patogénicas de um animal. Todas as bactérias isoladas são patogénicas e apresentam potencial zoonótico. Em três animais (13,64%), não se isolaram bactérias em aerobiose. **[Tabela 71, Figura 99]**

Tabela 71. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de lebre ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6, e respetiva percentagem de positividade na amostra.

Espécie isolada	Potencial zoonótico	Patogenicidade	Nº de animais positivos	Percentagem de positivos na amostra
Escherichia coli	✓	Depende do serótipo	13[a]	61,90
Klebsiella pneumoniae subsp *pneumoniae*	✓	Elevada	1	4,76
Pseudomonas aeruginosa	✓	Elevada em animais imunocomprometidos	1	4,76
Pauteurella multocida	✓	Elevada	1	4,76
Raoultella ornithinolytica	✓	Em avaliação	1	4,76
Staphylococcus aureos	✓	Ligeira a severa	2	9,52
Staphylococcus lentus	✓	Elevada	1	4,76
Staphylococcus xylosus	✓	Ligeira	1[a]	4,76
Total			21	

[a]Animal positivo a mixomatose

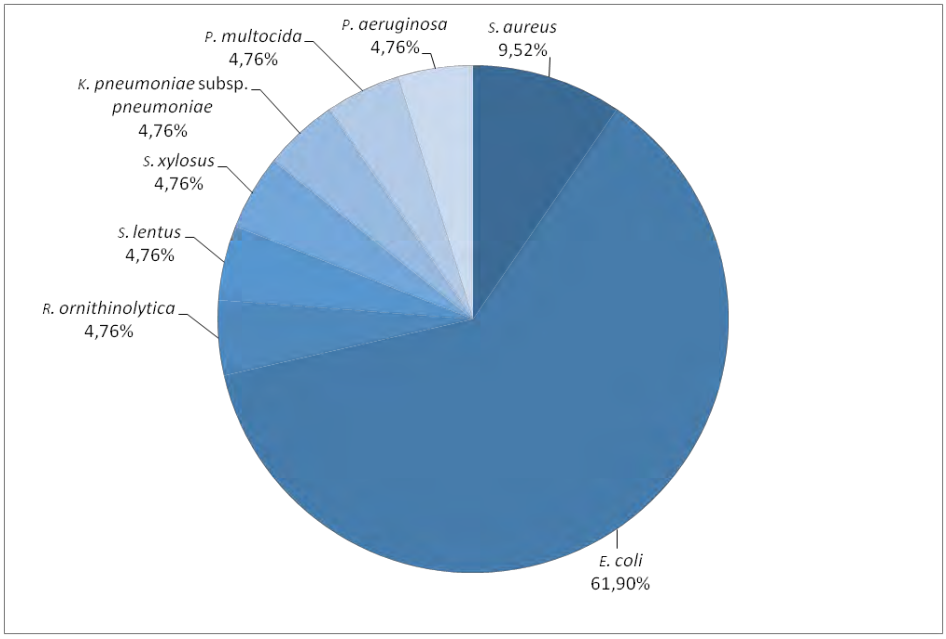


Figura 99. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de lebre-ibérica provenientes de explorações de produção centro de reprodução do OE6, MG6, e respetiva percentagem de positividade na amostra.

Relativamente aos **parasitas internos**, apenas um pequeno número de animais (n=4, 18,18%) se encontrava parasitado pelo **céstode** *Cysticercus pisiformis*. Contudo, destes, 3 (75%, ¾) registavam elevadas cargas parasitárias (**Tabela 72, Figura 100**).

Tabela 72. Céstodes identificados nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes do centro de reprodução do OE6, MG6 e respetivos valores de percentagem de positividade amostral.

			Animais com grandes infeções	
Céstodes	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
C. pisiformis	4	18,18%	3	75

Quanto ao parasitismo por **nemátodes**, 45% (n=10) dos animais encontravam-se parasitado, sendo que destes, dois (25%, 2/8) animais apresentavam infeção mista por duas espécies diferentes de nematodes. Nos cadáveres de lebre-ibérica oriundos do centro de reprodução do OE6, MG6, foram detetados os seguintes nematodes: *Passalurus ambiguus* (9,1%, n=2), *Nematodirus spp.* (4,5%, n=1), estrongilídeos (n=1) e ovos de estrongilídeos gastro-intestinais (n=6). Nenhum dos animais registou elevadas cargas parasitárias (**Tabela 73**).

Tabela 73. Nemátodes identificados nos cadáveres de lebre-ibérica provenientes de explorações de produção centro de reprodução do OE6, MG6 e respetivos valores de percentagem de positividade amostral.

			Animais com grandes infeções	
Nemátodes	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
Estrongilideos	1	4,5 %	0	0
Estrongilideos gastro-intestinais (ovos)	6	27,3%	0	0
Passalurus ambiguus	2	9,1%	0	0
Nematodirus spp.	1	4,5%	0	0
Total	10			



Figura 100. Lebre com infeção muito grave por *Cysticercus pisiformis* (Forma larvar da *Taenia pisiformis*). O parênquima hepático encontra-se destruído pela forma parasitária.

No que toca aos protozoários, apenas 8 animais (36,36%) não apresentavam infeções por **coccídeas.** Os restantes animais (14/22, 63,63%), apresentavam infestações simples ou múltiplas [*Eimeria* spp (n=11), *E. piriformis* (n=1), *E. magna* (n=1), *E. media* (n=1) e *E. leporis* (n=1)]. Apenas num número reduzido de animais (n=5) se observaram grandes infestações por coccídeas, nomeadamente por *Eimeria* spp. e *E. magna*. (**Tabela 74**).

Tabela 74. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral.

			Animais com grandes infeções	
Coccídeas	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
Eimeria spp.	11	78,57	4	36,36
E. leporis	2	14,29	0	0
E. magna	1	7,14	1	100
E. media	1	7,14	0	0
E. piriformis	1	7,14	0	0
Total	16			

Construção de uma Unidade Laboratorial móvel

Depois de feitas várias consultas a Instituições públicas e privadas de Investigação, Hospitais e Faculdades detentoras de biotérios, e face à impossibilidade de se identificar um biotério adaptado para lebre-ibérica para realização da fase de contraprova do ensaio de vacinação, o GT procurou soluções alternativas, nomeadamente a possibilidade de se utilizar tendas militares de pressão controlada. Não tendo sido possível pelo facto destas tendas serem de pressão positiva (o contrário do pretendido para o ensaio), o GT optou pela construção de uma *Unidade de Inoculação*, hermética e isotérmica, feita em fibra de vidro, contendo uma antecâmara (sala 1), para mudança de roupa do pessoal, e uma sala para processamentos e instalação dos animais (sala 2) com uma área de trabalho. A separação da zona dos animais da zona de trabalho impede a visualização dos procedimentos realizados num determinado animal por parte dos restantes animais (**Figura 101**). O Projeto técnico foi gentilmente concebido e oferecido pelo Engº Jorge Neves (Sotécnica), por se ter sensibilizado com os propósitos do Plano de Ação.

As características da unidade, permitem dispor de:

- Ar estanque nas duas unidades;
- Diferencial de pressões entre a sala 2 (-15 Pa) e a sala 1.
- Entrada de ar por filtro GLA e saída de ar filtrado por filtro HEPA H14 na sala 2 em sentido descendente contrário aos animais;
- Limpeza com água pressurizada de todas as superfícies das duas unidades;
- Iluminação natural da sala 2 por janela de 1 x 1m, construída em vidro temperado;
- Temperatura controlada por ar condicionado com termostato, colocado na sala 2, para garantia do bem-estar animal.

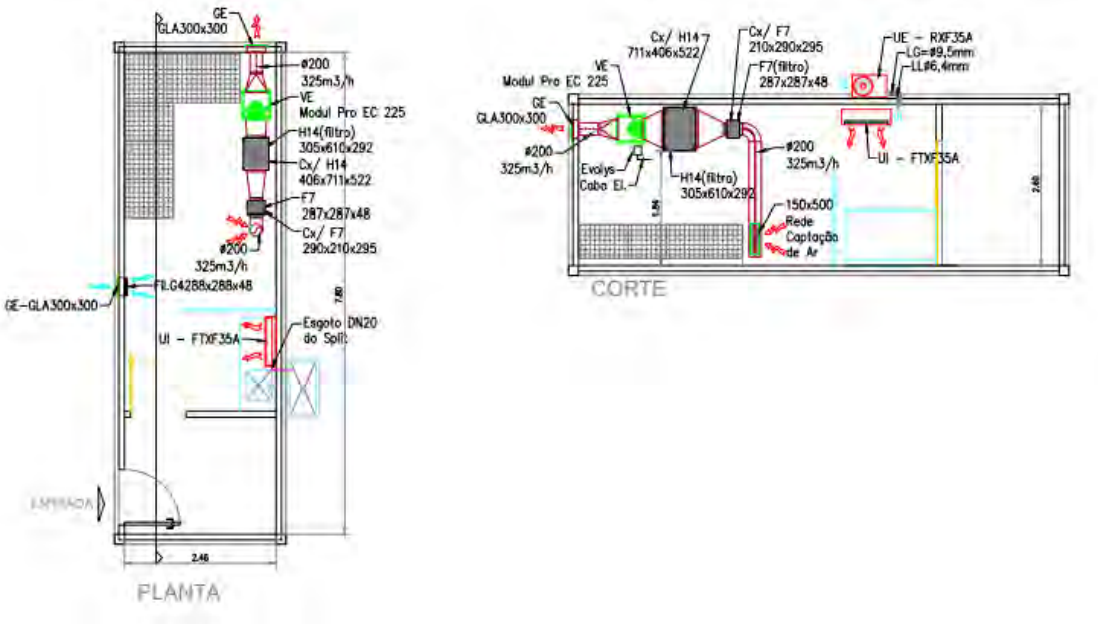


Figura 101. Planta técnica da Unidade Laboratórial Móvel.

A sala 2 está equipada com uma mesa para manipulação dos animais e realização dos procedimentos previstos (manipulação dos animais; colheita de amostras, inoculação), e de contentores apropriados para despejo de material biológico infetado.

Os líquidos resultantes da cuba de lavagem de material, mãos e a água resultante da condensação do ar condicionado, são encaminhados para depósito estanque contendo hipoclorito de sódio, no exterior da unidade, periodicamente removido.

Os animais são mantidos em gaiolas individuais, suspensas no ar. Os dejetos e urina de cada gaiola são recolhidos diretamente para sacos de plástico, contendo areia comercial para absorção de urina e cheios na fase de vacinação. Na fase de contraprova (vírus vivo) os dejetos e urina são recolhidos automaticamente para contentor contendo inativador de vírus. As luvas, protetores de calçado e máscara são descartadas para um contentor, colocado na Sala 2. Estes sacos são recolhidos periodicamente e eliminados diretamente para contentor adequado ao perigo biológico.

Todos os testes serológicos e virológicos, assim como as necrópsias, serão efetuados no laboratório Nacional de Referência para as doenças dos animais, localizado no INIAV em Oeiras. Os testes de hemograma são efetuados na Faculdade de Medicina Veterinária e os testes de bioquímica realizados no Hospital Veterinário de São Bento.

A remoção dos contentores é assegurada pela empresa *Ambimed*. Os cadáveres a necropsiar serão colocados em dois sacos de plástico e transportados em malas térmicas com acumuladores de frio, e transportados pelos médicos veterinários da equipa de acompanhamento, acompanhados de Folha de Requisição de Análises Oficial do INIAV (Modelo IMP-4.4-01.04/2) ou pela empresa *Ambimed*.

Resultados do Ensaio

A pandemia por SARS-CoV-2 causou algum atraso ao arranque do ensaio, que está no momento a decorrer em lebre-ibérica. Este ensaio será efetuado de forma faseada, primeiro em lebres e depois em coelhos-bravos, com desinfeção do laboratório móvel e vazio sanitário entre espécies.

Os parâmetros morfológicos (dimensão da tíbia, orelha e largura do crânio) dos animais foram recolhidos no início do ensaio, altura em que os animais forma identificados por brinco de plástico numerado. A avaliação da condição física e clínica dos animais (peso, frequência respiratória, temperatura retal) tem vindo a ser efetuada antes de todas as recolhas de amostras de sangue.

O sangue é recolhido na veia jugular externa, de acordo com o método descrito por Abade dos Santos *et al.* (2018) (**Figura 102**).



Figura 102. À esquerda, Pedro Melo (Médico Veterinário da DGAV) e Sebastião Miguel (Gestor responsável pela manutenção dos animais e apoio às ações médicas) medindo a temperatura retal de uma lebre. À direita, Fábio Abade dos Santos recolhendo sangue por punção da veia jugular externa a uma lebre.

A resposta humoral das lebres à vacinação com as vacinas comerciais (Grupos 2 e 3 e 5 e 6), irá ser avaliada e comparada com o grupo controlo negativo (grupo 1 e grupo 4, animais não vacinados), através da construção da curva de cinética de produção de anticorpos específicos para o vírus da mixomatose ao longo de 60 dias, utilizando-se, para esse efeito, um kit comercial de ELISA indireta para deteção de anticorpos anti-MYXV (CIVTEST), cuja eficácia com soros de lebre já foi demonstrada (artigo em preparação).

A capacidade de neutralização destes anticorpos está a ser investigada pela taxa de sobrevivência num ensaio de inoculação com vírus de campo (contraprova ou *challenge*), isolado a partir de uma lebre infetada, em dose conhecida e quantificada (dose de 100-200 PFU) administrada por via subcutânea.

Uma vez que a imunidade desenvolvida para algumas famílias de vírus, nomeadamente para os membros da família Poxviridae, não tem como componente principal a imunidade humoral, a avaliação

da produção e a determinação dos títulos de anticorpos não é indicativa, de forma isolada, do grau de proteção conferida ao animal (Kerr, 2012). Assim, tendo em vista que a componente da imunidade celular pode ter um papel preponderante nesta proteção, a avaliação da resposta celular é de crucial importância (Apostolopoulos and Marincola, 2010). Nesse sentido, por forma a obtermos uma avaliação realista da resposta humoral e celular, proceder-se-á a uma prova experimental *in vivo*, com inoculação dos diferentes grupos de animais com vírus isolado a partir de um cadáver de lebre infetado com vírus. Embora os títulos de anticorpos desenvolvidos possam ser indicativos de desenvolvimento de proteção contra a infeção pelo vírus da mixomatose, pelas razões expostas, a contraprova não poderá ser substituída por ensaios de seroneutralização *in vitro*.

A contraprova dos animais vacinados e do grupo controlo, será realizada através da administração, por via subcutânea, de uma dose conhecida e idêntica para todos os animais, de uma preparação contendo vírus da mixomatose (estirpe de campo isolada a partir de uma lebre infetada). Esta estirpe da contraprova foi geneticamente tipificada, de forma a garantir que não existiram mutações de relevo, resultantes da multiplicação do vírus em células linha de coelho (RK13). A ausência de desenvolvimento de sinais clínicos de doença, ausência de virémia e de excreção viral pelas fezes e urina, permitirá esclarecer se a imunidade conferida pela vacinação impede eficazmente a progressão da infeção por este vírus, geneticamente distinto, nas lebres.

No âmbito da Medida 7.6, estima-se a publicação de 3 artigos científicos durante o ano de 2021 com os resultados que estão a ser obtidos neste ensaio. Prevê-se que sejam disponibilizados à comunidade científica internacional dados inéditos sobre a bioquímica e resposta imunológica da lebre-ibérica.

10. Conferir imunidade às populações naturais de coelho-bravo contra as estirpes de RHDV2 em circulação, através do desenvolvimento de uma vacina oral, que implica a caraterização genética das estirpes circulantes para modelação da vacina (OE7)

Objetivo operacional 1: **Desenvolver uma vacina oral contra RHDV2**
Atividade 1: Sequenciar o gene *vp60* de estirpes de RHDV2
Atividade 2: Identificar as estirpes representativas do conjunto de estirpes que circulam no território
Atividade 3: Sintetizar e clonar as sequências do gene *vp60* das estirpes selecionadas
Atividade 4: Produção e purificação das VLPs no iBET

Objetivo

O desenvolvimento de uma vacina oral para imunização das populações de coelho-bravo, foi iniciado no decurso do Projeto +Coelho 2. Embora este Projecto designado "Fight-2" seja financiado pela FCT, algumas tarefas são suportadas pelo Projeto +Coelho 2, financiado pelo FFP.

A via de administração das vacinas atualmente disponíveis no mercado contra a doença hemorrágica viral causada pelo vírus de tipo 2 é a parenteral, i.e. subcutânea ou intramuscular, requerendo por isso o maneio dos animais e reduzindo a sua aplicação à cunicultura industrial e tradicional de coelho-doméstico, aos animais de companhia e ao coelho-bravo criado em cativeiro para fins cinegéticos. A utilização de vacinas injetáveis nas populações de coelho-bravo de vida livre é, por isso, muito limitada e desadequada, dada a dificuldade de captura e manuseamento dos animais. Acresce que o stress inerente aos processos de captura e manipulação destes animais, cuja natureza é muito nervosa, pode, por si só, conduzir à súbita morte ou comprometer o desenvolvimento da imunidade pretendida.

Nesse sentido, pretende-se desenvolver uma vacina para administração oral, baseada em partículas do tipo viral (VLPs), produzidas em células de inseto, contendo apenas a camada exterior do vírus – a cápside viral. Estes invólucros ocos mimetizam a estrutura imunogénica do vírus, induzindo uma resposta imunológica que, a verificar-se em mais de 85% dos animais de uma população (valor considerado necessário para uma imunidade de grupo eficaz), reduzirá efetivamente a transmissão sustentada do vírus, conduzindo ao seu controlo.

Esta vacina oral é também potencialmente ajustável à evolução das estirpes de campo de RHDV2, através da inclusão de informação genómica das novas estirpes numa espécie de cassete que é incorporada num baculovirus, com o qual se infetam as células de inseto para produção das mencionadas VLPs.

As VLPs são destituídas de material genético, pelo que a sua utilização não envolve a libertação de vírus infecioso (com capacidade infetante) ou de material genético do vírus na natureza. Assim, os riscos associados à libertação de ácidos nucleicos virais no ambiente são inexistentes, conferindo a esta vacina inocuidade e segurança. Para além disso, sendo a imunidade induzida pelo RHDV de curta duração (6 meses a 1 ano), uma vez suspensa a vacinação, o "rasto imunológico" por ela induzido será rapidamente eliminado, permitindo perceber ao fim de algum tempo se as estirpes de campo continuam em circulação.

A administração da vacina por incorporação das VLPs em isco (Ração + COELHO) possibilitará a sua aplicação generalizada no campo, nas zonas onde o vírus circula, sem necessidade de captura e manipulação dos animais e, por isso, de forma adequada ao coelho-bravo de vida livre.

Continuação da caracterização molecular do gene completo da proteína da cápside VP60

No decurso do Projeto +Coelho 2, deu-se continuidade à caracterização molecular das estirpes de RHDV2 detetadas no âmbito das avaliações sanitárias, iniciada durante o Projeto +Coelho 1. A **caracterização molecular,** que continuará a ser realizada ao longo do tempo, baseia-se no gene que codifica a maior proteína estrutural da cápside viral, VP60 (gene vp60), e permite deduzir a sequência de aminoácidos da proteína da cápside, a partir das sequências nucleotídicas. Esta caracterização permite ainda verificar se ocorrem substituições de aminoácidos na proteína da cápside (VP60) e prever o impacto dessas substituições.

A metodologia utilizada no Projecto +Coelho2 foi a referida no relatório do Projecto +Coelho1. A amplificação do gene completo da VP60 foi conseguida com recurso a 2 pares de primers, o par 27F (5'-CTCGGTAGTACCTGACGACG-3') (Le Gall-Reculé *et al.*, 1998) e 986R (5'-AACCATCTGGAGCAATTTGGG-3') (Duarte *et al.*, 2015a), e o par 717F (5'-CGCAGATCTCCTCACAACCC-3' (Duarte *et al.*, 2015a) e RC10R (Tham *et al.*, 1999), que permitiram a obtenção de 2 fragmentos sobreponíveis. As reações foram realizadas com 5µl de RNA e 25 pmol de cada primer com recurso ao kit OneStep RT-PCR kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação incluíram um passo de transcrição reversa a 50°C durante 30 min, uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, 50 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C durante 15s, hibridização a 58°C durante 30s e extensão a 72°C durante 30 s) seguidos de extensão final a 72°C durante 5 minutos. Os produtos foram corridos em gel de agarose a 1,5% e purificados com recurso ao kit NZYGelpure (Nzytech genes and enzymes, Lisboa, Portugal).

A sequenciação foi realizada com recurso ao kit BigDye™ Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As sequencias nucleotídicas do gene completo da VP60 foram obtidas com recurso ao equipamento automático 3130 Genetic Analyzer system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A caracterização molecular é um processo de continuidade ao longo dos projetos Fight-two e +Coelho que permitirá a obtenção de informação relativa às estirpes contemporâneas (uptodate) de RHDV2.

Seleção das estirpes para a vacina

Uma vez obtida caraterização do gene da VP60 de várias dezenas de estirpes contemporâneas, deu-se início à fase de análise das sequências. Nesta fase, foi construído um alinhamento múltiplo de sequências nucleotidicas (msa) do gene da proteína da cápside VP60, obtidas em Portugal e no mundo entre 2010 e 2019. Este ficheiro msa incluiu 259 sequências, 30 das quais caracterizadas no âmbito do projeto +Coelho, serviu de base à construção de mapas genéticos utilizando a metodologia descrita por Smith et al. (2004).

De uma forma muito simplificada, as sequências de aminoácidos foram alinhadas e as posições variáveis dos aminoácidos identificadas. O número de diferenças de aminoácidos foi então calculado para cada par de sequências. O número de diferenças de aminoácidos entre pares de sequências foram

então sujeitas a escala multidimensional com recurso ao Microsoft R Open versão 3.3.2, utilizando 2 ou 3 dimensões. As coordenadas resultantes (bidimensionais ou tridimensionais) foram usadas para construir mapas.

Estando concluídos os mapas genéticos, decorre neste momento no iBET o processo de seleção das estirpes que irão incorporar a vacina. Para esta seleção estão a ser utilizadas duas estratégias diferentes, nomeadamente i) a estratégia de seleção de sequências naturais da VP60 de estirpes de campo de RHDV2 circulantes e ii) a estratégia de construção/ desenho de sequências DiCo (diversity-covering sequences) que englobem a diversidade identificada nas sequências em análise.

Uma vez selecionadas as estirpes, seguir-se-á a fase de desenho de plasmídeos e sua produção em laboratório, a produção de baculovírus em pequena escala, a otimização do bioprocesso de produção das VLPs e finalmente a sua produção em grande escala.

Paralelamente ao processo de seleção das estirpes e obtenção das VLPs, e com base nos dados reunidos à data, tem sido levado a efeito um estudo mais amplo com foco na evolução de RHDV2 na Europa Ocidental com base no gene da proteína da cápside, no período de quase 10 anos que mediou desde a sua emergência em França em 2010 até meados de 2019.

Caracterização molecular dos genes não estruturais de RHDV2

Após testagem das amostras para a presença da nova variante do vírus da doença hemorrágica viral (RHDV2/GI.2), pela equipa do INIAV, a equipa do CIBIO/InBIO procedeu à sequenciação do genoma completo de estirpes selecionadas. Esta seleção foi feita de acordo com o local e data de amostragem, de forma a obter uma representação das estirpes em circulação. A análise do genoma completo destas amostras permitirá obter informações sobre a variabilidade genética, evolução e eventos de recombinação em GI.2.

Das 36 amostras analisadas, 26 revelaram ter uma composição genómica GI.4P/GI.2 (P corresponde à polimerase) e 7 amostras foram identificadas como triplos recombinantes (GI.4/GI.1b/GI.2). Para três amostras não foi possível proceder à tipagem. Os dois tipos de genomas encontrados já foram observados anteriormente, não apresentando nenhum evento de recombinação adicional.

Divulgação do projeto

O projeto Fight-two foi objeto de várias notícias de divulgação, quer da iniciativa da equipa de projeto (14 noticias, e várias participações em congressos nacionais e internacionais), quer por interesse de observadores exteriores (AAAs, Agricultural European Innovation Partnership (EIP-AGRI)). A equipa desenvolveu ainda um *website* para consulta dos desenvolvimentos do projeto (https://projects.iniav.pt/Fight-two/pt/). As ações de divulgação podem ser consultadas na seção 14, relativa ao OE.11.

11. Alavancar a recuperação do coelho-bravo e da lebre-ibérica através do desenvolvimento de medidas práticas de gestão nas zonas de caça que favoreçam a proliferação das populações naturais e assegurem o sucesso de ações de translocação (OE.8).

Objetivo operacional 1: **Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de populações**
Atividade 1: Correção de densidades de Predadores (com infraestruturas necessárias)
Atividade 2: Melhoria da Condição Fisica dos leporideos

Objetivo operacional 2: **Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de habitat**
Atividade 1: Construção de abrigos e morouços
Atividade 2: Gestão de matos e clareiras
Atividade 3: Aumentar a disponibilidade de água e alimento [através da colocação de comedouros, bebedouros e campos de alimentação e disponibilização de alimento (ex. cereais e ração) em períodos do ano com défice de alimento]
Atividade 4: Diminuir a proliferação de vetores infeciosos (desinsetização de tocas e moroiços)

Objetivo operacional 3: **Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de cercados**
Atividade 1: Controlo de alimentação e água
Atividade 2: Medidas sanitárias
Atividade 3: Capturas
Atividade 4: Translocações

O OE.8 tinha por base um conjunto vasto de objetivos operacionais e medidas, nomeadamente o desenvolvimento de métodos que permitam quantificar a pressão de predação (medida pela abundância de predadores generalistas) e medir a eficácia de métodos de controlo das populações de predadores, nomeadamente aqueles previstos na legislação. Muitas destas medidas não dispunham de orçamento para a sua concretização no âmbito do +Coelho2, desde logo por acarretarem investimentos muito pesados como o são a manutenção de custos com guardas e gestores de caça, a instalação de campos de alimentação para a caça, a aquisição de armadilhas seletivas, e outras.
Tais medidas constituíam objetivos deste projeto beneficiando da cooperação e envolvimento de um conjunto de entidades, desde logo as entidades concessionárias e gestoras das zonas de caça onde decorreram as várias ações realizadas.
Para além de ações gerais desenvolvidas ao nível das zonas de caça envolvidas no +COELHO2, foram ainda realizadas ações específicas no âmbito do OE.8, como foi o caso dos cercados de reprodução criados pelas OSC, nos quais foram instalados comedouros, bebedouros, culturas para a fauna e realizado o controle de predadores, quer de forma passiva, quer de forma ativa.
Como exemplo destaca-se o cercado de reprodução criado pela ANPC na Companhia das Lezírias, combinado com o trabalho de gestão já desenvolvido por esta entidade na zona de caça em geral, nomeadamente:

- ✓ Cerca perimetral metálica enterrada, com enrocamento para impedir entrada de predadores terrestres;

- ✓ Cerca perimetral metálica complementada com cerca elétrica para dissuasão de predação terrestre e alada;
- ✓ Malha de cobertura de cobertura do cercado para dissuasão de predação alada;
- ✓ Instalação de unidades integradas de comedouro e bebedouro para distribuição de ração (medicamentosa ou não) e forragem;
- ✓ Rede de moroiços e enramados para prevenção da predação, refúgio e abrigo;
- ✓ Rede de cercados de adaptação distribuídos pela zona de caça para permitir a realização de repovoamentos com base nos animais produzidos no cercado de reprodução;
- ✓ Rede de moroiços na imediação dos cercados de adaptação;
- ✓ Rede de pontos de distribuição de comida e água para a fauna e para as espécies cinegéticas em particular;
- ✓ Controle de densidades de predadores generalistas (raposa e saca-rabos) ao abrigo de autorização do ICNF para o efeito, utilizando métodos seletivos, desenvolvida na área onde está instalado o cercado de reprodução e na envolvência dos cercados de adaptação.

No seu conjunto, estas medidas contribuem para alavancar a recuperação do coelho-bravo através do desenvolvimento de medidas práticas de gestão nas zonas de caça que favoreçam a proliferação das populações naturais e assegurem o sucesso de ações de repovoamento.
Complementarmente, importa dar continuidade ao projeto +COELHO, desde logo avançando para a sua fase III onde se possa dar seguimento ao trabalho iniciado.
Particular destaque deverá ser dado à comparação de ações de recuperação do coelho-bravo que futuramente sejam desenvolvidas com recurso a repovoamentos (assim que existam exemplares produzidos pelos cercados de reprodução em número suficiente) avaliando o impacto da predação e do seu controle para o sucesso geral destas ações de gestão.

12. Património genético, criação de cercados e infraestruturas complementares (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém (Pólo do INIAV) e de 3 cercados de reprodução *modelo* em zonas de caça (OE.9)

Objetivo operacional 1: **Assegurar o património genético das populações de coelho-bravo**
Atividade 1: Efetuar análises genéticas para a certificação da subespécie *O. c. algirus*

Objetivo operacional 2: **Criação de núcleo genético de coelho bravo**
Atividade 1: Criar cercados (rede enterrada) com infra-estruturas necessárias (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém

Objetivo operacional 3: **Criação de uma rede de cercados de reprodução modelo de coelho-bravo em zonas de caça**
Atividade 1: Criar, nesta fase, três cercados (rede enterrada) com infra-estruturas necessárias (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de centros de reprodução nas zonas de caça (um por OSC)
Atividade 2: Capturar e testar os animais a incluir nos centros de reprodução
Atividade 3: Formar uma equipa multidisciplinar para assessoria técnico-científica na construção dos cercados acima referidos
Atividade 4: Acompanhar as ações de repovoamentos, pela comissão de supervisão
Atividade 5: Testar periódicamente os animais em cercado para garantir a sua pureza genética e bom estado sanitário

Em resultado do decréscimo continuado das populações de coelho-bravo em muitas áreas do território nacional, e da preocupação crescente sobre o estatuto de conservação desta espécie, o Grupo de Trabalho +Coelho propôs, no âmbito das medidas do Projecto +Coelho 2, a criação de uma reserva de núcleo populacional de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*), a implementar e monitorizar em Pólo descentralizado do INIAV, nomeadamente o Pólo de Santarém (Antiga Estação Zootécnica Nacional), e de três cercados de reprodução de coelho-bravo, a implementar em zonas de caça (de Norte a Sul do País), selecionados pelas três OSC de 1º nível.

Em conjunto, estes cercados de salvaguarda de recursos genéticos de *O c algirus* pretendem vir a constituir cercados *modelo*, sujeitos às melhores práticas conhecidas, servindo no futuro para a realização de ações de demonstração e divulgação de boas práticas de gestão.

Pretende-se, através destes cercados, contribuir ainda para ultrapassar as limitações existentes ao nível dos produtores de coelho-bravo existentes em Portugal (com produção muito reduzida), combatendo-se igualmente a prática ilegal de importação para o nosso território de animais com estatutos genético e sanitário desconhecidos.

Estas medidas visam garantir a preservação de espécimes de *O. c. algirus* em cenários altamente desfavoráveis e, simultaneamente, instalar cercados de reprodução modelo, percursores de uma rede nacional de cercados de reprodução que permita assegurar que os repovoamentos são feitos nas melhores condições sanitárias e genéticas, combatendo a utilização de indivíduos híbridos, contribuindo assim para a recuperação das populações autóctones.

Está prevista a replicação, no futuro, destes cercados *modelo* noutras zonas de caça existentes um pouco por todo o País (sempre que se justifique), recorrendo preferencialmente a indivíduos fundadores provenientes da própria zona de caça ou provenientes de núcleos com elevados níveis de anticorpos, contribuirá para o fomento das populações de coelho-bravo em Portugal, bem como para a preservação da diversidade genética existente. Nesse sentido, deverão ser privilegiadas zonas de caça onde as densidades de coelho-bravo, na atualidade, sejam reduzidas, tendo em vista ser possível avaliar posteriormente o efeito de translocações com a utilização dos coelhos produzidos nos cercados, na própria zona de caça.

Os coelhos produzidos nestes cercados *modelo* poderão ainda vir a ser utilizados para a fundação destes novos cercados de reprodução, mediante a obtenção de autorização prévia do ICNF.

Para a implementação dos cercados *modelo* os Parceiros do Sector Cinegético, forneceram os seguintes elementos sobre a localização e características de construção dos respetivos cercados (**Tabela 75**):

Tabela 75. Caracteristicas dos Cercados de Reprodução previstos para as 3 OSCs

	FENCAÇA	**ANPC**	**CNCP**
Local	Ciborro	Companhia das Lezírias	Alijó
Área (hectares)	0,5	1 (100mx100m)	0,65
Moroiços	30	16 (paletes, terra e sobrantes florestais)	4 (mato)
Vedação	com cabouco de cimento subterrâneo, 2 m de chapa zincada	Postes de 1,8 m comprimento e 5-6 cm de diâmetro, espaçados 5 em 5 metros; vala perimetral para enterramento da rede, sendo a vala preenchida com pedra; cantos escorados com postes 2m comprimento embutidos em cimento; rede hexagonal (de galinheiro) 2m, sendo parte enterrada; porta de entrada no cercado; proteção por cerca elétrica perimetral e grelha de cabos (cobertura)	Postes de 1,8 m espaçados de 5 m; rede de vedação com 2m (50x50); 1m rede fina; vala para enterramento da rede; portão de acesso
Comedouros/ bebedouros	cobertos com cobertura metálica	3 unidades de comedouro/bebedouro cobertos com alimentação água automática e dispensador para ração e para feno.	Não especificado
Nº de parques interiores	6	cercados temporários em torno dos moroiços (para adaptação coelhos)	Não especificado

Durante o Projeto + Coelho 2, a equipa do GT do INIAV realizou 3 visitas a Santarém, acompanhadas pelo Sr. Jacinto Amaro (presidente da Fencaça), pelo Engº António Sequeira (INIAV I.P.) e pelo Sr. Alfredo Lobato (ex-funcionário do Pólo de Santarém do INIAV e Presidente do Clube de Caçadores do Vale Santarém). Na primeira visita, foi identificada uma área com 1 Ha dentro de uma zona conhecida por "Folha do Carril", como local potencial para a reserva de Coelho-bravo (**Figura 103**).

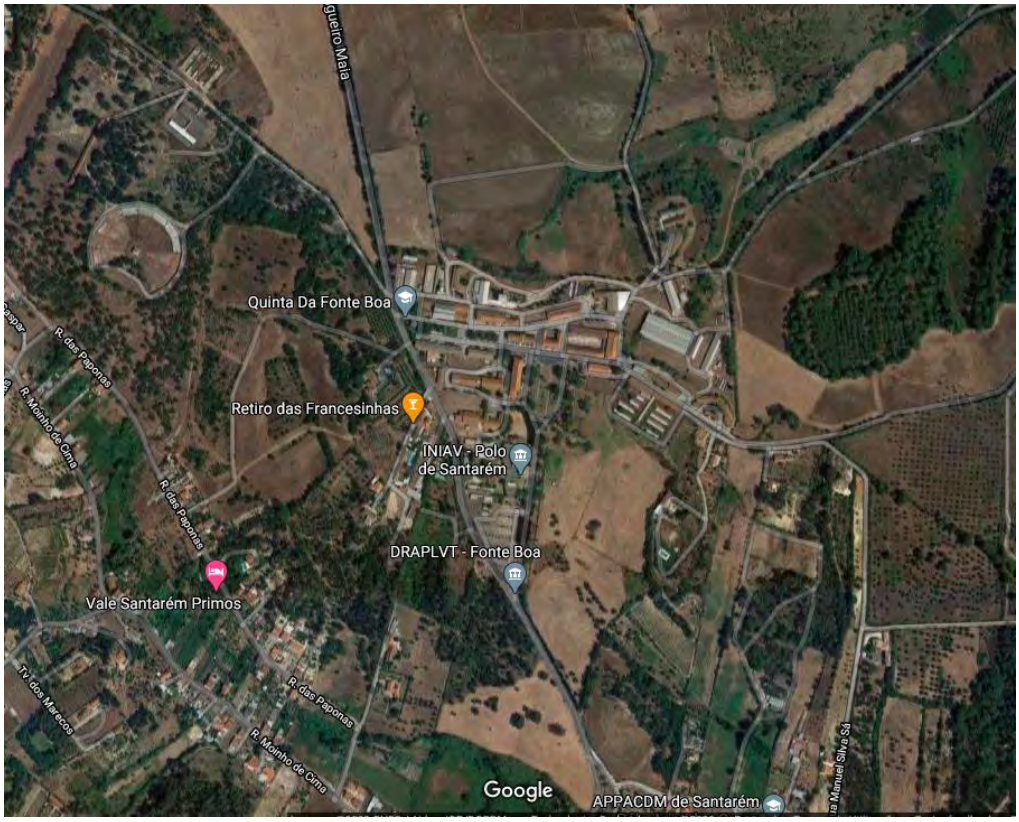


Figura. 103. Vista aérea da Folha do carril, junto à margem direita da fotografia.

Contudo, a emergência recente de um vírus recombinante da mixomatose em lebre-Ibérica (meados de 2018), cujo impacto nas populações selvagens (*Lepus granatensis*) de Portugal e Espanha tem sido muito significativo, exigiu uma mudança de estratégia inicial, nomeadamente a reformulação da reserva de núcleo populacional de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*) inicialmente prevista para apenas esta espécie, por forma a acomodar as duas espécies de leporídeos (coelho-bravo e lebre-ibérica). Por esta razão, a construção da reserva genética não foi avançada no decurso do Projecto +Coelho 2, estando prevista a sua construção no futuro. A partilha de infraestruturas para o maneio e gestão das duas espécies permitirá maximizar os benefícios, reduzir custos e potenciar o apoio técnico necessário, relativamente a uma solução alternativa de criar duas reservas genéticas geograficamente separadas. Foi preparada uma Memória Descritiva para submeter a candidatura de financiamento.

Assim, na última visita, realizada a 8 de setembro de 2020, e tendo já em vista a construção de uma reserva conjunta para coelho-bravo e lebre-ibérica, a totalidade da "Folha do Carril" que compreende uma área de 7 hectares, foi considerada adequada em termos de características e dimensão, para o estabelecimento de uma reserva nacional de leporídeos silvestres (**Figura 104**).

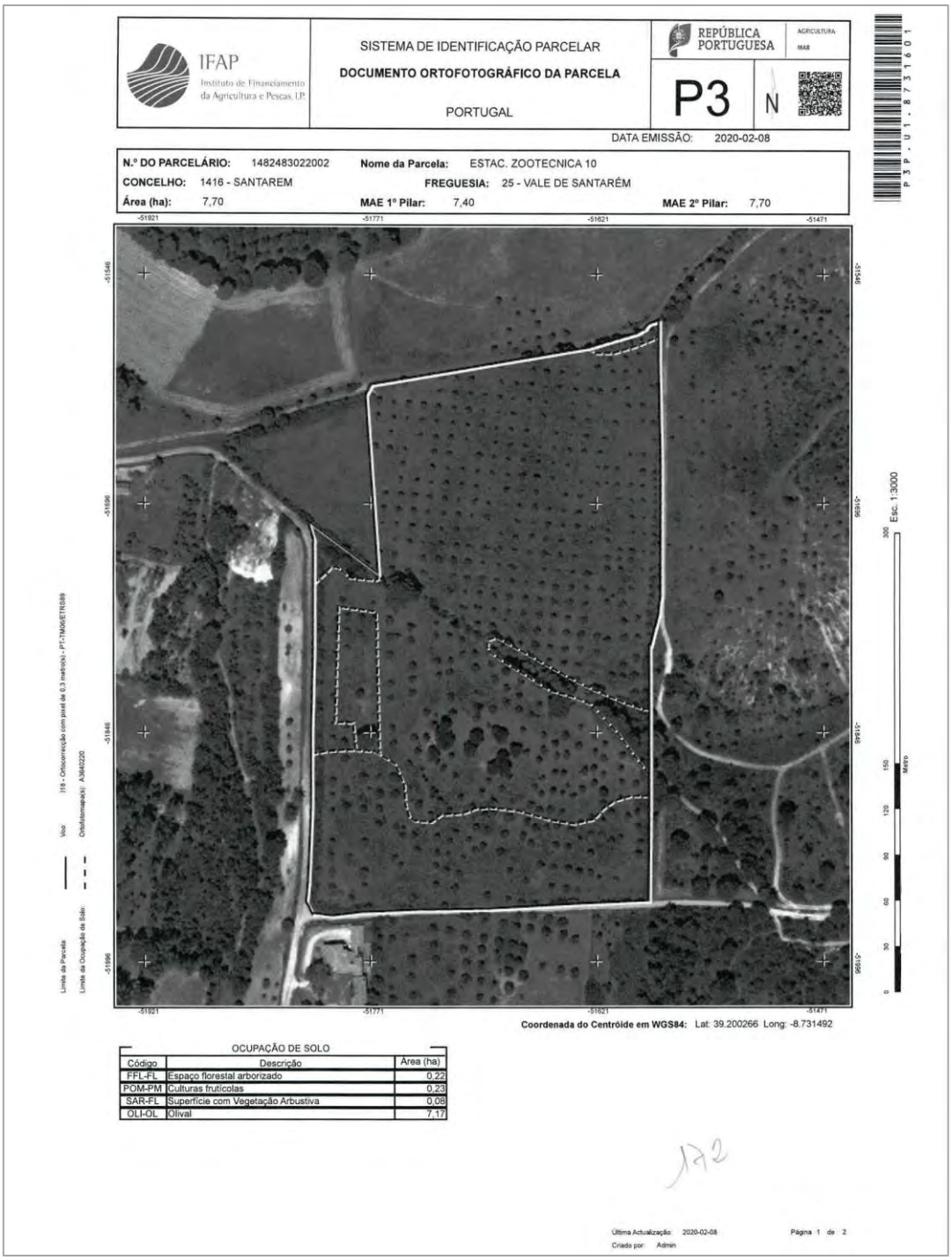


Figura. 104. Planta sem divisões. Escala 1:3000.

Com já referido, a reserva genética de coelho-bravo em Santarém (INIAV) não foi implementada, tendo sido solicitada transferência da verba prevista para outras rúbricas. Também o cercado previsto para Alijó (CNCP) não foi implementado por falta de resposta aos pedidos de orçamento que aconteceram durante a pandemia. No entanto, a CNCP identificou um cercado que põe à disposição para o que for necessário.

Assim, no decurso do Projecto +Coelho 2, foram implementados dois cercados pela ANPC e pela FENCAÇA, respetivamente na Companhia das Lezírias (**Figura 105**) e no Ciborro.



Figura 105. Vista do interior do Cercado construído pela ANPC na Companhia Das Lezírias.

A ANPC desenvolveu contactos com a Companhia das Lezírias para a construção de um cercado de reprodução na ZCT gerida por esta entidade em propriedade própria, tendo aí sido feito trabalho de prospeção de local adequado, com apoio da equipa do CIBIO (**Figuras 106** a **112**).
Foi selecionada uma área onde historicamente ocorriam grandes densidades de coelho-bravo, beneficiando ainda de permitir o acesso a água e a energia elétrica produzida por paneis solares. O cercado foi instalado com recurso a aquisição de serviços de acordo com caderno de encargos definido pela ANPC.
A ANPC idealizou ainda um sistema de alimentação e abeberamento que foi executado, construindo unidades cobertas com comedouros (dispensadores de ração e dispensadores de feno) e bebedouros (próprio para coelhos). O sistema de alimentação de água é contínuo e permite ainda a realização de regas no interior do cercado caso seja considerado necessário para potenciar o crescimento de vegetação herbácea.
A cerca perimetral foi instalada de forma a garantir o isolamento da população de coelhos no interior do cercado, bem como para prevenir a entrada de predadores terrestres. Para tal recorreu-se a uma combinação de redes de malhas diferenciadas bem como à instalação de três linhas sequenciais de cerca elétrica que impedem a entrada de predadores terrestres bem como impedem a utilização dos postes da cerca perimetral como poisos de caça para predadores alados, diurnos e noturnos.
Não tendo sido possível cobrir a totalidade do cercado com rede de proteção por questões orçamentais, complementarmente foi criada uma proteção suplementar contra predadores alados, instalando uma grelha de cabos de *nylon*, agarrada aos postes da cerca perimetral, cruzando-se de forma a impedir e desincentivar o voo de aves de rapina.
A gestão e vigilância corrente do cercado estão a ser asseguradas pela equipa da Companhia das Lezírias que tem dado uma colaboração extremamente importante, em articulação com a ANPC.

Para facilitar a monitorização, foram instaladas várias câmaras de fotoarmadilhagem que permitem ir avaliando a evolução da população.

A população fundadora deste cercado foi capturada em local próximo e com solos com características semelhantes, com recurso a credencial emitida pelo ICNF. As capturas foram realizadas sob coordenação da ANPC com o apoio do CIBIO, INIAV, ICNF, DGAV e Companhia das Lezírias.

Nos termos previstos na OE.10, foi realizada a recolha de amostras para análises genéticas e serológicas tendo os animais capturados (28 exemplares) sido mantidos em quarentena até à obtenção dos resultados laboratoriais realizados pelo CIBIO.

Os resultados obtidos confirmaram que a totalidade dos exemplares correspondem à subespécie *O. C. algirus* e o nível de seropositividade à DHV foi muito elevado.

A população fundadora do cercado instalado na Companhia das Lezírias dá sinais de boa adaptação e franco crescimento, detetando-se abundante reprodução.

As dificuldades resultantes da pandemia de Covid-19 e a interrupção entretanto ocorrida, nomeadamente o avanço para a fase III do projeto + Coelho, condicionaram a realização de trabalhos de capturas, recolha de amostras e monitorização desta população tendo em vista aferir a importância da seropositividade das populações fundadoras de unidades de reprodução de coelho-bravo, para a recuperação desta espécie.

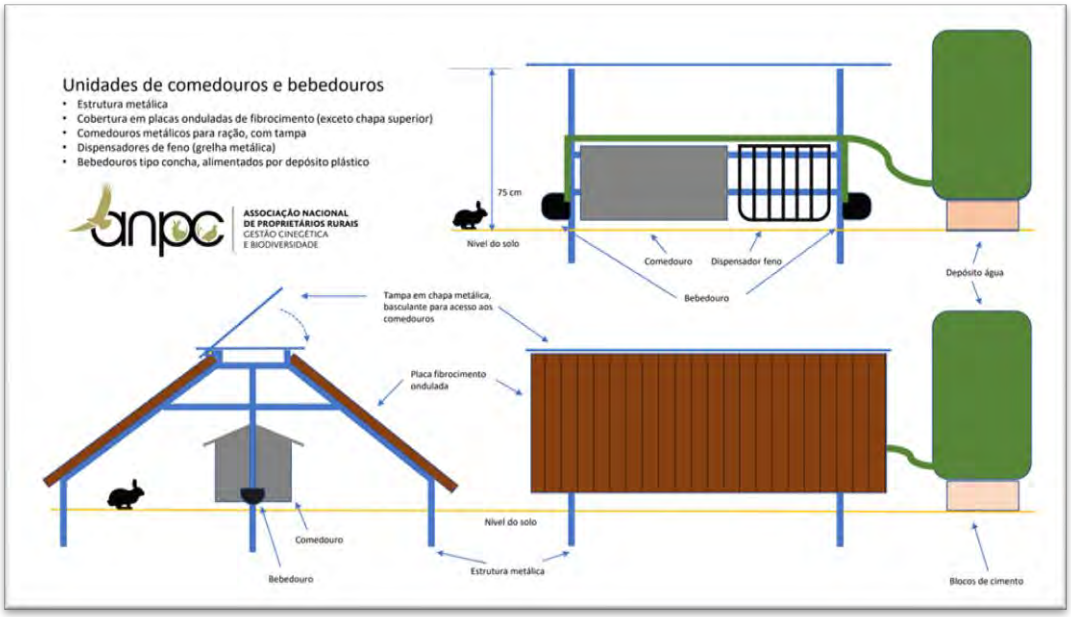


Figura 106. Características das unidades de comedouro/bebedouro instaladas pela ANPC no cercado da Companhia das Lezírias.

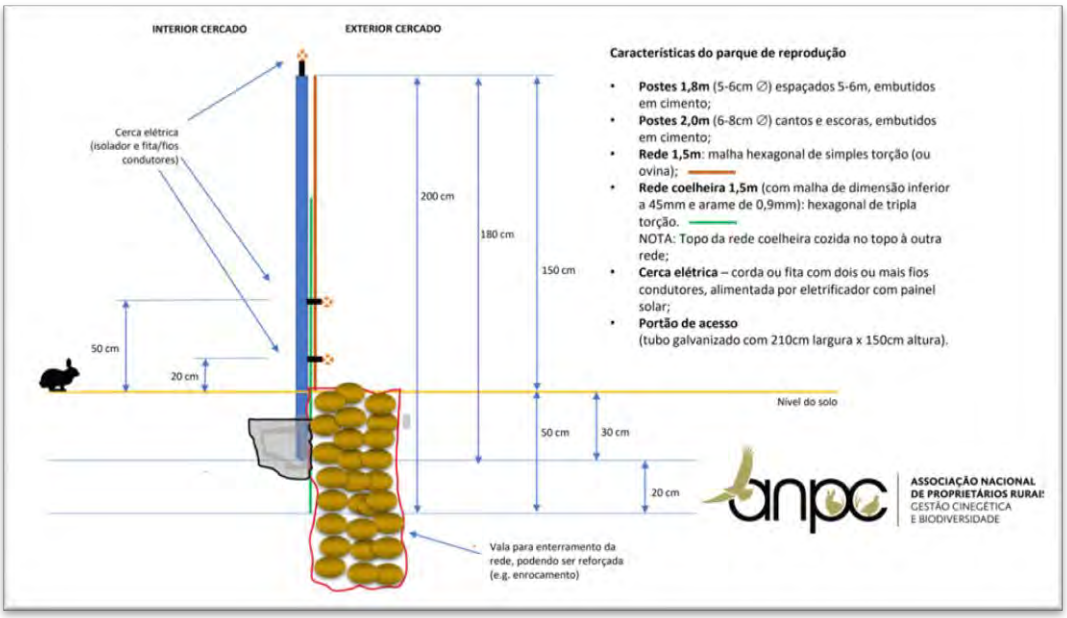


Figura 107. Características do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias.



Figura 108. Vala para enterramento rede e enrocamento no cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias.



Figura 109. Aspeto geral do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias (comedouros/bebedouros, moroiços, cercas temporárias e área de alimentação).



Figura 110. Portão de acesso ao Cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias.



Figura 111. Vista geral do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias.



Figura 112. Cerca elétrica para proteção contra predadores e monotorização do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias.

Avaliação da pureza genética dos animais para os cercados de reprodução; caracterização Genética e Deteção de Hibridação e Coelho-bravo

Objetivo

Proceder à caracterização genética e deteção de hibridação entre coelho-bravo (WILD) e coelho doméstico (DOM), ou entre as subespécies selvagens *Oryctolagus cuniculus algirus* (ALG) e *O. c. cuniculus* (CUN) por forma a garantir a pureza genética dos animais selecionados para população fundadora.

Amostragem

Foram analisadas 28 amostras de coelho-bravo provenientes de uma área de terreno não ordenado da Freguesia de Alpiarça, ao abrigo de credencial emitida pelo ICNF (Credencial n.º 2/2020), destinados à translocação para cercado de reprodução, localizado na zona de caça turística de Roubão, Braço de Prata e Outras, processo nº 66, a pedido da Companhia das Lezírias, SA.

Metodologia

A caracterização genética de 28 indivíduos foi realizada no CIBIO, Campus de Vairão, usando um total de 32 marcadores genéticos do tipo SNP (polimorfismos nucleotídicos simples), dos quais 31 representam o genoma nuclear e um representa o genoma mitocondrial[1].

As amostras foram rececionadas no CIBIO a 27 de outubro de 2020.

Este painel de marcadores foi otimizado a partir de resultados científicos obtidos ao longo de mais de 25 anos de estudo das populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica[2–8].

Para detetar hibridação entre DOM e WILD, e entre ALG e CUN utilizaram-se três tipos de análises estatísticas:

i) o índice de hibridação doméstico (HI_DOM = número de alelos DOM/número de alelos DOM+WILD) foi estimado usando oito SNPs (DW_Chr12_2, DW_Chr18, DW_Chr4, DW_Chr7, DW_Chr12, DW_Chr18_2, DW_ChrX2, DW_ChrX3);

ii) o índice de hibridação *O. c. cuniculus e O. c. algirus* (HI_CUN = número de alelos CUN/número de alelos CUN+ALG) foi estimado usando 22 SNPs (AC_Chr11, AC_Chr13, AC_Chr17, AC_Chr18, AC_Chr20_2, AC_Chr3_2, AC_Chr3_3, AC_Chr9, AC_Chr1, AC_Chr14_2, AC_Chr15_2, AC_Chr12, AC_Chr4, AC_Chr4_2, AC_Chr6, AC_Chr7, AC_Chr8, AC_ChrX2, AC_ChrX3, AC_ChrX4, AC_ChrX1, AC_ChrX5);

iii) a análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE[9,10], que permite inferir a composição genética da população e estimar a proporção de genes DOM, ALG e CUN em cada indivíduo. Esta análise foi realizada usando os 30 SNPs descritos anteriormente, comparando os coelhos em análise com uma base de dados existente no CIBIO/InBIO com mais de 250 indivíduos de 28 populações de toda a Península Ibérica, bem como de coelhos domésticos. Além disso, incorporou-se a

iv) análise filogeográfica do gene citocromo-B (CytB) do DNA mitocondrial[5] e do gene SRY do cromossoma Y[11], na interpretação final dos resultados. Com base nos valores de referência estimados para as populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica, os indivíduos são classificados em coelhos domésticos, coelho-bravo *O. c. algirus* ou *O. c. cuniculus,* ou híbridos(**Tabela 76**).

Tabela 76. Critérios definidos para a classificação genética dos indivíduos com base nas análises estatísticas realizadas [(i) índice de hibridação doméstico (HI_DOM), (ii) índice de hibridação *O. c. cuniculus* (HI_CUN), (iii) análise Bayesiana e (iv) análise filogeográfica] e valores de referência obtidos para as populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica.

i) índice de hibridação doméstico (HI_DOM)	**ii) Índice de hibridação *O. c. cuniculus* (HI_CUN)**	**iii) Análise Bayesiana**		**iv) Análise filogeográfica**		**Interpretação final**
		K2 (ALG/CUN)	**K3** (DOM/CUN/ALG)	**CytB**	**SRY**	
>90%	-	<90% ALG	>90% DOM	B	B	Coelho doméstico
<30%	>80%	<90% ALG	>90% CUN	B	A ou B	Coelho-bravo – *O. c. cuniculus*
<10%	<20%	>90% ALG	>90% ALG	A	A	Coelho-bravo – *O. c. algirus*
>10% (ALG) <90% ou >30% (CUN) <90%	>20% & <80%	<90% ALG	<90% DOM/CUN/ALG	A ou B	A ou B	Híbrido

Resultados e conclusões

A classificação genética dos 28 indivíduos está sumarizada na **Tabela 77**.

Tabela 77. Tabela 2: Classificação genética dos indivíduos analisados.

Código (Reservado aos nossos serviços)	**Identificação da amostra**	**Proveniência**	**Coelho doméstico (DOM)**	**Coelho-bravo**		**Híbrido**
				O. c. algirus (ALG)	*O. c. cuniculus* (CUN)	
CA20-153	313			X		
CA20-154	314			X		
CA20-155	315			X		
CA20-156	316			X		
CA20-157	317			X		
CA20-158	318			X		
CA20-159	319			X		
CA20-160	320			X		
CA20-161	321			X		
CA20-162	322			X		
CA20-163	323			X		
CA20-164	324			X		
CA20-165	325			X		
CA20-166	326			X		
CA20-167	327			X		
CA20-168	328			X		
CA20-169	329			X		
CA20-170	330			X		
CA20-171	331			X		
CA20-172	332			X		
CA20-173	333			X		
CA20-174	334			X		
CA20-175	335			X		
CA20-176	336			X		
CA20-177	337			X		
CA20-178	339			X		
CA20-179	339B			X		
CA20-180	340			X		

Nota: o ICETA não se responsabiliza por nenhum tipo de consequências que os resultados dos testes possam trazer. A colheita e envio das amostras são da exclusiva responsabilidade do cliente que solicita os testes.

A nível individual, todas as amostras possuem uma composição genética típica de coelhos-bravos da subespécies *O. c. algirus*.

A nível populacional, considerando que as amostras pertencem à mesma população, possuem uma composição genética típica de populações selvagens da subespécie *O. c. algirus,* presente na região Sudoeste da Península Ibérica, incluindo Portugal Continental.

13. Promover ações de translocação com animais imunizados pelo contato natural com RHDV2 (OE. 10)

Objetivo operacional 1: **Estabelecer rede de cercados de reprodução com animais com elevados níveis de anticorpos**
Atividade 1: Identificação de núcleos de alta densidade de coelho-bravo, recolha de amostras para análise serológica e caracterização das condições biofísicas
Atividade 2: Análises serológicas
Atividade 3: Realização de capturas e translocação para cercados de reprodução

Objetivo operacional 2: **Promover a translocações com animais imunizados pelo contacto natural com RHDV2**
Atividade 1: Ensaios de translocações com animais com elevados níveis de Ac, criados em cercados de reprodução (médio prazo) Atividade 2: Ensaios de acções de transçocação com animais capturados em núcleos com elevados níveis de Ac (curto prazo)

Os cercados de reprodução desenvolvidos no âmbito da medida 7.9, deverão ter como núcleo fundador indivíduos provenientes de populações onde se tenha observado a existência de maior resistência aos vírus circulantes (preferencialmente provenientes da própria zona de caça ou de zonas de caça próximas), em especial de populações onde se tenha comprovado por análise serológica existirem níveis de anticorpos (Ac) elevados.
Nesse sentido, deverão primeiramente ser identificados núcleos com elevados níveis de Ac, para os quais se deverá fazer uma caracterização das condições biofísicas existentes; seguindo-se a obtenção de autorizações (das zonas de caça envolvidas e do ICNF) para proceder à captura de exemplares que possam ser translocados para cercados de reprodução, onde idealmente ocorram características biofísicas semelhantes às da origem.
Os coelhos produzidos nos cercados de reprodução serão posteriormente utilizados para a realização de translocações dentro das próprias zonas de caça ou para a fundação de novos cercados de reprodução noutras zonas de caça.
Pretende-se avaliar, por um lado, as taxas de produção dos cercados de reprodução, bem como avaliar o sucesso de translocações posteriores, com base nos animais produzidos, quer em termos de sobrevivência dos indivíduos, quer ainda em termos de contributo para a população local, em liberdade.
Para a realização de translocações, serão utilizados cercados de adaptação, mais simples, cuja eficiência deverá igualmente ser avaliada. As ações de repovoamento deverão igualmente constar do programa de demonstração e divulgação.

No âmbito da criação pela ANPC de um cercado de reprodução na Companhia das Lezírias com animais com elevados níveis de anticorpos, para além da construção do cercado em si próprio (OE.9), foram conduzidas três atividades conducentes a esse objectivo.
Assim, no âmbito da OE.10 definiu-se que o núcleo fundador deste cercado deveria ser proveniente de populações onde se tenha observado a existência de maior resistência aos vírus circulantes (preferencialmente provenientes da própria zona de caça ou de zonas de caça próximas), em especial de populações onde se tenha comprovado por análise serológica existirem níveis de anticorpos (Ac) elevados.
Assim, no âmbito da Atividade 1 deste OE (Identificação de núcleos de alta densidade de coelho-bravo, recolha de amostras para análise serológica e caracterização das condições biofísicas), considerando que

as populações de coelho-bravo existentes atualmente na Companhia das Lezírias são muito reduzidas, optou-se por procurar identificar núcleos de alta densidade na região, os quais poderiam dar garantias de elevados níveis de anticorpos.
Deste trabalho de prospeção resultou a identificação de um núcleo na zona de Alpiarça, correspondente a uma população que persiste neste local com elevada densidade há vários anos, denotando uma grande capacidade de resiliência e auspiciando a poder tratar-se de uma população com elevado níveis de anticorpos.
Esta população estava situada numa propriedade rural localizada numa zona periurbana e em regime não ordenado, nomeadamente uma vinha abandonada e em avançado estado de degradação, com sobreiros dispersos e solos arenosos, atualmente utilizada como pastagem para gado ovino.
Tratava-se por conseguinte de uma população adaptada a solos arenosos semelhantes aos existentes na Companhia da Lezírias e na área do cercado de reprodução.
Obtida a autorização do proprietário para a realização da captura, proprietário esse que inclusivamente sofria prejuízos causados pelos coelhos nas pastagens, foi pela ANPC solicitada ao ICNF (e obtida) autorização para a captura de exemplares neste local, mediante credencial emitida para o efeito (CREDENCIAL N.º 2 / 2020 / Outras - DRCNFLVT/DECF CAPTURAS DE COELHO-BRAVO, Anexo VI-A e VI-B).
As capturas foram realizadas com recurso a furões e redes de tresmalho, tendo sido conduzidas por uma equipa pluridisciplinar que contou com a ANPC, CIBIO, INIAV, ICNF, DGAV, Companhia das Lezírias, o proprietário dos furões (Sr. Eurico Manuel Tomé Ferreira, detentor do registo de furões n.º 3/DCNFLVT/ICNF) e um conjunto de voluntários que ajudaram na operação (**Figura 113**).
Relativamente a esta ação de captura foi produzida uma notícia (**Anexo VII-A**).
Optou-se por combinar as atividades 2 e 3 da medida 1 desta OE, numa única operação concertada.
Foram capturados 28 exemplares dos quais 17 fêmeas e 11 machos que iam sendo identificados há medida que iam sendo capturados, com marcas de orelha e microship subcutâneo, tomadas medidas biométricas e feita avaliação veterinária (**Figura 113**).
Foram ainda recolhidas amostras de sangue e de tecidos para a realização de análises genéticas e serológicas a todos os animais, para além da recolha de parasitas para análises posteriores (**Figura 113**).
No decorrer do processamento dos animais, foi ainda administrado desparasitante de acordo com indicações veterinárias (**Figura 113**).
No final da ação de captura, os animais foram transportados de imediato para a Companhia das Lezírias onde tinha sido previamente construída uma estrutura de isolamento profilático e quarentena onde iriam permanecer individualizados até à obtenção dos resultados das análises genéticas e serológicas (**Figuras 114** e **115**).
A equipa do CIBIO coordenada pelo Dr. Nuno Santos conseguiu transportar as amostras recolhidas para o laboratório em Vairão no próprio dia, para processamento imediato, tendo os resultados sido obtidos 48h depois, permitindo que os animais pudessem sair da quarentena.
Os resultados obtidos foram muito positivos, comprovando-se que os exemplares capturados correspondiam 100% à subespécie *O. c. algirus* e o nível de anticorpos foi considerado elevado (53,6% no total dos indivíduos amostrados) (**Anexo VI-C** e **Anexo VI-D**).
Assim, no prazo de 72h da captura foi possível proceder à libertação dos exemplares considerados aptos para constituírem a população fundadora do cercado de reprodução construído pela ANPC na Companhia das Lezírias, seguindo recomendação do CIBIO com base na seropositividade dos exemplares e na relação macho/fêmea.
Os exemplares que denotaram níveis de anticorpos mais baixos ou seropositividade negativa, por não

corresponderem ao perfil alvo para a população fundadora do cercad de reprodução, foram libertados num cercado distinto, nomeadamente um cercado de adaptação para repovoamento, situado na Companhia das Lezírias.
Os resultados da captura, análises realizadas e libertação de animais fizeram parte de relatório enviado pela ANPC ao ICNF, incluindo as fichas de captura e largada (ANEXO VI-E).

Tal como já anteriormente referido, as dificuldades resultantes da pandemia de Covid-19 e a interrupção entretanto ocorrida, nomeadamente o avanço para a fase III do projecto MAIS COELHO, condicionaram a realização de trabalhos de capturas, recolha de amostras e monitorização desta população tendo em vista aferir a importância da seropositividade das populações fundadoras de unidades de reprodução de coelho-bravo, para a recuperação desta espécie.
De igual forma, não foi ainda possível avançar com as fases subsequentes, nomeadamente o aproveitamento dos indivíduos produzidos no cercado de reprodução construído na Companhia das Lezírias para ações de repovoamento nesta ZCT, algo que se espera poder ocorrer a curto prazo e terminada a época de reprodução, sendo que a população fundadora do cercado dá sinais de boa adaptação e franco crescimento, detetando-se abundante reprodução.



Figura 113. Ação de captura de coelho-bravo conduzida pela equipa do projeto para a criação do núcleo fundador do cercado de reprodução construído na Companhia das Lezírias.

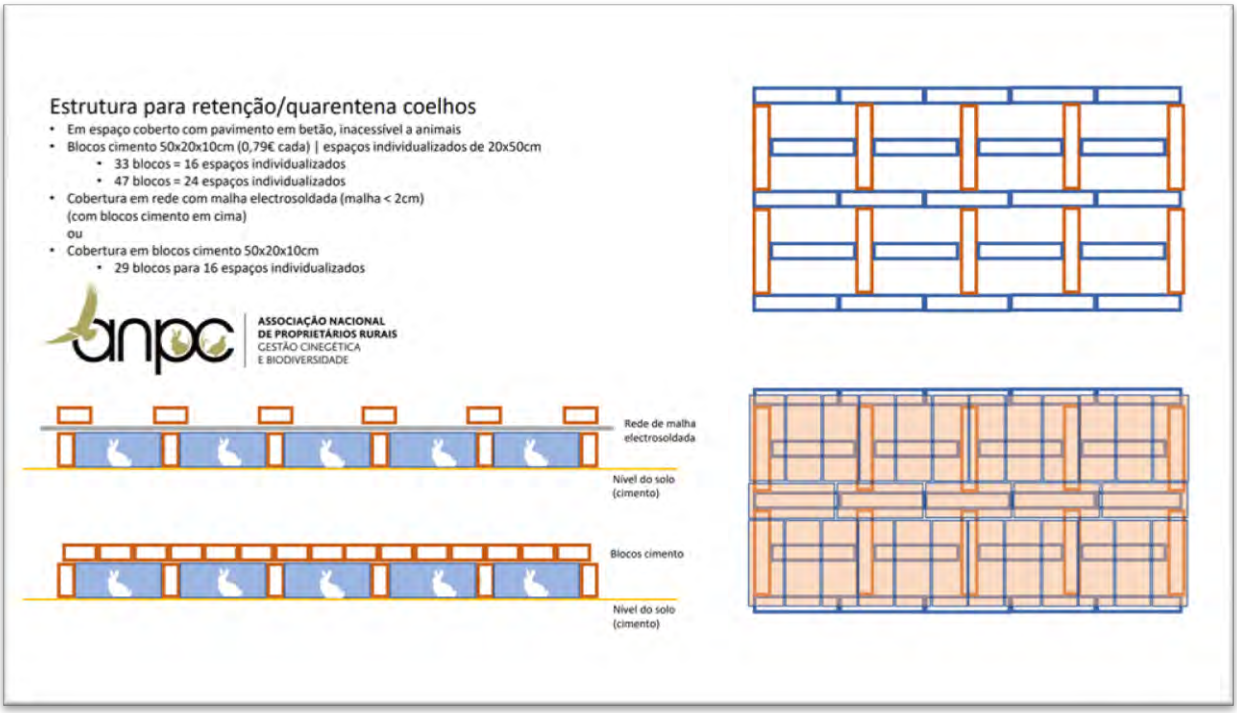


Figura 114. Estrutura de retenção e quarentena para coelho-bravo, desenvolvida pela ANPC.



Figura 115. Colocação de exemplares capturados na estrutura de quarentena construída na Companhia das Lezírias.

14. Divulgar e publicar as atividades técnico-científicas desenvolvidas e os resultados científicos obtidos no âmbito do Projeto +Coelho2 para diferentes públicos e promover ações de demonstração (OE.11)

A avaliação detalhada da informação gerada, e a disseminação para os tomadores de conhecimento (OSC), são fundamentais na definição e implementação de medidas de gestão sustentáveis que invertam os processos recorrentes de declínio das populações de coelho-bravo e de lebre-ibérica, na compatibilização da exploração cinegética com a situação atual de reduzidos efetivos em muitas áreas do território.

Tal como no 1º ano do Projeto, a promoção e o alargamento da política de comunicação e de sensibilização ambiental, constituiu um objetivo prioritário das atividades do GT, no sentido de se estimular o interesse das populações pela gestão e pela conservação das populações silvestres naturais de leporídeos. Assim, no 2º ano do Projeto, realizaram-se múltiplas atividades de divulgação e transferência de conhecimento, visando manter permanentemente informados todos os agentes e tomadores de conhecimento implicados na recuperação do coelho-bravo e lebre-ibérica, bem como a sociedade-civil, e procurando envolver todos os atores nos esforços para a sua recuperação.

Durante 2019, foi dado particular enfoque à realização de ações de demonstração e divulgação no terreno, impossibilitadas em 2020 devido à Pandemia por SARS-CoV-2.

Notícias no *banner* +Coelho

No período a que se refere este relatório a equipa do INIAV, em colaboração com os parceiros do Projecto, publicou **70** Notícias de Divulgação no seu website (disponíveis em http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos/mais-coelho-em-noticia, **Anexo VII-A)**, sendo estimado terem sido lidas por, pelo menos, 1380 pessoas (20 leitores/noticia).):

1. Notícia nº42 (10 de outubro de 2018). Participação do Grupo +Coelho no XXIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia, realizado em Coimbra, a 9 e 10 de Junho de 2018;
2. Notícia nº43 (10 de outubro de 2018). Participação do Grupo +Coelho no Joint ESVP & ECVP Congress, realizado na Roménia de 5 a 8 de setembro de 2018;
3. Notícia nº44 (11 de outubro de 2018). Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em Evoramonte, Distrito de Évora, no dia da Abertura da Caça da Época Venatória 2018/2019, a 5 outubro de 2018;
4. Notícia nº45 (11 de outubro de 2018). Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho e dos Resultados de 1 ano de Projeto, bem como do Centro de Competências para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade, na 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova de 5 a 7 de outubro de 2018;
5. Notícia nº46 (14 de outubro de 2018). Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, no Ciborro, Distrito de Évora, a 7 de outubro de 2018;

6. Notícia nº47 (15 de outubro de 2018). Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, na Malarranha (Monte dos Condes), concelho de Mora, a 13 de outubro de 2018;
7. Notícia nº48 (19 de outubro de 2018). Morte de Lebres em Espanha, nas comunidades autónomas da Andaluzia e Castilla-La Mancha, durante o mês de julho de 2018;
8. Notícia nº49 (23 de outubro de 2018). Esclarecimentos sobre o artigo publicado no Correio da Manhã a 22 de outubro, anunciando a criação de coelhos geneticamente modificados, resistentes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos;
9. Notícia nº50 (29 de outubro de 2018). Participação do CCEGSECB na Conferência "Caça e Alimentação" que decorreu a 27 de outubro de 2018, no âmbito da IX edição da Feira de Caça de Mértola;
10. Notícia nº51 (30 de outubro de 2018). Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em Alcaria Ruiva, concelho de Mértola, a 27 de outubro de 2018;
11. Notícia nº52 (5 de novembro de 2018). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho e do Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) na Comemoração dos 25 anos da CNCP, inserida na 17ª edição da Feira Internacional do Norte, em Bragança, no dia 2 de novembro de 2018;
12. Notícia nº53 (5 de novembro de 2018). Súmula dos resultados da pesquisa do Vírus da Mixomatose na amostragem de leporídeos recolhida no 1º ano de Projeto (agosto 2017 - agosto 2018) e disponibilização dos resultados preliminares do 2º ano de Projeto, obtidos nos meses de setembro e outubro de 2018;
13. Notícia nº54 (8 de novembro de 2018). Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre;
14. Notícia nº55 (8 de novembro de 2018). Detetado o primeiro caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial, no dia 28 de outubro de 2018;
15. Notícia nº56 (14 de novembro de 2018). Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial, no dia 3 de novembro de 2018;
16. Notícia nº57 (15 de novembro de 2018). Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico laboratorial da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados;
17. Notícia nº58 (23 de novembro de 2018). Projeto +Coelho e atividade cinegética promovidos, durante a Semana das Ciências, junto dos estudantes da Escola Internacional de Torres Vedras, no dia 21 de novembro;
18. Notícia nº59 (8 de janeiro de 2019). Primeira Reunião Formal do Projeto FIGHT-2, no INIAV, em Oeiras, a 7 de janeiro de 2019;
19. Notícia nº60 (4 de fevereiro de 2019). Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro de 2019;

20. Notícia nº61 (10 de abril de 2019). Grupo de Trabalho +Coelho intervém, a convite, nas jornadas Xuntos Pola Caza, que se realizaram em Lobios, Galiza, Espanha, a 31 de março de 2019;
21. Notícia nº62 (7 de maio de 2019). Intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho na EXPOCAÇA, Santarém, 5 de maio de 2019;
22. Notícia nº63 (10 de maio de 2019). Participação do GT +Coelho nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana, 8 de maio de 2019;
23. Notícia nº64 (13 de maio de 2019). Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019;
24. Notícia nº65 (28 de maio de 2019). Prémio SPPA 2019 será atribuído a trabalho desenvolvido por Fábio Abade dos Santos em Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos nos Laboratórios do INIAV e FMV-UL;
25. Notícia nº66 (14 de junho de 2019). Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Assembleia Geral da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior, em Pinhel, 1 de junho de 2019;
26. Notícia nº67 (17 de junho de 2019). Participação do Grupo +Coelho no XXIV Encontro da SPPA, realizado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), de 15 a 16 de junho de 2019;
27. Notícia nº68 (22 de junho de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, Ponte de Lima, 21 a 23 de junho;
28. Notícia nº69 (24 de junho de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 30º aniversário do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, 22 de junho de 2019;
29. Notícia nº70 (30 de junho de 2019). Participação do GT +Coelho, através do Projeto Fight-two, nas Jornadas MED/ICAAM Universidade de Évora, 28 de junho de 2019;
30. Notícia nº71 (30 de junho de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho;
31. Notícia nº72 (6 de julho de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
32. Notícia nº73 (6 de julho de 2019). Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), intitulado "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça" Cidade Real, 1 a 4 de julho de 2019;
33. Notícia nº74 (6 de julho de 2019). Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), intitulado "Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo". Cidade Real, 1 a 4 de julho de 2019;
34. Notícia nº75 (6 de julho de 2019). Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), intitulado "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões" Cidade Real, 1 a 4 de julho de 2019;
35. Notícia nº76 (6 de julho de 2019). Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), "Selvagem ou doméstico? algirus

ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal". Cidade Real, 1 a 4 de julho de 2019;

36. Notícia nº78 (6 de julho de 2019). Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, intituladas "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica", "Está o património genético da perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (*Sus scrofa*)". 1 a 4 de julho de 2019;
37. Notícia nº79 (6 de julho de 2019). Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), intituladas "Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica" e "A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares". Cidade Real, 1 a 4 de julho de 2019;
38. Notícia nº80 (9 de julho de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho de 2019.
39. Notícia nº81 (29 de agosto de 2019). Implementação da Medida 7.6 do Projeto +Coelho 2: Ensaio de Vacinação em lebre-ibérica;
40. Notícia nº82 (2 de setembro de 2019). 1º Evento de captura de lebre-ibérica, realizado em Canhestros a 31 de agosto de 2019;
41. Notícia nº83 (6 de setembro de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 2º Campo de Férias ANPC – "Caça, Conservação da Natureza e Biodiversidade, Herdade da Barroca d' Alva, 4 de setembro de 2019;
42. Notícia nº84 (6 de setembro de 2019). Recomendações práticas para a redução da transmissão da mixomatose em lebre-ibérica;
43. Notícia nº85 (6 de setembro de 2019). Resultados laboratoriais da monitorização do vírus da mixomatose em lebre ibérica entre setembro de 2018 e agosto de 2019;
44. Notícia nº86 (9 de setembro de 2019). 2º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Almodôvar, a 7 de setembro de 2019;
45. Notícia nº87 (12 de setembro de 2019). Grupo +Coelho no Workshop "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019;
46. Notícia nº88 (16 de setembro de 2019). 3º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada-Velha a 15 de setembro de 2019;
47. Notícia nº89 (30 de setembro de 2019). Participação do Projeto Figth-two, na 1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária, Atenas 26 a 27 de setembro de 2019;
48. Notícia nº90 (30 de setembro de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, 28 de setembro de 2019;
49. Notícia nº91 (3 de outubro de 2019). 4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019;
50. Notícia nº92 (6 de outubro de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na 5ª Reunião Internacional de Parasitas Apicomplexa em Animais de produção, realizada em Berlim 2 a 4 de outubro de 2019;
51. Notícia nº93 (7 de outubro de 2019). 5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019;

52. Notícia nº94 (10 de outubro de 2019). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 16º Encontro dos Utilizadores da ESRI, 9 de outubro de 2019;
53. Notícia nº95 (11 de outubro de 2019). 6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, 10 de outubro de 2019;
54. Notícia nº96 (15 de outubro de 2019). Participação do Grupo de Trabalho no evento Patrimónios do Sul, na Feira de Beja a 12 de outubro de 2019;
55. Notícia nº97 (16 de outubro de 2019). 7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019;
56. Notícia nº98 (21 de outubro de 2019). 8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Elvas, a 19 de outubro de 2019;
57. Notícia nº99 (26 de outubro de 2019). Inauguração da Escola de Caça, Pesca e Natureza na X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019;
58. Notícia nº100 (27 de outubro de 2019). 9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019;
59. Notícia nº101 (4 de novembro de 2019). 10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019;
60. Notícia nº102 (5 de novembro de 2019). Participação do GT +Coelho no encontro MIXOLEPUS-Avances en Investigation sobre el brote de mixomatosis em Liebres, Madrid, 30 de outubro de 2019;
61. Notícia nº103 (29 de novembro de 2019). Ação de Formação sobre o Inquérito Epidemiológico (Medida 7.3 do Projeto +Coelho 2), em Oeiras, a 28 de novembro de 2019;
62. Notícia nº104 (16 de dezembro de 2019). 11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019;
63. Notícia nº105 (30 de dezembro de 2019). 12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019;
64. Notícia nº106 (13 de janeiro de 2020). 13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura, a 9 de janeiro de 2020;
65. Notícia nº107 (1 de março de 2020). Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020;
66. Notícia nº 108 (6 de março de 2020). Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2);
67. Notícia nº 109 (22 de maio de 2020). Divulgação do Projeto Figth-2 em artigo jornalístico na revista científica da American Association for the Advancement of Science (AAAS), uma organização internacional sem fins lucrativos.
68. Notícia nº 110 (27 de outubro de 2020). Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça
69. Notícia nº 111 (19 de fevereiro de 2021). Reporte do Cercado de coelho-bravo da ANPC, em Alpiarça
70. Notícia nº112 (Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020)

Em forma de manuais práticos de apoio ao setor

1. Manual "Boas Práticas de Gestão", destinado a Gestores de Caça e Caçadores (em fase de finalização); (**Anexo VII-B**, versão de trabalho)
2. 2ª Edição do Manual, "Recuperação do Coelho-Bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e da Lebre (*Lepus granatensis*): Manual de Boas Práticas Sanitárias;

Em formato de folhetos

1. Folheto "MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES", 20 de setembro de 2019 (**Anexo VII-C**).
2. Folheto "Alerta sobre a circulação de um herpesvírus (LeHV-5) nas populações de lebre-ibérica", 10 de janeiro de 2021 (**Anexo VII-C**).

Em Alertas e Recomendações para minimizar a transmissão e disseminação de RHDV2 e mixomatose

Para além das brochuras mencionadas no ponto anterior, foram preparados **6 alertas sanitários** (disponíveis em http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos/mais-coelho-em-noticia, sendo estimado terem sido lidos por 50 pessoas por OSC) (**Anexo VII-D**);

1. Notícia nº48 (19 de outubro de 2018). Morte de Lebres em Espanha, nas comunidades autónomas da Andaluzia e Castilla-La Mancha, durante o mês de julho de 2018;
2. Notícia nº54 (8 de novembro de 2018). Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre;
3. Notícia nº55 (8 de novembro de 2018). Detetado o primeiro caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial, no dia 28 de outubro de 2018;
4. Notícia nº56 (14 de novembro de 2018). Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial, no dia 3 de novembro de 2018;
5. Notícia nº57 (15 de novembro de 2018). Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico laboratorial da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados;
6. Notícia nº84 (6 de setembro de 2019). Recomendações práticas para a redução da transmissão da mixomatose em lebre-ibérica;

Em entrevistas televisivas

As atividades do projeto +Coelho 2 foram objeto de entrevistas com os presidentes das OSCs, designadamente com:

1. Jacinto Amaro (FENCAÇA), em várias reportagens e entrevistas divulgadas nos noticiários da TVI, SIC e RTP, na véspera da abertura das épocas venatórias 19/20 e 20/21.

2. Jacinto Amaro (FENCAÇA), no programa "Sociedade Civil" na RTP 2, dia 09 de Maio de 2020.
3. Fernando Castanheira Pinto (CNCP) numa reportagem realizada pela RTP (programa Aqui Portugal, 6 de julho de 2019, XXIII edição da Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza), estimando-se uma visualização por 1000 pessoas.

Em colóquios e feiras de caça nacionais e estrangeiras (estimando-se uma média de 50 participantes por evento)

1. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova, que se realizou de 5 a 7 de outubro de 2018;
2. Divulgação do poster do Projeto Fight 2, na Feira da Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro;
3. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2 nas jornadas Xuntos Pola Caza, que se realizaram a 31 de março em Lobios, Galiza, Espanha;
4. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, na Expocaça, 31ªfeira internacional da Caça, Armas e Pesca, Santarém, 3 a 5 de maio de 2019;
5. Projecto +Coelho2, nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana, Toledo, 8 de maio de 2019;
6. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019;
7. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, na Assembleia Geral da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior, em Pinhel, 1 de junho de 2019;
8. "Dois anos de Projeto +Coelho: Objetivos, Estratégia e alguns Resultados", Margarida Duarte, XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, Ponte de Lima, 21 a 23 de junho;
9. "Projeto Mais Coelho", Margarida Duarte, 30º aniversário do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, 22 de junho de 2019;
10. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019;
11. Atividades e Desenvolvimentos do Projecto +Coelho2, no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, que decorreu no Pavilhão Multiusos em Arraiolos, Évora, Portugal, nos dias 28 e 29 de setembro de 2019;
12. "Mixomatose em lebre-ibérica", Carina Carvalho, Patrimónios do Sul, Parque de Feiras e Exposições Manuel de Castro e Brito, em Beja, no dia 12 de outubro de 2019;
13. Margarida Duarte, X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019;
14. "Aspectos genéticos e sanitários das populações de espécies cinegéticas" Paulo Célio Alves, II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020;
15. "Importância social, ambiental e económica da caça", Fernando Castanheira Pinto, II Fórum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020.

Em *workshops* de sensibilização do público em geral e do público jovem

Foram também realizadas duas ações de sensibilização do público jovem, nomeadamente

1. na semana das ciências na Escola Internacional de Torres Vedras (21 de Novembro de 2018, tendo atendido cerca de 50 crianças);
2. no Campo de Férias Caça, Gestão Cinegética e Biodiversidade, organizado pela ANPC na Herdade da Barroca d'Álva em Alcochete, a 4 de setembro de 2019, onde estiveram presentes 50 jovens.

Em congressos científicos

Num meio mais académico, os resultados e atividades do Projeto foram objeto de 12 divulgações em congressos científicos, através de apresentações orais ou de paneis científicos, estimando-se uma média de pelo menos 50 participantes por evento **Anexo VII-E**);

1. "Mixomatose, considerada uma doença de coelhos, emerge recentemente em lebre-ibérica: o que nos revela a histopatologia nestas duas espécies?", Fábio Abade dos Santos, XXIV Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (SPPA), Universidade de Trás-os-montes e Alto-Douro, de 15 a 16 de junho de 2019;
2. "Amostragem biológica em vida no *Oryctolagus cuniculus* algirus de sangue da veia jugular externa sob sedação com Midazolam", Fábio Abade dos Santos et al. Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
3. "Desenvolvimento de vacina edível para o controlo da doença hemorrágica viral (RHDV2) nos coelhos-bravos" Carina Carvalho, Jornadas MED/ICAAM, Universidade de Évora, 28 de junho de 2019;
4. "Importância do diagnóstico laboratorial no controlo das doenças da fauna selvagem e no apoio à gestão cinegética: o exemplo do projeto + coelho", Margarida Duarte, Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
5. "Preservação do património genético das espécies cinegéticas: uma garantia de sustentabilidade e certificação de qualidade,", Paulo Célio, Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
6. "Monitorização populacional de espécies cinegéticas: bases para uma exploração sustentável", Pedro Monterroso, Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
7. "SELECTPREDADORES, avaliação de novos métodos seletivos para a correção de densidades de predadores em Portugal", João Carvalho et al., Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
8. "Produção de vacinas para aplicação em Saúde Animal: da molécula ao isco", Ana Carina Silva, M. F. Q. Sousa, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, A. Roldão, Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;
9. "Aptidão do método de RT-qPCR específico para deteção de RHDV2: análise *in silico*", Carina L. Carvalho et al., Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho de 2019;

10. "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (*Sus scrofa*)", João Queirós, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
11. "Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal", Paulo Célio Alves, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
12. "Está o património genético da perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola", João Queirós, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
13. "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça", Margarida Duarte, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
14. "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões", Fábio Abade dos Santos, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
15. "Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo", Carina Carvalho, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
16. "A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares", Nuno Santos, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
17. "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica", João Queirós, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
18. "Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica", Nuno Santos, I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019;
19. "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Margarida Duarte, Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019;
20. "Project Fight-two: Development of an Edible Bait Vaccine to Control Rabbit Haemorrhagic Disease Virus 2 (RHDV2) in Wild Rabbits" Carvalho C., Monteiro M., Carvalho P., Mendonça P., Correia J., São Bras B., Peleteiro M. C., Duarte E., Mira A., Branco S., Roldão A., Duarte M. D.. Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária, Atenas 26 a 27 de setembro de 2019;
21. "Serological survey of *Neospora spp.* and *Besnoitia spp.* in wild rabbits in Portugal". Helga Waap, 5ª Reunião Internacional de Parasitas Apicomplexa em Animais de produção, realizada em Berlim 2 a 4 de outubro de 2019;

Assistência a reuniões Ibéricas

O GT participou em **3 reuniões** sobre Mixomatose em lebre-ibérica, organizados em Espanha, nomeadamente,

1. 1º encontro do Grupo MIXOLEPUS intitulado ´Avances en Investigation sobre el brote de mixomatosis em Liebres', que se realizou e Madrid, a 30 de outubro de 2019;
2. XVI JORNADAS CINEGÉTICAS DA EFA ORETANA, SUBORDINADAS AO TEMA "GESTIÓN DE LA LIEBRE IBÉRICA EN CASTILLA-LA MANCHA Toledo, 8 de Maio 2019;
3. Webseminar "Estudios recientes sobre LIEBRES", 27 de mayo de 2020, organizado pela Fundação Artemisan. Reinuão por Zoom.

Em revistas de circulação nacional para público especializado

O GT publicou **1** artigos em revistas nacionais para público especializado (médicos veterinários, estudantes universitários, etc) (**Anexo VII-F**):

1. "As principais ameaças infeciosas à saúde dos leporídeos selvagens de Portugal", Revista Veterinária Atual, online, 7 abril de 2020.
2. "Os coronavírus dos Animais e do Homem", Revista Veterinária Atual, Nº143, novembro de 2020.

Em revistas de circulação nacional para público não especializado

No âmbito das diferentes medidas do Projecto +Coelho 2 , formam publicados **10 artigos** em revistas nacionais para público não especializado (**Anexo VII-G**):

1. "Mixomatose confirmada em lebre caçada em Évora", Revista Caça e Cães de Caça, nº 254 / dezembro de 2018;
2. "Mixomatose: uma ameaça para a lebre-ibérica?" Revista Vida Rural, n.º 1845/março de 2019;
3. "Objetivos e estratégia do projeto +Coelho: primeiro ano de implementação". Revista Vida Rural nº 1850/setembro de 2019;
4. "20 perguntas & respostas sobre mixomatose em lebre-ibérica", Revista Caça & Cães de Caça, n.º 269 / março de 2020;
5. "Translocações e repovoamentos do coelho-bravo: importância da certificação genética e sanitária do coelho-bravo", Revista Caça & Cães de Caça, n.º270, abril de 2020;
6. "A relação entre o Plano de Ação; os Projetos +Coelho e Fight 2", Revista Caça & Cães de Caça, n.º270, abril de 2020;
7. "Os parceiros e as competências no Projeto Fight 2", Revista Caça & Cães de Caça, n.º270, abril de 2020;
8. "Vacina oral contra a doença hemorrágica. Para quando?", Revista Caça & Cães de Caça, n.º270, abril de 2020;
9. Papel do Médico-Veterinário na Caça Menor, Revista Caça & Cães de Caça, n.º271, junho de 2020;
10. A importância dos leporídeos no equilíbrio das cadeias tróficas e na biodiversidade ibérica. Carina Carvalho, Fábio A. Santos, Jéssica Monteiro, Margarida Duarte, Paulo Célio Alves, Ana Hora e Gonçalo Lopes. Vida Rural. Julho/Agosto 2020.

Em capítulos de livros

O GT publicou 1 capitulo no livro "Lagomorpha characteristics". O livro foi editado pela Editora IntechOpen (**Anexo VII-H**).

1. The Health and Future of the Six Hare Species in Europe: A Closer Look at the Iberian Hare DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91876.

Em revistas internacionais com arbitragem científica

Durante o Projeto +Coelho 2, foram publicados **10** artigos científicos em revistas internacionais, que permitiram partilhar com a comunidade internacional alguns dos resultados obtidos pelo GT (**Anexo VII-I**).

Três destes artigos estão em fase de revisão.

1. "Blood collection from the external jugular vein of Oryctolagus cuniculus algirus sedated with midazolam: live sampling of a subspecies at risk", Fábio A. Abade dos Santos, C.L. Carvalho, C. Peleteiro, S.I. Gabriel, R. Patrício, J. Carvalho, M.V.Cunha, M.D. Duarte, Wildlife Biology, 2019(1): 1-10(2019);
2. "Myxoma virus and rabbit haemorrhagic disease virus 2 coinfection in a European wild rabbit (Oryctolagus cuniculus algirus), Portugal", Carina Luísa Carvalho, F. A. Abade dos Santos, T. Fagulha, P. Carvalho, P. Mendonça, M. Monteiro, M. D. Duarte, Vet Rec Case Rep: [18 March 2020].
3. "First cases of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Portugal", Carina Luísa Carvalho, F.A. Abade dos Santos, M. Monteiro, P. Carvalho, P. Mendonça, M. D. Duarte, Vet Rec Case Rep: [12 April 2020].
4. "First description of a herpesvirus infection in genus Lepus", F. A. Abade dos Santos,M. Monteiro, A. Pinto, C. L. Carvalho, M. C. Peleteiro, P. Carvalho, P. Mendonça, T. Carvalho, M. D. Duarte, PLoS One. 2020; 15(5): e0233799.21 May 2020.
5. Detection of recombinant Hare Myxoma Virus in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus).* Abade Dos Santos F. A., Carvalho C. L., Pinto A., Rai R., Monteiro M., Carvalho P., Mendonça P., Peleteiro M. C., Parra F., Duarte M. D. Viruses. 2020 Oct 5;12(10):1127. doi: 10.3390/v12101127.PMID: 33028004 Free PMC article.
6. "Recombinant myxoma virus infection associated with high mortality in rabbit farming (*Oryctolagus cuniculus*)", Fábio A. Abade dos Santos, Carina L. Carvalho, Madalena Monteiro, Paulo Carvalho, Paula Mendonça, Maria da Conceição Peleteiro, Margarida D. Duarte. First published: 29 October 2020 https://doi.org/10.1111/tbed.13899
7. "A Potential Atypical Case of Rabbit Haemorrhagic Disease in a Dwarf Rabbit". Fábio A Abade Dos Santos, Carolina Magro, Carina L Carvalho, Pedro Ruivo, Margarida D. Duarte, Maria C. Peleteiro. *Animals*, 2020 Dec 28;11(1):E40. DOI: 10.3390/ani11010040
8. Species barrier cross of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (recombinant GI.4P-GI.2) from Lagomorpha to Eurasian badger (*submetido*);
9. Harmless or threatening? the role of diagnostic molecular methods in the characterisation of virus-host interactions. Fábio Abade dos Santos, Sara J. Portela, Carina L. Carvalho, Teresa Nogueira, Rita de Sousa, Margarida D. Duarte (submetido);
10. Serology unveils decades-long contact of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, with myxoma or antigenically-related virus, Fábio A. Abade dos Santos, Nuno Santos, Carina L.

Carvalho, Mónica Martinez, Christian Gortázar, Ignacio García-Bocanegra, Margarida Duarte, Paulo Célio Alves *(submetido)*.

Em dissertações académicas

No âmbito dos trabalhos científicos desenvolvidos e publicados, acresce ainda:

1. O Relatório de Projecto em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, intitulado "Evaluation of the vector potential of rodents and insects in rabbit haemorrhagic disease virus 2 and myxoma virus dissemination" (2020), da aluna Beatriz Valadas de Almeida (student number 52364), sob orientação de Fábio Santos e Margarida Duarte.
2. Os trabalhos decorrentes no âmbito da Tese de Doutoramento do Mestre Abade dos Santos, F.A., intitulada "Impact of leporid viral diseases in Iberian ecosystems: emergence, pathophysiology, prophylaxis and diagnosis." para obtenção de grau duplo pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e pela Universidade de Oviedo. Supervisores: Margarida D. Duarte (INIA I.P.), Francisco Parra (UO) e M. Conceição Peleteiro (FMV-UL).

Relatórios específicos

1. Relatório do Ensaio de Palatibilidade com a Ração +Coelho, formulada para Coelho-bravo, contendo diferentes aromatizantes (A- tomilho, B- fenacho, C- anis), 16 de abril de 2019 (**Anexo IV-A**);
2. Relatório sobre os dados parasitológicos para assessorar a seleção de ZC para o Ensaio de Desparasitação (**Anexo IV-C**);
3. Relatório do Ensaio de Desparasitação (**Anexo IV-B**);

Dossiers Técnicos

Foram preparados dois dossiers técnicos para realização do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica e Coelho-bravo.

1. Dossier técnico para pedido de autorização do ensaio foi apresentado à DGAV e aprovado em dezembro de 2019 (**Anexo V-A**);
2. Adenda ao dossier técnico, com reformulação do desenho experimental apresentado à DGAV a 5 de outubro de 2020 e aprovado em 28 dezembro de 2020;

Notícias em Websites

1. Artigo publicado pela Revista Internacional Veterinary Record Case Reports, Sessão WILDLIFE Rodents and Lagomorphs (10.1136/vetreccr-2019-001044), a 12 de abril 2020 sobre os primeiros casos de mixomatose registados em lebre Ibérica. Foi alvo de notícia no MSN e Veterinária atual.
2. Artigo publicado na PLOS ONE sobre Herpesvírus em lebre-ibérica foi alvo de notícia pelo website TERRAS DO HOMEM, MSN, Veterinária Atual e por um website Espanhol sobre Caça.
3. Último trabalho da equipa +coelho é notícia na revista *online* de vida selvagem, Wilder.

4. Divulgação do Projeto Figth-2 em artigo jornalístico na revista científica da *American Association for the Advancement of Science* (AAAS)

Desenvolvimento de Websites

1. Desenvolvido o *site* do projecto Fight-Two (https://projects.iniav.pt/Fight-two/pt/)
2. Site +Coelho em desenvolvimento. Atualmente disponível pelo site do INIAV. http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos

O OE.11 foi pois largamente superado.

15.Avaliação sanitária de cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética

As explorações de produção cinegética de coelho-bravo carecem de autorização da DRAP após parecer favorável do ICNF (Decreto-lei nº 214/2008, de 10 de novembro, na sua versão mais recente e respetivas portarias complementares), e permitem dispor de núcleos populacionais que garantem repovoamentos com animais geneticamente certificados e com condição sanitária conhecida.

De três destas **explorações de produção cinegética do coelho-bravo**, localizados na região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT), provieram, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, pouco mais de três dezenas de cadáveres de coelho-bravo (n=35) que foram também analisados para a presença dos vírus RHDV2 e de mixomatose.

As amostras provieram de três explorações de produção cinegética localizadas no distrito de Lisboa, nomeadamente nos concelhos de Alenquer (n=19), Sintra (n=13) e Torres-Vedras (n=3).

Os 35 cadáveres de coelho-bravo oriundos destas explorações de produção cinegética foram necropsiados e testados de acordo com o fluxo definido no Projeto +Coelho. Nesta amostragem, verificou um número relativamente semelhante de machos (n=19) e fêmeas (n=16). Duas fêmeas encontravam-se gestantes (12,5%, 2/16) e duas lactantes (12,5%, 2/16). Apenas num animal não foi feita classificação de género. A maior parte dos animais eram adultos (62,86%, n=22), e 13 (37,14%) eram juvenis. **[Figura 116]**

Os exemplares foram pesados durante o **exame anatomopatológico** tendo o peso variado entre 258g e 1926g. O peso dos animais juvenis variou entre 258 e 810 gramas. Para os juvenis sexados, a amplitude de pesos variou entre 258g e 810g no caso das fêmeas e entre 258g e 790g no caso dos machos. No que se refere aos animais adultos, o peso variou entre as 561g e 1926g. Nos adultos sexados, a amplitude de peso variou entre 738g e 1366g para os machos, e entre 732g e 1926g para as fêmeas.

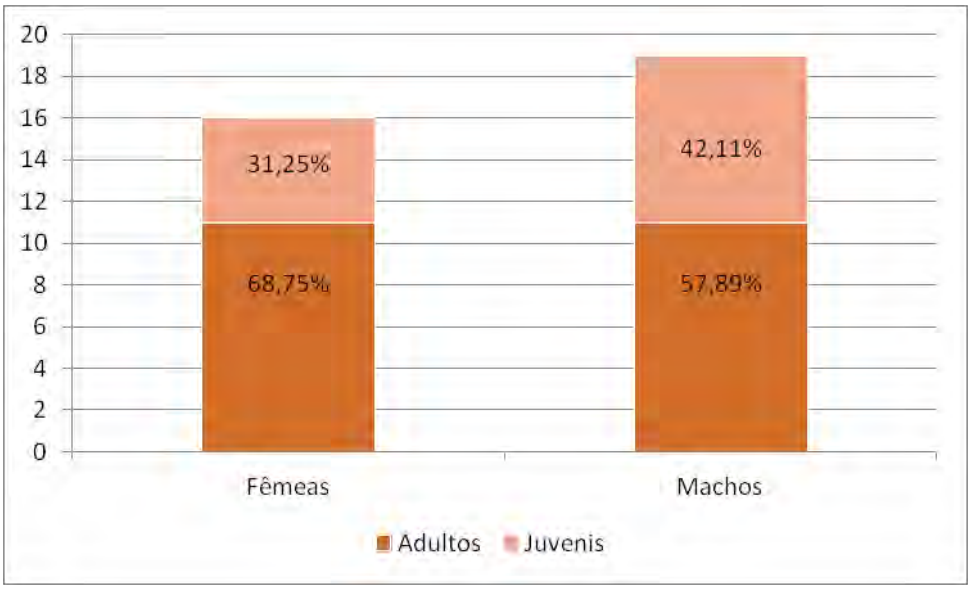


Figura 116. Género e classes etárias na amostragem de cadáveres de coelho-bravo coletados em explorações de produção cinegética.

Destes animais, 21 (60%) foram positivos a RHDV2 e 2 foram positivos a mixomatose (5,71%) (**Figura 117**).

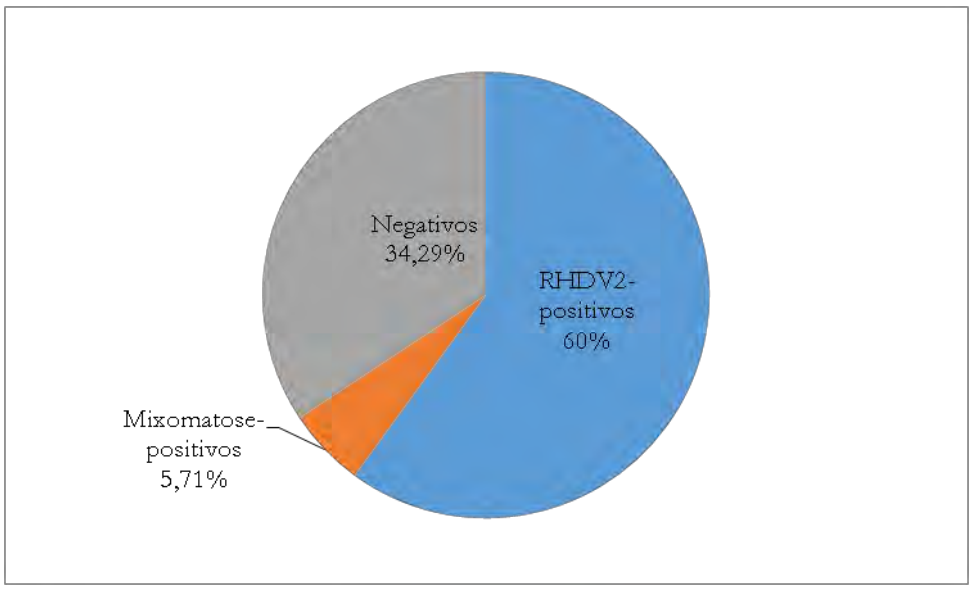


Figura 117. Percentagem de positividade a RHDV2 e a mixomatose na amostragem de coelhos-bravos oriundos das explorações de produção cinegética.

Mais de metade dos animais (57,14%, n=20) dos animais apresentava boa **condição corporal**, dos quais 15 (75%) foram positivos a RHDV2. Dos 13 animais com condição corporal média apenas 5 (38,46%) foram positivos a RHDV2. Não foi feito registo da condição corporal para um dos cadáveres, positivo a RHDV2. **[Tabela 78]**.

Tabela 78. Condição corporal dos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose

			Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Condição corporal	**Nº total de animais**	**(%)**	**N**	**(%)**	**N**	**(%)**
Boa	20	57,14	15	75	1	2,85
Média	13	38,46	5	38,46%	1	2,85
Fraca	1	2,85	0	0	0	0
Não registada	1	2,85	1	100	0	0

Dois animais (5,72%, 2/35) apresentavam emaciação, tendo sido negativos a RHDV2.

Apenas um exemplar de coelho-bravo, correspondendo a um juvenil macho, apresentava sinais de **autólise avançada** e apenas um animal (2,86%, 1/35) apresentava evidência de **traumatismo**, nomeadamente rutura da bexiga.

Registaram-se **alterações intestinais** em 10 dos 35 cadáveres (28,57%), sendo que as lesões do tipo congestivo-hemorrágicas no intestino delgado se relacionaram com a positividade a RHDV2. **[Tabela 79]**.

Tabela 79. Número de coelhos-bravos provenientes de explorações de produção cinegética em que se observaram alterações intestinais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Alterações intestinais	**Nº total de animais**	**Nº com alterações**	**(%) com alterações**	**Nº com alterações**	**(%) com alterações**
Coágulos sanguíneos na parede do intestino delgado	1	1	100	0	0
Congestão intensa/hemorragias na parede do duodeno	2	2	100	0	0
Estômago c/ reduzido conteúdo alimentar	5	0	0	0	0
Focos congestivo-hemorrágicos na mucosa gástrica	1	0	0	0	0
Focos congestivo-hemorrágicos na parede do intestino delgado	1	1	100	0	0
Total	10				

Apenas em dois animais (5,71%) dos animais foi registado **sangramento pelos orifícios naturais**, correspondendo a líquido sanguinolento no lume da traqueia (n=1) e à presença de líquido sanguinolento na região nasal (n=1), ambos positivos a RHDV2. (**Tabela 80**).

Tabela 80. Número de animais provenientes de explorações de produção cinegética em que se observou sangramento pelos orifícios naturais à necrópsia e relação deste sinal clínico com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Sangramento pelos orifícios naturais	**Nº total de animais**	**Nº com sangramento**	**(%) com sangramento**	**Nº com sangramento**	**(%) com sangramento**
Líquido sanguinolento no lume da traqueia	1	1	100	0	0
Presença de líquido sanguinolento na região nasal	1	1	100	0	0
Total	2				

Mais de metade dos cadáveres (65,71%, n=23) apresentava **lesões pulmonares**, tendo sido 15 (65,22%) positivos a RHDV2 e um animal positivo a mixomatose (4,35%, 1/23) (**Tabela 81**).

Tabela 81. Lesões pulmonares observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres provenientes de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Lesões pulmonares	**Nº total de animais**	**Nº com lesões**	**(%) com lesões**	**Nº com lesões**	**(%) com lesões**
Colapso	1	1	100	0	0
Congestão bilateral/ multifocal	9	6	66,67	0	0
Congestão com focos de densificação	1	1	100	0	0
Focos de congestão	12	7	58,33	1	8,3%
Total	23				

Ao nível **hepático**, a lesão mais frequentemente registada a de **descoloração**, observada em 48,57% (17/35) dos animais, dos quais 76,47 (13/17) foram positivos a RHDV2. Registaram-se ainda congestão em 14,29% (5/35) dos animais, e hepatomegalia e necrose hepática em 2,86% dos animais (1/35) (**Tabela 82**).

Tabela 82. Lesões hepáticas observadas ao exame anatomopatológico nos cadáveres provenientes de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Lesão hepática	**Nº total de animais**	**Nº com lesões**	**(%) com lesões**	**Nº com lesões**	**(%) com lesões**
Congestão	5	0	0	0	0
Descoloração	17	13	76,47	2	5,71
Hepatomegalia	1	1	100	0	0
Necrose	1	0	0	0	0

Foram observados **quadros hemorrágicos mais generalizados** (hemorragias internas) em 11,43% (4/35) dos animais, todos positivos a RHDV2 (**Tabela 83**).

Tabela 83. Número de animais oriundos de explorações de produção cinegética em que se observaram quadros hemorrágicos generalizados à necrópsia e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

		Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
	Nº total de animais	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**	**Nº Com lesões**	**(%) Com lesões**
Lesões hemorrágicas	4	4	100	0	0

Observou-se a presença de **edemas** em apenas dois animais (5,71%, 2/35), correspondendo a edemas da pálpebra e da pálpebra superior e conjuntiva, este último positivo a mixomatose. Ambos os animais foram negativos a RHDV2.

O**utras lesões** foram registadas em 8 animais (22,86%, 8/35) e incluíram congestão da mucosa da traqueia em três animais, todos positivos a RHDV2, desidratação num animal, hemorragias pontuais nos rins e no timo num animal positivo a RHDV2, hemorragias subcutâneas na parede abdominal e músculos lombares num animal, hidrotoráx em três animais positivos a RHDV2 e presença de exsudado acastanhado no prepúcio num animal. **[Tabela 84].**

Tabela 84. Outras lesões observadas nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e sua relação com a positividade a RHDV2 e a mixomatose.

			Animais positivos a RHDV2		Animais positivos a Mixomatose	
Outras lesões	**Nº total de animais**	**(%) com lesões**	**Nºcom lesões**	**(%) com lesões**	**Nºcom lesões**	**(%)com lesões**
Congestão da mucosa da traqueia	3	37,5	3	100	0	0
Desidratação	1	12,5	0	0	0	0
Hemorragias pontuais nos rins	1	12,5	1	100	0	0
Hemorragias pontuais no timo	1	12,5	1	100	0	0
Hemorragias subcutâneos na parede abdominal e músculos lombares	1	12,5	0	0	0	0
Hidrotórax	3	37,5	3	100	0	0
Presença de exsudado acastanhado no prepúcio	1		3	100	0	0

Nenhum dos animais com origem em explorações de produção cinegética apresentou **espessamentos nodulares**.

Apenas em 17,14% (n=6) dos 35 cadáveres submetidos a **exame bacteriológico** foram isoladas bactérias patogénicas com potencial zoonótico, nomeadamente *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia rubidaea* e *Staphylococcus xylosus*. A bactéria *S. rubidaea* foi a que apresentou maior percentagem de positividade amostral (8,57%, 3/35). Para as restantes bactérias isoladas foram registadas percentagens de positividade na amostra inferiores a 5%. Não foram registadas infeções bacterianas mistas nestes animais. O exemplar de coelho-bravo positivo a *E. faecalis* foi também positivo a RHDV2 (**Tabela 85**, **Figura 118**).

Tabela 85. Bactérias zoonóticas isoladas a partir das amostras recolhidas dos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetiva percentagem de positividade amostral.

Espécie isolada	**Potencial zoonótico**	**Patogenicidade**	**Nº de animais**	**Percentagem de positivos na amostra**
Enterococcus faecalis	✓	Oportunista	1 [a]	2,86
Escherichia coli	✓	Depende do serótipo	1	2,86
Serratia rubidaea	✓	Oportunista	3	8,57
Staphylococcus xylosus	✓	Oportunista	1	2,86
Negativo	✓		29	0
Total			35	

a) Animal positivo a RHDV2;

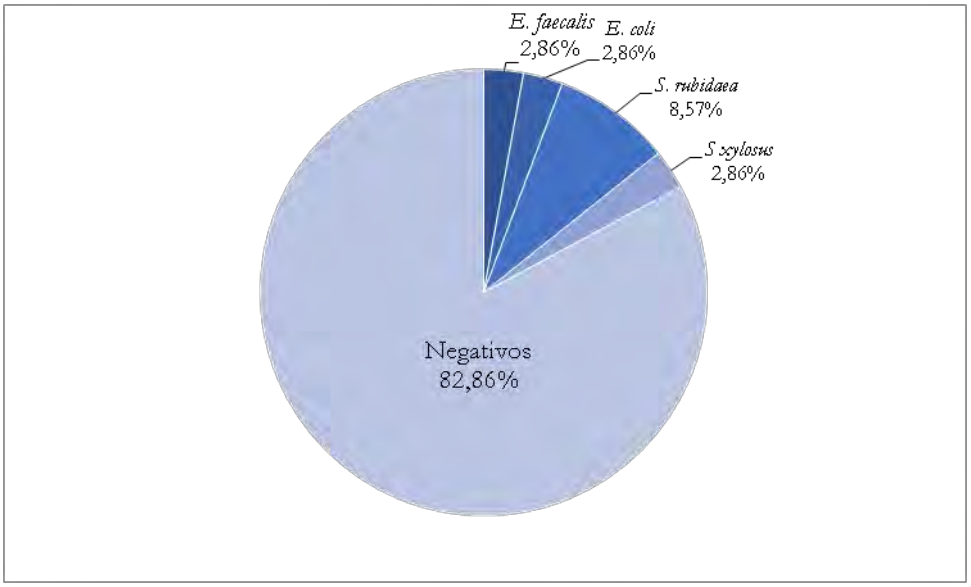


Figura 118. Bactérias zoonóticas isoladas em órgãos de coelhos-bravos provenientes de explorações de produção cinegética e respetiva percentagem de positividade na amostra. A percentagem de negativos também está indicada.

Relativamente aos **parasitas internos**, no parasitismo por **céstodes** detetaram-se *Cittotenia spp.*, (31,43%, n=11) e outras espécies da Família Taeniidae (2,86%, n=1). Apenas um animal apresentava elevadas cargas parasitárias por cestodes da família Taeniidae (**Tabela 86**).

Tabela 86. Céstodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral.

			Animais com grandes infeções	
Céstodes	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
Cittotenia spp.	11	31,43	0	0
Família Taeniidae	1	2,86	1	100

Quanto ao parasitismo por **nemátodes**, nos cadáveres de coelho-bravo com origem em explorações de produção cinegética detetaram-se *Graphidium strigosum* (20%, n=7), *Passalurus ambiguus* (34,29%, n=12), *Trichostrongylus leporis* (2,86%, n=1), *Trichurus leporis* (2,86%%, n=1), e *Dermatoxys velígera* (17,14%, n=6), *Nematodirus spp.* (5,71%, n=2) e ovos de estrongilídeos gastro-intestinais (8,57%, n=3). Apenas para *P. ambiguus* foram registados animais com elevadas cargas parasitárias (n=3) (**Tabela 87**).

Tabela 87. Nemátodes identificados nos cadáveres de coelho-bravo oriundos de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade amostral.

			Animais com grandes infeções	
Nemátodes	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
Graphidium strigosum	7	20	0	0
Passalurus ambiguus	12	34,29	3	25
Trichostrongylus leporis	1	2,86	0	0
Trichostrongylus spp	1	2,86	0	0
Trichurus leporis	1	2,86	0	0
Dermatoxys veligera	6	17,14	0	0
Nematodirus spp.	2	5,71	0	0
Estrongilideos GI (ovos)	3	8,57	1	33,33

No que toca aos protozoários, foram detetadas infestações simples ou múltiplas por **coccídeas**, nomeadamente *Eimeria coecicola* (n=1), *E. elongata* (n=1), *E. exigua* (n=1), *E. perforans* (n=4), *E. magna* (n=1), *E. media* (n=7), E. piriformis (n=4) e Eimeria spp. (n=1). Não se observaram grandes infestações por coccídeas em nenhum dos exemplares. Nenhuma das espécies de coccídeas identificadas apresenta potencial zoonótico (**Tabela 88**).

Tabela 88. Coccídeas identificadas nos cadáveres de coelho-bravo provenientes de explorações de produção cinegética e respetivos valores de percentagem de positividade

			Animais com grandes infeções	
Coccídeas	**Nº de animais parasitados**	**Percentagem de positivos na amostra**	**Nº**	**(%)**
E. coecícola	1[a]	2,86	0	0
E-. elongata	1	2,86	0	0
E. exigua	1	2,86	0	0
E. perforans	4[b]	11,43	0	0
E. magna	1	2,86	0	0
E. media	7[c]	20	0	0
E. piriformis	4[d]	11,43	0	0
Eimeria spp.	1	2,86	0	0

a-50% (1/2) apresentavam oócistos; b-25% (1/4) apresentavam oócistos; c-57,14% (4/7) apresentavam oócistos;
d- 75% (3/4)) apresentavam oócistos

O apoio e aconselhamento técnico-cientifico do GT +Coelho às Explorações de Produção Cinegética de coelho-bravo, permitiu recolher informação sobre a dinâmica dos agentes patogênicos mais relevantes em contexto de vida em cercado. Destaca-se a elevada positividade de RHDV2 nesta amostragem (60% dos animais mortos).

16. Conclusões

Foram selecionadas as principais conclusões do Relatório para inclusão neste sumário final.

1. (OE.1) A rede de recolha de material biológico implementada no decurso do projeto +Coelho 1 em todo o território continental envolvendo vários operadores do INIAV, ICNF e OSC, manteve-se efetivamente operacional na recolha e preservação do material até ao seu envio para os laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal no INIAV, durante o Projeto +Coelho 2;

2. (OE.1) O sucesso da avaliação sanitária efetuada durante o Projeto +Coelho2, dependeu, uma vez mais, da boa cooperação e articulação dos parceiros, em particular entre os institutos de investigação e as organizações do setor da caça que diariamente estão no terreno;

3. (OE.1) O número extremamente reduzido de amostras prejudicadas para análise laboratorial (n<10, representando 1%), demonstrou a eficácia das ações de formação aos técnicos das OSC que asseguraram esta etapa do processo.

4. (OE.1) O intervalo temporal do Projecto +Coelho2 foi significativamente maior do que o Projeto +Coelho1. Para além de incluir duas épocas venatórias (18/19 e 19/20), o período durante o qual se rececionaram amostras recolhidas no campo foi significativamente maior, compreendendo 13 meses no Projecto +Coelho1 (1 de agosto de 2017 a 31 de agosto de 2018) e 22 meses no Projecto +Coelho2 (1 de setembro de 2018 a 30 de junho de 2020).

5. (OE.1) Na amostragem de cadáveres de coelho-bravo recebidos durante o 2º ano de Projeto, foi verificada uma proporção de 47,1% (n=80) fêmeas e 50,9,11% (n=83) machos, correspondendo a uma razão de (0,93 fêmea:1,0 macho), mais equilibrada do que a obtida na amostragem do Projecto +Coelho 1 (1,2 fêmea:1,0 macho).

6. (OE.1) Também na amostragem de lebres caçadas e de lebres encontradas mortas do Projeto +Coelho2, o número de femeas foi ligeiramente menor do que o de machos, com rácios respetivos de 1fémea:1,18 macho e de 1 femea:1,09 macho.

7. OE.1 A avaliação sanitária das populações naturais de coelho-bravo e lebre-ibérica no período a que se refere este relatório, envolveu a testagem de 971 animais. Os 650 leporídeos caçados, oriundos de 51 zonas de caça (24 zonas de caça na época venatória (EV) 18/19 e 27 zonas de caça na EV 19/20), sendo que as lebres foram amostradas em quatro distritos tanto na EV 18/19 como na EV 19/20 e os coelhos-bravos foram amostrados em oito e sete distritos respetivamente nas EV 18/19 e 19/20. Os 169 coelhos-bravos e as 95 lebres-ibéricas encontrados mortos no campo, provieram de zonas de caça e outros locais, localizados em 14 distritos no caso dos coelhos-bravos e em oito distritos no caso das lebres.

8. (OE.1) No Projecto +Coelho1, que incluiu apenas a EV 17/18, foram analisados 891 leporídeos. No Projecto +Coelho2, que englobou duas EVs (19/20 e 20/21), foram analisados 971 leporídeos, indicando por isso uma redução significativa da amostragem.

9. (OE.1) Relativamente à origem geográfica da amostragem, verificou-se que, nas EV 18/19 e EV19/20 houve proporcionalmente mais amostras oriundas do Norte do país e do Algarve do que na EV 17/18.

10. (OE.1) A amostragem média de cadáveres de coelho-bravo recolhidos mensalmente no Projecto +Coelho1 foi de 8 (104/13), aproximadamente o dobro da amostragem média mensal no Projecto +Coelho2 (4,32; (169/22).

11. (OE.1) A amostragem média de cadáveres de lebre-ibérica recolhidas mensalmente no Projecto +Coelho1 foi de 0,08 (1/13) e no Projecto +Coelho2 foi de 4,32 (95/22), representando um aumento de cerca de 54x, e evidenciando claramente a elevada mortalidade que se verificou nesta espécie.

12. (OE.1) Os 8766 testes virológicos realizados permitiram confirmar a distribuição geográfica alargada do RHDV2 e do vírus da mixomatose a todo o território continental, em coelho-bravo, e da mixomatose em lebre-ibérica nas localizações geográficas onde a espécie ocorre, i.e. preferencialmente no sul.

13. (OE.1) Os *heat maps* relativos às percentagens de positividade RHDV2 na amostra de coelhos-bravos caçados (esquerda) e cadáveres (direita), correspondentes ao período a que se refere este relatório, são apresentados na **Figura 119**, evidenciando claramente que a esmagadora maioria dos animais positivos foram encontrados mortos no campo;

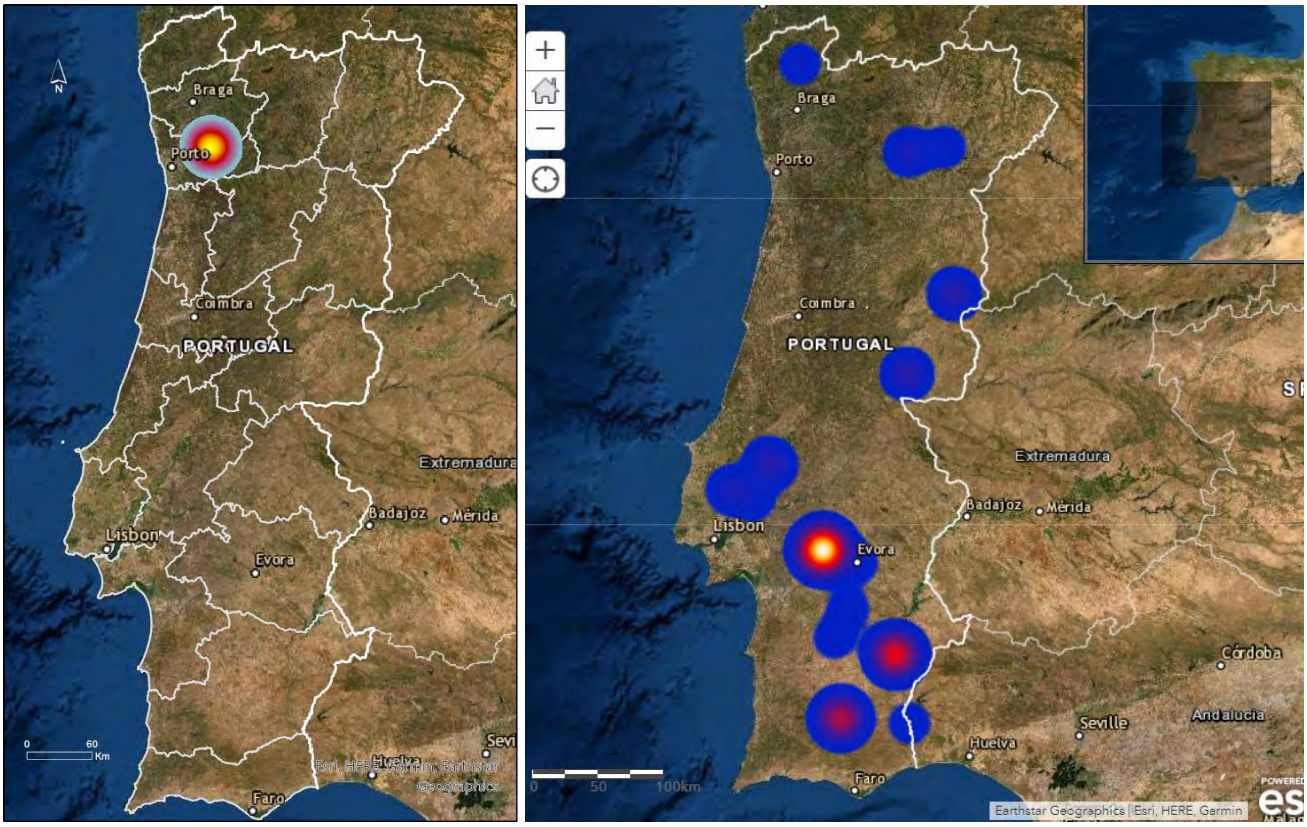


Figura 119. *Heat maps* relativos à deteção de RHDV2 em coelhos-bravos caçados nas EV 18/19 e 19/20 (esquerda) e cadáveres entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 (direita, neste mapa estão incluídos 10 animais encontrados em 2016).

14. (OE.1) No período a que se refere este relatório, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 (e que incluiu as EVs 18/19 e 19/20), foram determinadas percentagens de positividade amostral para a doença hemorrágica viral (RHDV2) a nível nacional de 0,17% (1/601) e 48,52% (82/169), respetivamente, na amostra de coelhos-bravos caçados e cadáveres. Estes valores, relativamente aos verificados no Projecto +Coelho1, respetivamente 0,84% (6/707) e 64,4% (67/104) indicam um incremento dos valores de positividade, acrescido pela assimetria das janelas de amostragem nos dois Projectos.

15. (OE.1) As percentagens positividade RHDV2 na amostra de coelhos-bravos encontrados mortos no decurso do projecto +Coelho2 foram mais elevados para os distritos de Vila Real, Guarda, Bragança, Évora e Lisboa, enquanto que no Projeto +Coelho1 os distritos mais afetados foram os de Setúbal, Évora e Lisboa. No entanto, estes distritos não foram os mais amostrados, exigindo por isso reservas na interpretação destes dados.

16. (OE.1) À semelhança do verificado no Projecto +Coelho1, a positividade a RHDV2 foi essencialmente detetada em cadáveres, o que sugere uma elevada taxa de mortalidade associada a esta infeção;

17. (OE.1) Os *heat maps* relativos às percentagens de positividade a mixomatose na amostra de coelhos-bravos caçados e cadáveres correspondentes ao período a que se refere este

relatório, são apresentados, respetivamente nas **Figuras 120 e 121,** evidenciando uma diferença menos notória entre os dados relativos a coelho-bravo caçado e a coelho-bravo encontrado morto, do que o verificado para RHDV2;

18. (OE.1) Foram determinadas as percentagens de positividade amostral para a mixomatose a nível nacional de 2,5% (15/601) e 27,81% (47/169), respetivamente, em coelhos-bravos caçados e em cadáveres. Estes valores alteraram-se significativamente relativamente aos valores homólogos obtidos no Projecto +Coelho1, onde se verificaram positividades amostrais de 4,96% (35/706) e 7,69% (8/104), respetivamente em coelhos caçados e em cadáveres;

19. (OE.1) Ao contrário do que que se verificou no 1º ano do projeto, a maioria dos coelhos-bravos positivos a mixomatose, foram animais encontrados mortos no campo, sugerindo uma maior virulência das estirpes circulantes desde setembro de 2018;

20. (OE.1) A percentagem de positividade a mixomatose na amostra de coelhos-bravos encontrados mortos foi mais elevada para nos distritos de Lisboa, Viana do Castelo, Castelo Branco e Santarém. No Projeto +Coelho1, os distritos mais afetados foram os distritos do Algarve e de Coimbra. No entanto, face à reduzida amostragem de alguns distritos, estes dados podem estar enviesados;

21. (OE.1) No que se refere aos animais positivos a RHDV2, a razão entre o número de coelhos-bravos encontrados mortos e o número de coelhos-bravos caçados, foi de 1:0,012 (82:1), enquanto que esta relação para a mixomatose foi de 1:0,32 (47:15), sugerindo uma taxa de mortalidade mais elevada por RHDV2 do que por MYXV.

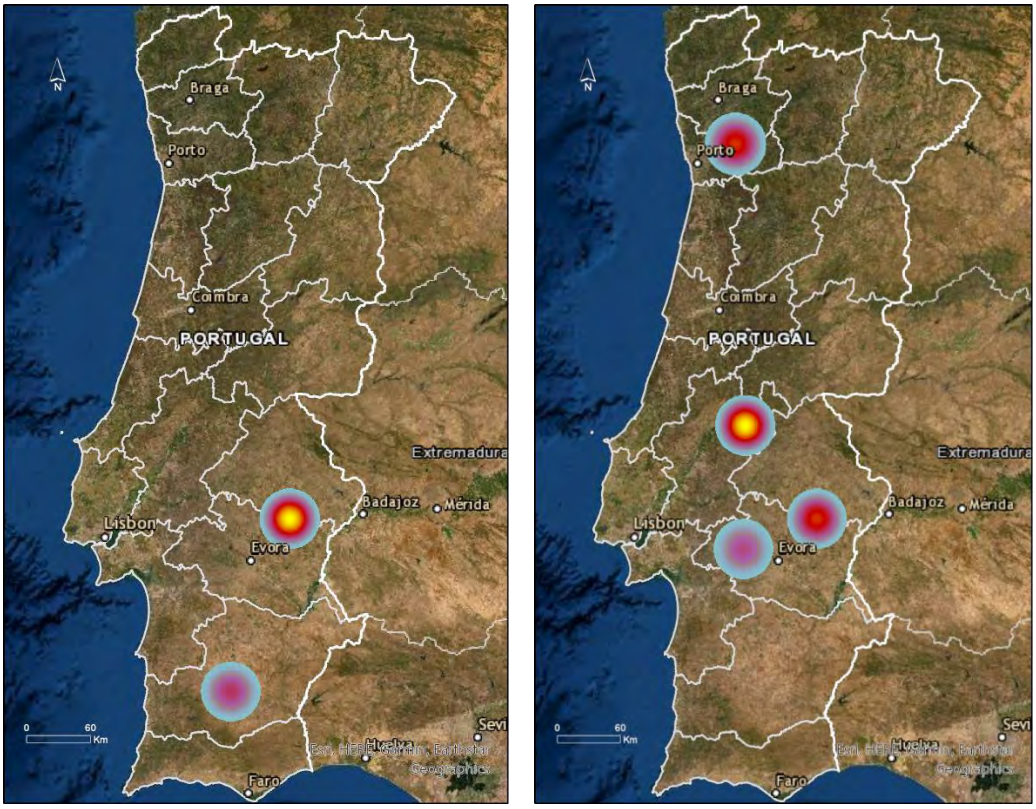


Figura 120. *Heat maps* relativos à deteção do vírus da mixomatose coelhos-bravos caçados nas EV 18/19 (esquerda) e 19/20 (direita).

22. (OE.1) À semelhança do que se verificou no 1º ano do projeto, nenhum dos 971 leporídeos testados no 2º ano do Projeto foi positivo a RHDV, confirmando-se que as estirpes que circularam no continente, antes da emergência do RHDV2 em 2012 em Portugal (G1 e G6), foram integralmente substituídas;

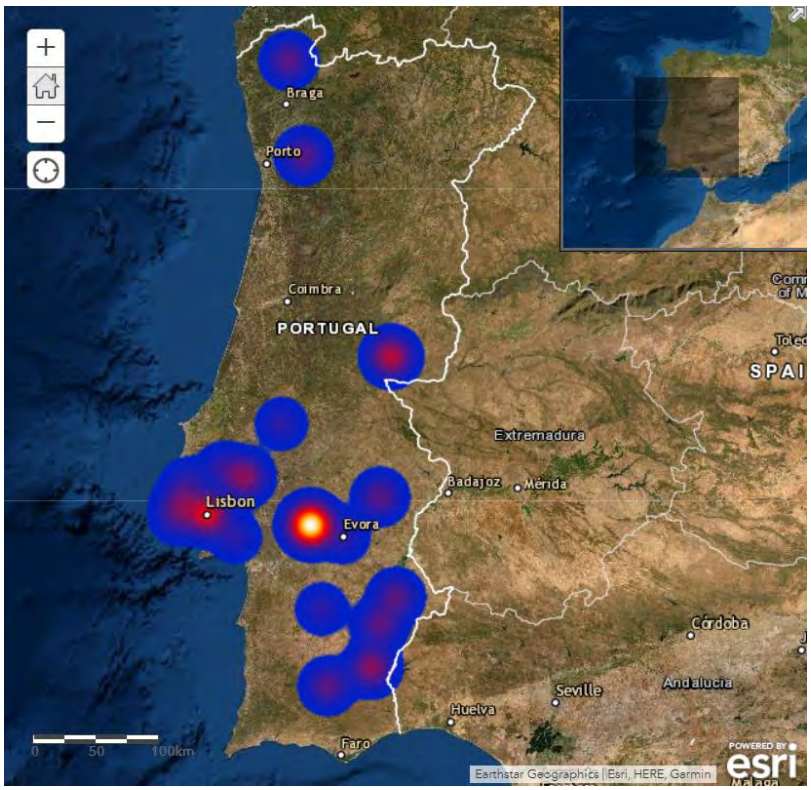


Figura 121. *Heat maps* relativos à deteção do vírus da mixomatose coelhos-bravos encontrados mortos entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020. Neste mapa estão incluídos 10 animais encontrados em 2016.

23. (OE.1) Foi detetada, e descrita pela primeira vez, uma coinfeção em coelho-bravo pelo vírus da mixomatose e da doença hemorrágica dos coelhos. Este achado foi objeto de publicação.

24. (OE.1) No período a que se refere este relatório, entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020, foram identificados os primeiros casos de mixomatose em lebre-ibérica em Portugal. Os primeiros dois casos foram reportados à OIE, tendo sido detetados no final de outubro e início de novembro de 2018, cerca de 3-4 meses depois dos primeiros surtos terem ocorrido em Espanha. Foi também publicado um artigo sobre a deteção do vírus da mixomatose no nosso país.

25. (OE.1) A caracterização molecular dos vírus detetados em lebre-ibérica revelaram a presença da inserção de 2,8kb no gene M009, previamente identificada nos vírus circulantes em Espanha, permitindo concluir que o vírus da mixomatose recombinante natural que passou a circular em território nacional é o mesmo detetado em Espanha. No período a que se refere este relatório, foram determinadas percentagens de positividade amostral para a mixomatose em lebre-ibérica a nível nacional de 2,04% (1/49) e 84,21% (80/95), respetivamente, na amostra de animais caçados e cadáveres;

26. (OE.1) A maioria das lebres encontradas mortas proveio dos distritos de Évora (n=20), Beja (n=17), Setúbal (n=15), Faro (n=11), e Portalegre (n=6), tendo foi detetado o vírus da mixomatose respetivamente em de 86,96%, 73,91%, 100%, 91,67% e 75% da amostragem. Todos os animais provenientes dos distritos de Castelo-Branco (n=7) e Guarda (n=1) foram positivos a Mixomatose.

27. (OE.1) Tal como nos coelhos-bravos, a positividade a mixomatose em lebre-ibérica foi essencialmente detetada em cadáveres, neste caso bem mais marcada, revelando uma elevada taxa de mortalidade associada à infeção sugestiva de virulência elevada do vírus recombinante da mixomatose em lebre.

28. (OE.1) Apenas em 1 dos 49 espécimes de lebre-ibérica caçados durante o Projecto +Coelho2 foi positivo, representando uma positividade amostral de 2,04%. Este animal, oriundo de Beja, foi caçado na EV 19/20.

29. (OE.1) Os *heat maps* relativos às percentagens de positividade a mixomatose na amostra de lebres-ibéricas caçadas e cadáveres, correspondentes ao período a que se refere este relatório, são apresentados nas **Figuras 122 e 123**, respetivamente, evidenciando a grande dispersão pelo território nacional de animais positivos.



Figura 122. *Heat maps* relativos à deteção do vírus da mixomatose em lebres caçados nas EV 18/19 (esquerda); Não houve positividade a mixomatose em lebres caçadas na EV 19/20.

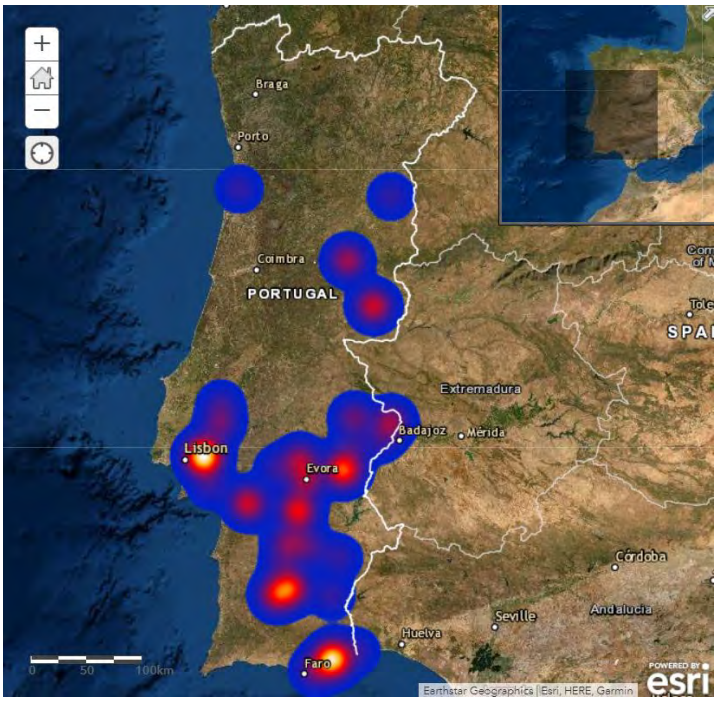


Figura 123. *Heat maps* relativos à deteção do vírus da mixomatose em lebres encontradas mortas entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

30. (OE.1) As **Figura 124** e **125** permitem comparar o número de coelhos-bravos caçados e coelhos-bravos encontrados mortos amostrados durante os dois Projectos, o número de animais positivos a MYXV e a respectiva percentagem de positividade.

31. (OE.1) As **Figura 126** e **127** permitem comparar o número de coelhos-bravos caçados e coelhos-bravos encontrados mortos amostrados durante os dois Projectos, o número de animais positivos a RHDV e a respectiva percentagem de positividade.

32. (OE.1) A **Figura 128** permite comparar o número de lebres-ibéricas caçadas e encontradas mortas que foram amostradas durante os dois Projectos, o número de animais positivos a MYXV e a respectiva percentagem de positividade.

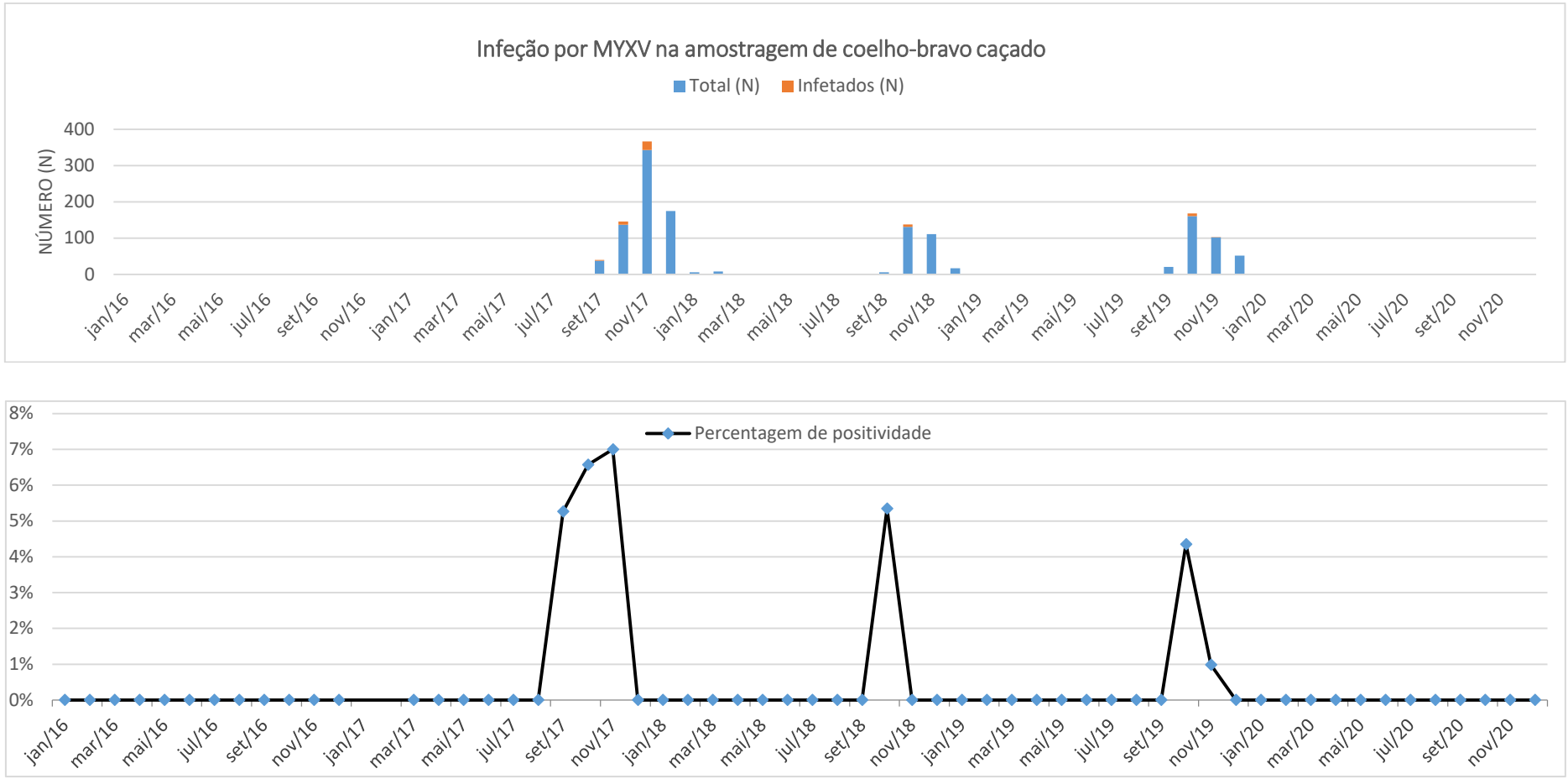


Figura 124. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos caçados e resultados da pesquisa de MYXV

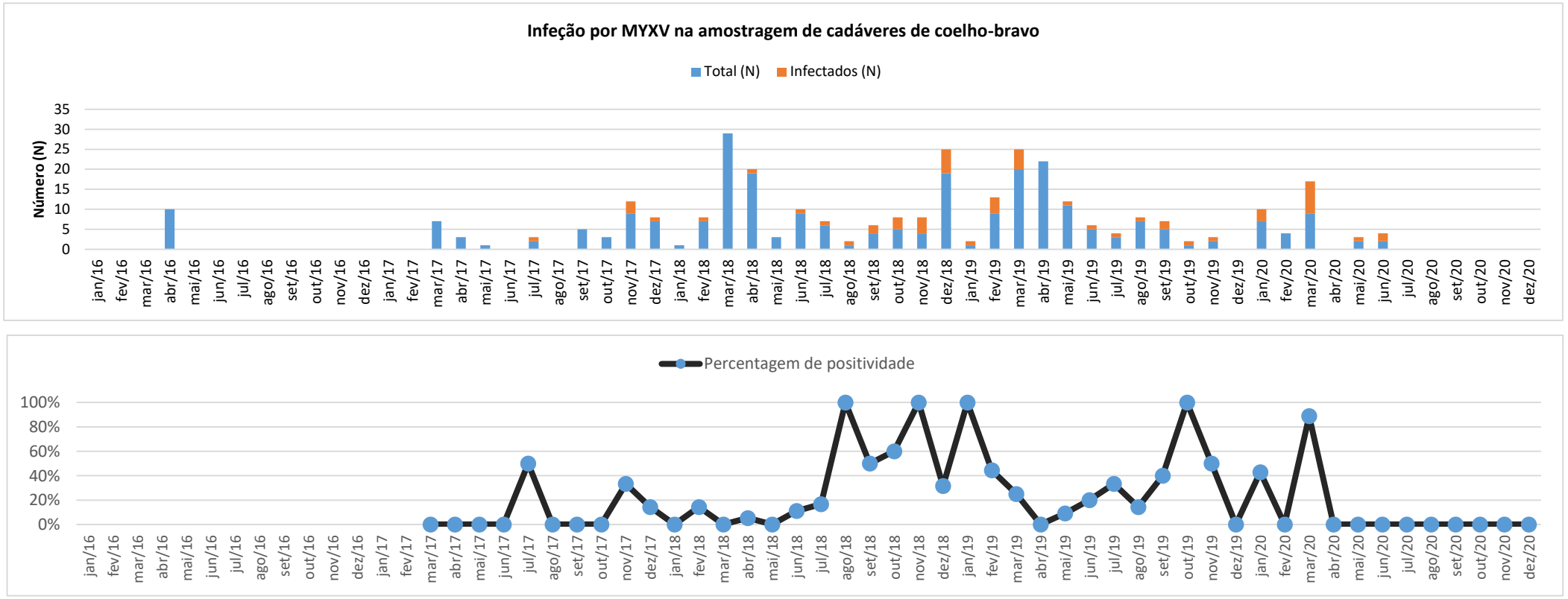


Figura 125. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos encontrados mortos e resultados da pesquisa de MYXV.

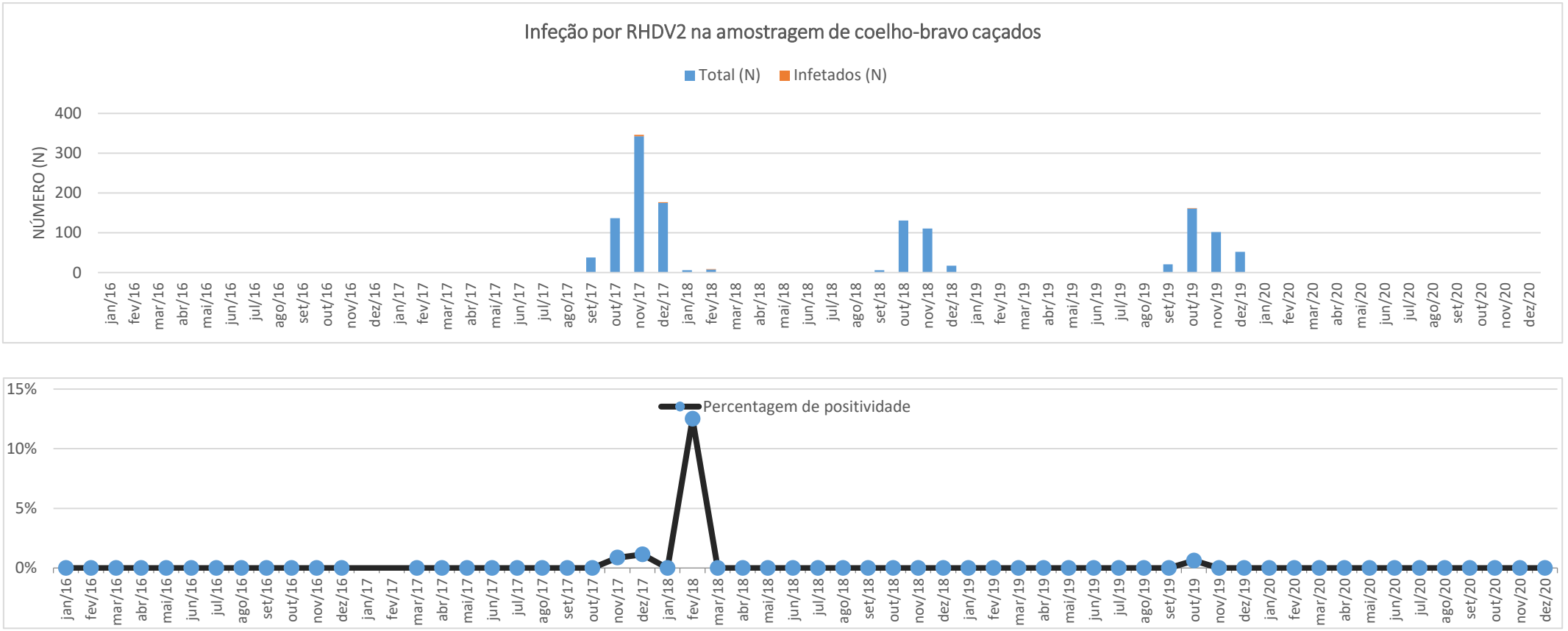


Figura 126. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos caçados e resultados da pesquisa de RHDV2.

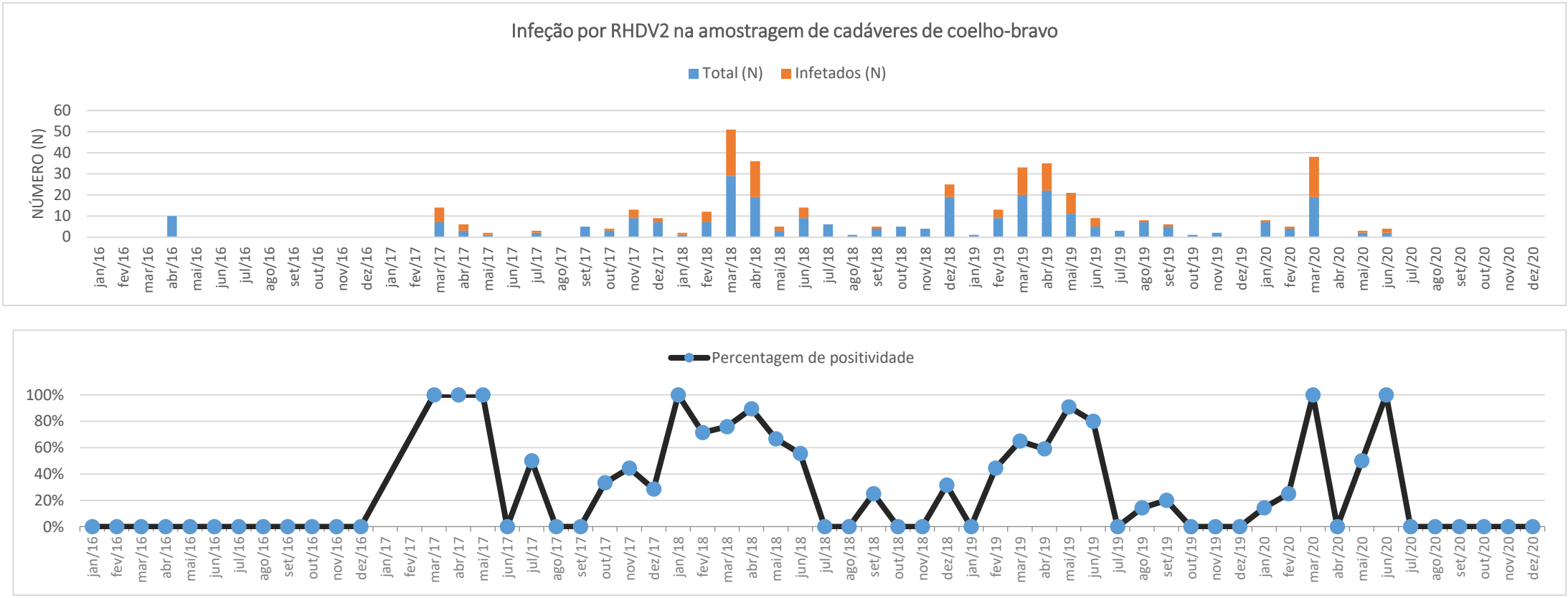


Figura 127. Distribuição temporal da amostragem de coelhos-bravos encontrados mortos e resultados da pesquisa de RHDV2

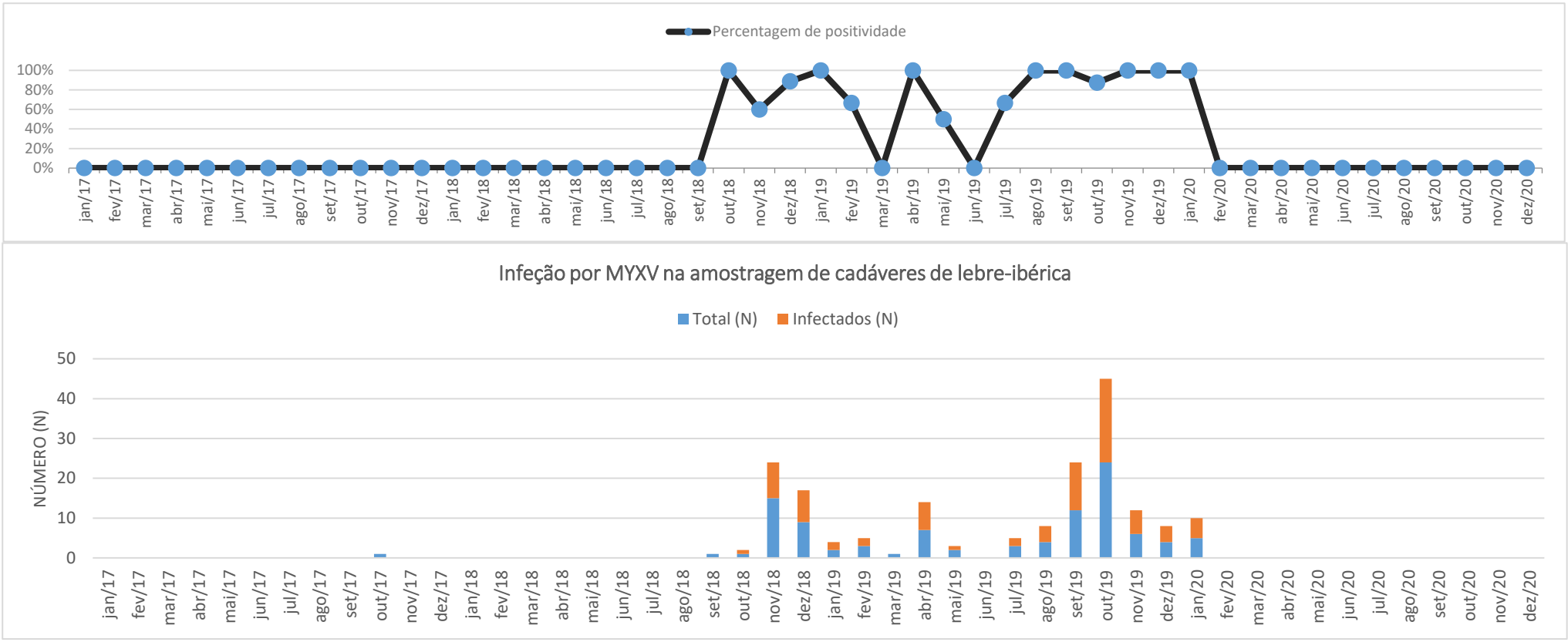


Figura 128. Distribuição temporal da amostragem de lebres-ibéricas encontradas mortas e resultados da pesquisa de MYXV.

33. (OE.1) No decurso do Projecto +Coelho2, foi detetado um novo Herpesvírus em lebres. Este vírus, nunca antes descrito, foi caracterizado e designado gamaherpesvirus-5 dos leporídeos (LeHV-5). Esta descoberta foi objeto de publicação científica.

34. (OE.1) A maior parte dos cadáveres de coelho-bravo submetidos a exame anatomopatológico apresentava condição corporal média (37,28%) ou boa (35,50%). Aproximadamente 36% e 40% dos coelhos-bravos positivos a RHDV2 apresentavam respetivamente uma condição corporal boa e média, sugerindo uma evolução rápida da doença, de desfecho fatal. A maioria dos animais positivos a mixomatose apresentava uma condição corporal média (46,81%) ou fraca (34,04%).

35. (OE.1) Os resultados evidenciaram uma associação entre lesões congestivo-hemorrágicas e de descoloração hepática evidenciadas em coelho-bravo, uma vez que estas lesões foram reconhecidas na maior parte dos animais positivos a RHDV2. Embora reportados na grande maioria dos animais positivos, estes dados reforçam a necessidade de se proceder ao diagnóstico laboratorial já que nem sempre estão presentes na infeção por RHDV2;

36. (OE.1) Foi observada a presença de edema e de nódulos na derme na grande maioria dos coelhos-bravos e lebres-ibéricas positivos a mixomatose;

37. (OE.1) Os testes bacteriológicos permitiram a identificação de bactérias patogénicas com potencial zoonótico em 58 dos 159 cadáveres de coelho-bravo e em 47 dos 92 cadáveres de lebre-ibérica sujeitos a exame bacteriológico. Estes agentes podem constituir um risco para a Saúde Pública, quer por contacto direto, quer por ingestão de carne de caça;

38. (OE.1) Foram identificadas 24 espécies diferentes de bactérias em coelhos-bravos e 19 espécies diferentes em lebre-ibérica. Em ambas as espécies, a bactéria patogénica mais prevalente foi *E. coli*, detectada respetivamente em 36,2% e 38,3% da amostragem.

39. (OE.1) A maioria das bactérias isoladas foram detetadas num número muito reduzido de animais;

40. (OE.1) Detetaram-se infeções bacterianas mistas em quatro coelhos-bravos, causadas por *E. coli* associada a *Proyeus vulgaris* (n=1) e a *Pasteurela multocida* (n=1), *Enterobacter amnigenus* em simultâneo com *Staphylococcus sciuri* (n=1) e *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus* em simultâneo num só animal.

41. (OE.1) Cinco lebres-ibéricas apresentaram infeções mistas, nomeadamente *E. coli* associada a *Salmonella spp.* (n=1), a *Staphylococcus aureus* (n=1), e a *Serratia marcescens* (n=1), e *Staphylococcus xylosus* associado a *Enterobacter amnigenus (n=1) e a Serrratia odorifera* (n=1).

42. (OE.1) 43,10% (n=25) dos coelhos-bravos positivos no exame bacteriológico (n=58) foram simultaneamente positivos no exame bacteriológico e num ou em ambos os exames virológicos.

43. (OE.1) 85,11% (n=40) dos cadáveres de lebre-ibérica positivos no exame bacteriológico (n=47) a partir testaram positivamente ao vírus da mixomatose, indicando claramente o comprometimento do sistema imunitário por este vírus.

44. (OE.1) 84,0% dos coelhos-bravos e 63,16% das lebres-ibéricas testados evidenciaram parasitismo. Os nematodes foram os parasitas internos mais frequentemente identificados nos coelhos-bravos e os protozoários na lebres-ibéricas.

45. (OE.1) Em conclusão, os dados parasitológicos revelaram que a população de coelhos bravos se encontrava mais parasitada que a população de lebres, existindo uma diferença significativa na proporção de animais parasitados, quando se considera o conjunto de todos os parasitas (protozoários, cestodes e nemátodes). Quando consideramos individualmente os grupos de parasitas, verificou-se que apenas na infeção por protozoários não ocorreram diferenças significativas entre as duas populações. Diferenças significativas foram observadas no parasitismo por cestodes e por nemátodes sendo que as populações de coelhos estavam mais parasitadas que as populações de lebres. A presença de infeções mistas por coccídeas, céstodes e nemátodos foi mais relevante no caso dos coelhos-bravos.

46. (OE.1) Tal como no Projecto Coelho1, a avaliação serológica de anticorpos contra o vírus da doença hemorrágica viral, efetuada em leporídeos caçados, evidenciou o contacto das populações com o RHDV2, e permitiu inferir que o nível de imunização das populações de coelho-bravo e lebre, se representados na amostragem, não impede a circulação de vírus no campo;

47. (OE.1) Assim, conclui-se que para ambas as espécies de lagomorfos presentes em Portugal (coelho-bravo e lebre-ibérica), nenhuma das populações analisadas está protegida contra o vírus da doença hemorrágica viral.

48. (OE.2) As avaliações demográficas foram conduzidas em nove zonas de caça durante o período de 2018 a 2019, e em sete zonas de caça em 2020 selecionadas pelas três Organizações do Setor da Caça de primeiro nível.

49. (OE.2) Para a amostragem das populações naturais em 2018 e 2019 foram selecionados dois métodos (Contagem de Excrementos em Pontos Fixos e Contagem Direta de Animais por Distancias) a aplicar durante todos os meses do ano. No entanto, devido ao considerável número de meses não amostrados, procedeu-se à reformulação da amostragem, onde a partir de 2020 as populações naturais foram amostradas com recurso apenas ao método de Contagem de Animais por Distâncias na época de mínimo populacional (fevereiro) e na época de máximo populacional (junho).

50. (OE.2) Com a modificação da metodologia aplicada é possível obter uma amostragem dentro do mesmo período para todas as áreas de estudo. Estava também previsto aumentar o número de áreas (zonas de caça) amostradas, contudo, dada a situação de pandemia provocada pelo SARS-COV-2, e as limitações impostas na circulação de pessoas e na

realização de trabalho de campo, apenas foi possível implementar a nova metodologia em 7 áreas de estudo, com a inclusão de uma nova área no Alentejo.

51. (OE.2) Os resultados das avaliações demográficas mostram que existe uma elevada variabilidade na dinâmica das populações estudadas, verificando-se zonas com valores de densidade para a população local muito baixos, como o verificado para a área de estudo de Benavente (BNV, média de 1,3 coelho-bravo/ha) e Montemor-o-novo (MNT, média de 1,1 coelho-bravo/ha), comparativamente com as áreas de estudo de Serpa (SRP, média de 70,3 coelho-bravo/ha), Estremoz (EST, média de 36,2 coelho-bravo/ha) e Ferreira do Alentejo (FAL, média entre 21,2 e 62,6 coelho-bravo/ha), onde os valores são mais elevados.

52. (OE.2) Existe uma aparente relação positiva entre a proporção de indivíduos com anticorpos contra o RHDV2 e as populações com maiores densidades (ainda que locais), sendo que quanto maior a proporção de coelhos com anticorpos, maior é a população. Contudo, ao longo das duas fases do projeto +Coelho não se observou um aumento significativo de anticorpos contra a RHDV2 suficiente para se alcançar a imunidade das populações naturais nas áreas em estudo. Desta forma, é essencial continuar a monitorização da densidade e do nível de anticorpos contra o RHDV2, por forma a perceber as tendências populacionais e se estimar o risco de ocorrência de novos surtos da Doença Hemorrágica Viral.

53. (OE.2) É fundamental a monitorização continuada no tempo, e igual em todas as áreas de estudo, para que se possam compreender os mecanismos que afetam a dinâmica das populações de coelho-bravo, bem como avaliar o da incidência do vírus e outras epizootias ao longo do tempo e nas diferentes regiões, por forma a suportar as medidas de gestão e conservação das populações naturais desta espécie.

54. (OE.3) O Grupo de Trabalho continua a desenvolver uma Plataforma no INIAV para divulgação de informação de forma gráfica (*dashbord*) em tempo real;

55. (OE.3) Durante o projecto +Coelho2, foi desenvolvido o Inquérito Epidemiológico e processamento gráfico do mesmo. A operacionalidade do seu preenchimento com possibilidade de interrupção sem perda de dados, importante dada a extensão do inquérito, encontra-se em fase de teste em diferentes plataformas (telemóveis, PC, tablets).

56. (OE.4) No decurso do projecto +Coelho 2, o Grupo de Trabalho contribuiu para o aumento da consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos através de 15 ações de sensibilização em feiras de caça, 2 palestras nacionais, uma palestra internacional, 2 *workshops* no terreno, e produção de 3 artigos em revistas naconais.

57. (OE.5) Foi concluído o Ensaio de Palatibilidade (OE.5) que permitiu identificar, de entre os aromatizantes testados, o tomilho como o mais aperciado. Esta informação é relevante para a fase de vacinação em condições naturais no âmbito do OE.7;

58. (OE.5) O Ensaio de Desparasitação também realizado no âmbito da medida OE.5 foi largamente condicionado pela emergência da pandemia COVID-19, reduzindo de seis para três as zonas de caça que conseguiram colaborar nesta avaliação;

59. (OE.5) Não obstante a heterogeneidade das cargas parasitárias detectadas ao longo do tempo, os resultados deste diminuto estudo piloto, corroborados pelos dados das necrópsias, sugerem que a coccidiose ocorre de forma generalizada nas populações de coelhos-bravos nas várias zonas de caça do nosso país, justificando assim a desparasitação periódica para protozoários;

60. (OE.5) Nas três zonas de caça aderentes a este Ensaio, verificou-se que, pelo contrário, a ocorrência de outros parasitas, nomeadamente de nemátodos e cestodes parece ser muito irregular, e de acordo com o que é possível extrapolar dos locais amostrados, não justificam a desparasitação sistemática das populações silvestres para estes grupos de parasitas;

61. (OE.6) A implementação do Ensaio de Vacinação de lebres com vacinas comerciais para mixomatose, desenvolvidas para coelhos, requereu a colaboração e adesão de muitas organizações, escolas e privados para a obtenção de exemplares. Entre 31 de agosto de 2019 e 9 de janeiro de 2020 foram realizados 13 eventos predominantemente no Alentejo, que resultaram na captura de 30 exemplares.

62. (OE.6) Para acomodar estes animais, foram adaptadas instalações existentes na Quinta do Almiaro e Infesto, em Torres Vedras;

63. (OE.6) Para a implementação e desenvolvimento deste ensaio foi construida uma unidade laboratorial móvel hermética, isotérmica, de pressão negativa e com entrada e saída de ar filtrado. Esta unidade está localizada no pólo do INIAV I.P. de Dois Portos.

64. (OE.6) O Ensaio Experimental foi submetido a avaliação pela Divisão de Gestão e Autorização de Medicamentos Veterinários da DGAV e encontra-se em pleno desenvolvimento. Os dados obtidos serão publicados oportunamente;

65. (OE.7) No momento de entrega deste relatório encontram-se em produção as partículas de tipo viral (VLPs) (desenvolvimento de vacina oral);

66. (OE.8) A avaliação do impacto do controlo de predadores na recuperação de coelho-bravo e lebre-ibérica foi parcialmente alcançada.

67. (OE.9) Foi construido um cercado de reprodução na FENCAÇA.

68. (OE.9) Foi construído com sucesso de cercado de reprodução de coelho-bravo instalado na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias, combinando vários objectivos do projecto +Coelho2.

69. (OE.9) Os animais que foram translocados para o cercado de reprodução da ANPC foram avaliados do ponto de vista sanitário e genético;

70. (OE.9) e (OE.10) Foram desenvolvidas soluções práticas para a retenção e quarentena de coelho-bravo previamente à sua libertação no cervcado da ANPC;

71. (OE.9) Foram desenvolvidos modelos de comedouros e bebedouros, integrados e aptos a distribuir ração e forragem, para cercados de coelho-bravo;

72. (OE.10) Foi desenvolvido um protocolo expedito e com obtenção de resultados em curto prazo, para captura de coelho-bravo e recolhas de amostras para análise genética e serológica (OE.9);

73. (OE.11) A transferência de informação e conhecimento entre os parceiros e para fora do Grupo de Trabalho +Coelho foi privilegiada e largamente assegurada através de:

    - Publicação de 70 notícias de divulgação relacionadas com o Projeto +Coelho, no site do INIAV;
    - Re-edição do Manual de Boas Práticas (Sanitárias e de Gestão);
    - Finalização do Manual de Boas Práticas de Gestão, atualmente em fase de edição;
    - Publicação de 6 Alertas e Recomendações face a focos por doença hemorrágica viral e mixomatose, redigidas em parceria pelo INIAV e DGAV;
    - Realização de 2 ações de sensibilização sobre a importância da atividade cinegética na preservação das espécies cinegéticas e da biodiversidade em escolas, campos de férias e festivais;
    - Realização de 15 ações de divulgação do Projeto +Coelho e das suas atividades em Feiras e Assembleias de Caça e em colóquios;
    - Realização de 21 comunicações científicas em Portugal e no estrangeiro (orais e em painel);
    - Publicação de 12 artigos em revistas nacionais de divulgação;
    - Publicação de 10 artigos em revistas internacionais;
    - Elaboração de 3 Fichas de Registo;
    - Elaboração de 3 Protocolos de colheita de material biológico (atualização do protocolo de recolha de amostras para exame virológico, Protocolo de colheita de fezes para exame coprológico; protocolo de colheita de material para exame anatomopatológico);
    - Produção de 2 folhetos sobre a mixomatose e sobre o gamaherpesvirus-5 das Lebres
    - Produção de 1 capítulo de Livro;
    - Produção de dois relatórios específicos no âmbito da Medida OE.5;
    - Produção de dois *dossiers* técnicos no âmbito da Medida OE.6;

17. Sumário dos indicadores de realização

Os Indicadores de realização e de resultados apresentados na Candidatura ao financiamento pelo Fundo Florestal Permanente (FFP) do Projeto +Coelho2, e respetivas taxas de execução são apresentados abaixo:

Tabela 89. Indicadores de Realização do Projecto +Coelho2, no final do Projecto

Indicador material			Aprovado (1)	Executado (2)	Taxa de execução (3)=(2)/(1)
Código	Designação	Unidade Medida			
1	Ações de formação realizadas	Nº	3,00	3,00	100%
2	Ações de divulgação e disseminação (Seminários, Apresentações) 13 eventos de captura*+15 Feiras de Caça+2 ações sensibilização+ 21 apresentações Orais&Posters+1 apresentação oral em Bruxelas+ 70 Noticias+ 1 capítulo de livro + 4 entrevistas= 127	Nº	11,00	127,00♣	1155%
3	Kits de colheita de material biológico entregues	Nº	500,00	585,00	117%
4	Cercado de reserva genética (2 de 3 OSC)		1,00	0,66	66%
5	Artigos científicos produzidos (12=10 Internacionais + 2 nacionais)	Nº	3,00	12,00	400%
6	Plataforma Web em ambiente SIG (em curso)	Nº	1,00	0,50	50%
7	Artigos de divulgação em revistas da especialidade (12)	Nº	3,00	12,00	400%
8	Protocolos (3), Manuais (1), brochuras/ folhetos informativos distribuídos (2)	Nº	3,00	6,00	200%

*Exposição dos objectivos do Projecto pelos membros do GT aos participantes nas capturas;

♣o critério para cálculo deste indicador foi alterado, relativamente ao utilizado no ultimo Relatório Intermédio, explicando a sua redução. Desta contabilização foram removidos os artigos publicados, as brochuras e os manuais, embora estes também constituam veículos de divulgação (por essa rzão o valor decresceu de 156 para 127).

Tabela 90. Indicadores de Resultados do Projeto "+Coelho 2".

Indicador material			Aprovado (1)	Executado (2)	Taxa de execução (3)=(2)/(1)
Código	Designação	Unidade Medida			
1	Participantes envolvidos nas ações de sensibilização [122 (13 capturas+15 feiras de caça+21apresentações orais+1apresentação no estrangeiro+2 workshops+70 noticias) x 50 participantes/evento]	Nº de presenças	200,00	6100,00	3050%
2	Kits de colheita de material biológico entregues idem	Nº de amostras recebidas no INIAV	500,00	587,00	117%
3	Plataforma interativa desenvolvida c/ disponibilização de informação e mapas	Nº de acessos	500,00	em curso	-
4	Protocolos (3x50)), Manuais (impresso e online, 450), brochuras/ folhetos informativos distribuídos (2x50)	Nº de exemplares distribuídos	500,00	700,00	140%

Apresentam-se de seguida os indicadores de realização e de execução definidos na Memória Descritiva da Candidatura para cada Objectivo Especifico.
Relativamente aos quadros apresentados na Memória Descritiva que serviu de base à candidatura do Projecto +Coelho2, foi incluída uma nova coluna, onde se descrevem os níveis de execução para facilitar a avaliação da execução das diferentes medidas do projeto Nesta nova coluna, é utilizado um sistema de cores para facilitar a leitura; verde=objectivo alcançado ou comcluido; amarelo=objectivo parcialmente concluído; vermelho=objectivo não alcançado.

Tabela 91. Quadro referente ao **OE1: "***Amostrar as populações de leporídeos caçados em zonas de caça selecionadas nas épocas venatórias 2018/2019 e 2019/2020 e as populações de leporídeos que evidenciem morbilidade ou mortalidade em todo o território nacional e no período a que se refere este relatório (01.11.2018 a 30.06.2020) e efetuar as análises laboratoriais necessárias ao conhecimento do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica"* e *"Investigação do estado hígio-sanitário das populações de coelho-bravo e lebre"*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Assegurar o adequado diagnóstico laboratorial com vista à determinação da causa de mortalidade em coelho-bravo e lebre no ano a que se refere o Projeto +Coelho 2	Redefinir o painel de agentes infeciosos a testar em função dos resultados do ano anterior	Determinação da causa de morte dos animais	N.º de diagnósticos conclusivos	Cumprido. Causa de morte identificada em cerca de 90% dos coelhos bravos (mixomatose, RHDV2, bacterias patogénicas, traumatismos, etc) e em cerca de 85% das lebres-ibéricas.	INIAV	INIAV
	Intensificar a amostragem de lebre-ibérica no território nacional	Aumentar os dados sobre a condição sanitária das populações de lebre	N° de amostras de lebre	Cumprido. Aumento de 54x da amostragem, relativamente ao Projecto +Coelho 1	OSC	INIAV
	Atualizar os protocolos de recolha de amostras e ficha de registo, quando necessário	Protocolos elaborados e distribuídos pelos caçadores	Amostras colhidas nas condições recomendadas	Alcançado. As amostras foram colhidas nas condições recomendadas. A percentagem de amostras rejeitadas foi inferior a 1 %, sendo este valor negligenciável	INIAV	DGAV
Garantir a funcionalidade de uma rede de recolha e armazenamento de amostras e a entrega destas no Laboratório de Referência de Saúde Animal do INIAV	Manter a funcionalidade da rede nacional de recolha de amostras envolvendo os parceiros	Confirmação pelos responsáveis dos pontos de recolha da operacionalidade da rede e da capacidade de armazenagem	Amostras entregues ao INIAV	Alcançado. A quase totalidade das amostras foi entregue nos pontos de recolha. As amostras chegaram em boas condições e com relativa rapidez ao INIAV.	INIAV	OSC, ICNF, DGAV, CIBIO,
	Rever as zonas de caça a amostrar no 2º ano de projeto, em função da dificuldade de amostragem e determinação de valores máximos e minimos de amostragem de coelhos-bravos por zona de caça por forma a otimizar a razão esforço/beneficio.	Incluir Zonas de Caça de onde provierem um número mínimo de amostras de animais caçados	Representatividade da amostragem	Parcialmente concluido. O ajuste das ZC amostradas durante o Projecto +Coelho2 permitiu alguma homogenização, evitando-se as sobreamostragens verificadas no Projecto +Coelho 1. Contudo verificou-se uma redução relativa da amostragem total.	OSC	INIAV/, DGAV, CIBIO, ICNF
	Fornecer kits para colheitas e preservação das amostras	Agilizar e facilitar o processo de colheita no campo e o diagnóstico laboratorial rigoroso	N° de kits entregues	Cumprido. 587,00 kits entregues. As OSCs utilizaram também kits entregues no Projecto	INIAV	

				+Coelho1.		
	Garantir a funcionalidade de armazenamento de amostras biológicas em frio	Armazenamento de material em boas condições	Número de amostras viáveis entregues ao INIAV	99% da amostragem em condiçoes para ser testada	INIAV/ICNF/OSC, CIBIO	
	Garantir as condições para a criação de um banco de amostras	Arcas frigoríficas a -20°C nos 19 pontos de recolha e arca a -80°C no INIAV	Quantidade de amostras entregues e criopreservadas por unidade de tempo	Alcançado. O Sistema de frio foi functional e adequado.	INIAV/ICNF/OSC	CIBIO
	Garantir as condições necessárias para a execução das análises laboratoriais	Adquirir os reagentes necessários à execução das provas laboratoriais	N° de provas executadas	9822 análises laboratoriais efetuadas	INIAV	OSC
Assegurar a recolha de amostras no campo pelas OSC	Garantir a vigilância ativa e passiva dos vírus da DHV e da mixomatose na amostragem considerada: colheita de material em animais caçados e em cadáveres encontrados no campo | diagnóstico laboratorial	Obtenção de dados virológicos numa amostragem alargada, representativa da população de coelho e lebre	Representatividade da amostra. Valores de prevalência /Incidência de DHV e mixomatose	Concluido. Ver relatório.	INIAV	DGAV, OSC, CIBIO
	Efetuar ações de atualização (Formação ou disponibilização de informação escrita) sobre o processo de colheita de material aos técnicos das Organizações do Setor da Caça	Atualizar os processos de colheita no campo, de acordo com o painel de agentes a testar	N.° de ações realizadas e retorno da vantagem da formação/atualização pelos operadores	Concluido. Ver relatório.	INIAV	INIAV, OSC
Assegurar a execução de diagnóstico diferencial quando solicitado pelos dados da necrópsia	Efetuar o exame anatomopatológico em cadáveres em bom estado de preservação	Obtenção de dados anatomopatológicos	Dados sobre as patologias que afetam o coelho-bravo e a lebre	Concluido. Ver relatório.	INIAV	OSC, DGAV, CIBIO
	Efetuar os exames bacteriológicos	Obtenção de dados bacteriológicos	Dados sobre as patologias que afetam o coelho-bravo e a lebre	Concluido. Ver relatório.	INIAV	OSC
	Efetuar os exames parasitológicos	Obtenção de dados parasitológicos	Dados sobre as patologias que afetam o coelho-bravo e a lebre	Concluido. Ver relatório.	INIAV	DGAV, OSC, CIBIO
	Efetuar outros exames considerados relevantes	Obtenção de dados	Dados sobre as patologias que afetam o coelho-bravo e a lebre	Concluido. Ver relatório.	INIAV	OSC
Assegurar os recursos humanos e materiais para a sequenciação de fragmentos genómicos virais, para esclarecimento dos resultados laboratoriais	Sequenciar o gene da cápside sempre que necessário para o correto diagnóstico. Sequenciar alguns genomas completos para perceber que recombinantes continuam a circular	Obtenção de informação genética dos vírus em circulação	Dados sobre os Lagovirus em circulação nas populações de coelho-bravo	Concluido. Ver relatório.	INIAV, CIBIO	
Assegurar o rastreio serológico das populações de coelho-bravo para a presença de anticorpos para o RHDV2	Garantir os recursos para executar os testes serológicos para deteção de anticorpos RHDV2	Testes ELISA específicos para a deteção de anticorpos para RHDV2	Disponibilização de metodologia para a deteção de anticorpos em soros de animais	Concluido. Ver relatório.	INIAV, CIBIO	

Tabela 92. Quadro relativo ao **OE2: "***Determinar as abundâncias de populações de coelho-bravo e lebre-ibérica em zonas de caça selecionadas."*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Assegurar condições padronizadas para a realização de avaliações populacionais em áreas modelo	Realizar avaliações populacionais de coelho-bravo e lebre em áreas modelo, com variabilidade no que toca a densidade de animais, prevalência de agentes virais patogénicos, fatores bióticos e abióticos; avaliação mensal (contagem de excrementos dispersos (método direto-avaliação mensal)	Avaliações padronizadas (N.º de ações e ha intervencionados por tipo de local) ao nível da zona de caça, com metodologia concertada e publicada	Metodologia de avaliação populacional padronizada e publicada; formação das equipas das OSC e fornecimentos de kits para trabalho de campo; Data e dados de avaliações populacionais; Mapas dinâmicos semestrais/anuais de escassez/abundância de coelho-bravo e de lebre	Concluido. Ver relatório.	OSC, CIBIO, ICNF	INIAV
		Plano de execução dos vários tipos de avaliações populacionais	Data e dados de avaliações populacionais de coelho-bravo e de lebre	Parcialmente concluido (limitações decorrentes da pandemia por COVID-19)	OSC, CIBIO	INIAV
		Produtos das avaliações populacionais	Mapas dinâmicos semestrais/anuais de escassez/abundância de coelho-bravo e de lebre	Em curso.	OSC, CIBIO	INIAV

Tabela 93. Quadro relativo ao **OE3.: "***Caraterizar a demografia do coelho-bravo e da lebre-ibérica e a epidemiologia dos agentes patogénicos mais relevantes que afetam estas espécies em diferentes biótopos, para ajustar adequadamente as futuras medidas de intervenção a diferentes cenários."*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Desenvolver e implementar uma Plataforma *online*	Concluir o desenvolvimento e implementação da Plataforma em condições de acomodar e processar os dados gerados	Plataforma interativa desenvolvida	Data de Desenvolvimento da Plataforma	Em curso	INIAV	CIBIO
Desenvolver inquéritos na plataforma Survey123	Concluir a adaptação do Inquérito Epidemiológico ao Survey123	Inquéritos disponíveis para preenchimento	Data da disponibilização dos inquéritos aos destinatários no primeiro trimestre de 2020.	Concluido em meados de 2019	INIAV/DGAV	OSC
Assegurar as condições para a formação e capacitação material e logística das equipas das organizações do setor da caça (OSC) para colaboração na recolha de dados	Instalar o *software* adequado nos dispositivos eletrónicos pessoais dos técnicos das OSC	Técnicos das OSC capacitados para o preenchimento dos inquéritos	Nº de dispositivos eletrónicos pessoais com *software* instalado e operacional.	90% dos participantes	INIAV/DGAV	OSC
	Efetuar uma ação de formação sobre o conteúdo do Inquérito epidemiológico Realizar ações de formação de equipas das OSC em áreas modelo e capacitação material e logística	Familiarização dos técnicos das Associações e Confederações de Caça com o programa para preenchimento do inquérito	Nº de ações de formação em áreas modelo Nº de técnicos formados	2 Ações de formação presenciais 13 formandos	INIAV/DGAV	OSC
Assegurar os recursos humanos e materiais para a recolha de dados das áreas modelo	Recolher os dados epidemiológicos, ecológicos, de gestão, climáticos e da paisagem	Inquéritos preenchidos e submetidos	Nº de inquéritos submetidos	2 inquértos submetidos (COVID-19)	OSC/INIAV/DGAV	CIBIO
Assegurar os recursos humanos para compilação e cruzamento dos dados da epidemiovigilância com os fatores bióticos e abióticos da paisagem	Analisar os dados da epidemiovigilância	Obtenção de dados epidemiológicos através de inquérito Relação entre dados da paisagem e abundância de coelho-bravo	Inferência das variáveis ecológicas, climáticas e da paisagem, explicativas para maior abundância de coelho-bravo Conhecimento do estado ecossanitário da população de coelho-bravo e lebre	Em curso	OSC/INIAV /DGAV	CIBIO
Integrar os dados demográficos, ecológicos e sanitários	Analisar e integrar os dados epidemiológicos, demográficos e ecológicos, seu processamento e tratamento gráfico	Produção de gráficos e mapas dinâmicos	Disponibilização *online* de mapas dinâmicos de escassez/abundância de coelho-bravo, tendência da população (crescente, estacionária, decrescente)	Em curso	INIAV/DGAV	CIBIO
		Determinação das taxas de incidência, prevalência e mortalidade	Taxas de incidência, prevalência e mortalidade conhecidas Taxas de prevalência amostral conhecidas	Concluido.	INIAV	DGAV, CIBIO
Modelar o risco de DHV com base em variáveis bióticas e abióticas.	Identificar as variáveis de risco para infeção por DHV através de técnicas de modelação estatística	Identificação de condições naturais favoráveis ao restabelecimento das populações	Divulgação de medidas de intervenção que favoreçam o incremento das populações	Parcialmente concluido	INIAV	DGAV, CIBIO

Tabela 94. Quadro relativo ao **OE4**: "*Aumentar a consciência social sobre a importância da preservação dos recursos genéticos endógenos, através do desenvolvimento de ações de educação e sensibilização sobre o estatuto frágil da subespécie O. c. algirus e da espécie Lepus granatensis, a importância da conservação dos recursos genéticos autóctones e a importância de se limitar a circulação de agentes patogénicos através da adoção de boas práticas no campo*".

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Adequar os recursos humanos e materiais para divulgar a importância da pureza genética e estatuto sanitário dos recursos endógenos do nosso país	Promover ações de comunicação, educação, sensibilização e divulgação da importância de se preservar a genética e a saúde do coelho-bravo e da lebre	Dissuadir a introdução de animais de condição genética e sanitária desconhecida; Proporcionar a transferência de conhecimento de forma ajustada aos destinatários	N.º de ações de divulgação efetuadas	23 ações de formação.	INIAV, ICNF, CIBIO, OSC, DGAV	TODOS OS PARCEIROS

Tabela 95. Quadro relativo ao **OE5: "***Assegurar a melhoria da condição corporal dos leporídeos caçados após suplementação de alimento composto administrado em comedouro para coelho-bravo desenvolvido pelo projeto (e registo de patente)*".

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL<	ENTIDADE PARTICIPANTE
Garantir os recursos financeiros para a realização de suplementações alimentares em Zonas de Caça aderentes ao Projeto, assim como de desparasitações bianuais no âmbito do Projeto +Coelho 2	Concluir os ensaios dos aromatizantes	Identificar o(s) aromatizante(s) preferido(s) pelos coelhos-bravos	Ensaio concluído.	Alcançado. Tomilho foi o aromatizante preferido pela maioria das populações.	OSC	INIAV
	Desenvolver comedouros para coelho-bravo	Projeto de comedouro concluído		Concluido.	OSC	INIAV
	Iniciar as desparasitações bianuais	Molde de Comedouro construído	Nº de comedouros montados no campo	Implementação parcial, assegurada pelas OSCs.	OSC	INIAV
	Registar a patente do comedouro +Coelho			Não concluido.	OSC/INIAV	

Tabela 96. Quadro relativo ao **OE6:** *"Averiguar se as vacinas comerciais contra a mixomatose induzem a produção de anticorpos protetores em lebre-ibérica, tendo em vista a sua utilização no futuro, caso a espécie venha a ser considerada criticamente ameaçada".*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Garantir os recursos financeiros e logísticos para determinação da cinética de produção de anticorpos em lebres imunizadas com vacinas para a mixomatose	Identificação de infraestruturas para realização de ensaio exploratório de vacinação em lebre-ibérica	Infraestruturas com características adequadas para alojar os animais	Estrutura identificada e adequada ao propósito do ensaio	Construido um laboratório móvel.	INIAV	ICNF, DGAV, CIBIO
	Aquisição de exemplares de lebre-ibérica	Dispor de exemplares para a realização dos ensaios	Animais adaptados às infraestruturas	Animais adaptados às instalações.	INIAV	ICNF, DGAV, CIBIO
	Aquisição de vacinas	Vacinas adquiridas	Adquiridas 50 doses de Mixohipra-FSA e 50 doses de Mixohipra-H.	Concluido.	INIAV	
	Alimentação e manutenção dos animais			Alimentação complementada com cereais cedidos pelo INIAV (Pólo de Elvas) e por luzerna em cultivo permanente na Quinta do Infesto.	INIAV	
	Quarentena e avaliação sanitária e genética	Comprovar que os animais estão saudáveis	Os animais mantêm-se saudáveis, a comer 300g de cereal por dia com complementação de luzerna e a beber 70-100ml de água por dia. A visualização por fotoarmadilhagem demonstra a adequação das instalações aos animais porque evidencia a manutenção do *grooming* e a expressão do comportamento normal. O hemograma, marcadores renais, hepáticos e nutricionais revelam as condições adequadas.	Concluido. Concluido. Em curso.	INIAV	CIBIO
	Vacinação dos animais, recolha de soro e ensaios de seroneutralização	Animais vacinados	Deteção e titulação de anticorpos neutralizantes produzidos por lebres vacinadas contra o vírus da mixomatose e avaliação da resposta celular.	Em curso	INIAV	ICNF, DGAV, CIBIO

Tabela 97. Quadro relativo ao **OE7:** *"Conferir imunidade às populações naturais de coelho-bravo contra as estirpes de RHDV2 em circulação, através do desenvolvimento de uma vacina oral, que implica a caraterização genética das estirpes circulantes para modelação da vacina".*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Desenvolver uma vacina oral contra RHDV2	Sequenciar o gene *vp60* de estirpes de RHDV2	Dispor das sequencias nucleotidicas das estirpes de RHDV2 identificadas em locais distintos	Alinhamento produzido	Concluido	INIAV	OSC
	Identificar as estirpes representativas do conjunto de estirpes que circulam no território	Selecionar um subconjunto de estirpes a incluir na vacina		3 estirpes selecionadas	INIAV/iBET	OSC
	Amplificar e clonar o gene *vp60* das estirpes selecionadas	Plasmídeos recombinantes construidos		Concluido	INIAV	
	Providenciar ao iBET o material necessário à construção das VLPs	Material entregue		Concluido	INIAV	

Tabela 98. Quadro relativo ao **OE8.**

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NIVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de populações	Correção de densidades de Predadores (com infraestruturas necessárias)	Diminuição da Predação Armadilhas seletivas	N.º de Capturas Variação da abundância de predadores Variação da abundância de coelho-bravo	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Melhoria da Condição Fisica dos leporideos	Distribuição da ração medicamentosa	N.º Animais	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de habitat	Construção de abrigos e morouços	Número de morouços		Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Gestão de matos e clareiras			Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Aumentar a disponibilidade de água e alimento [através da colocação de comedouros, bebedouros e campos de alimentação e disponibilização de alimento (ex. cereais e ração) em períodos do ano com défice de alimento]	Comedouros, bebedouros e campos de alimentação	Consumos	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Diminuir a proliferação de vetores infeciosos (desinsetização de tocas e moroiços)	Desinsetização com inseticidas utilizados na produção biológica	Existências	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Entidades gestoras das Zonas de Caça das áreas de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Controlo de alimentação e água	Verificação das preferências alimentares e das	Registos de alimentação com indicações de	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Cercados pertencentes à ZC da area de estudo

		quantidades	preferências e quantidades			INIAV, ICNF, CIBIO
Recuperação do coelho bravo e da lebre ibérica através de medidas práticas de gestão de cercados	Medidas sanitárias	Aplicação de desparasitantes, vacinas e desinfeções	Registos de vacinação com número de coelhos vacinados	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Cercados pertencentes à ZC da area de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Capturas	Capturas de animais e sua monitorização	Registos de capturas	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Cercados pertencentes à ZC da area de estudo INIAV, ICNF, CIBIO
	Translocações	Repovoamento com animais criados, utilizando parques de adaptação localizados nas área de gestão de predadores e de Habitats	Incremento de áreas com populações de coelhos	Parcialmente atingido. Ver relatório.	OSC	Cercados pertencentes à ZC da area de estudo INIAV, ICNF, CIBIO

Tabela 99. Quadro relativo ao **OE9:** ***"****Património genético, criação de cercados e infraestruturas complementares (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém (Pólo do INIAV) e de 3 cercados de reprodução modelo em zonas de caça".*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVELDE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Assegurar o património genético das populações de coelho-bravo	Efetuar análises genéticas para a certificação da subespécie O. c. algirus	Certificação genética do coelhos-bravo, a utilizar nos cercados	Número de amostras analisadas	Parcialmente atingido. Ver relatório.	INIAV, CIBIO	OSCs, ICNF, DGAV
Criação de núcleo genético de coelho bravo	Criar cercado (rede enterrada) com infra-estruturas necessárias (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de núcleo de conservação de coelho-bravo em Santarém	Cercado construído	Cercado adequado aos propósitos a que se destina	Medida adiada: reformulado para cercado de coelho-bravo e lebre –ibérica. Proposta de construção concluída (ReGeLep)	INIAV	OSC/ICNF/CIBIO/DGAV
Criação de uma rede de cercados de reprodução modelo de coelho-bravo em zonas de caça	Criar, nesta fase, três cercados (rede enterrada) com infra-estruturas necessárias (comedouros, bebedouros, moroiços) para a constituição de centros de reprodução nas zonas de caça (um por OSC)	Cercados contruídos	Cercados adequados aos propósitos a que se destinam (2+1)	Parcialmente atingido. 2 cercados concluidos	OSC	ICNF/CIBIO/DGAV/INIAV
	Capturar e testar os animais a incluir nos centros de reprodução	Dispor de animais para incluir nos cercados	N° de animais capturados	28 coelhos + 40 lebres	OSC	INIAV/CIBIO
	Formar uma equipa multidisciplinar para assessoria técnico-científica na construção dos cercados acima referidos	Assegurar o aconselhamento técnico-cientifico na construção dos cercados e no maneio dos animais		Assegurado.	INIAV/DGAV/ICNF/CIBIO/OSC	
	Acompanhar as ações de repovoamentos, pela comissão de supervisão		N° de visitas efetuadas	5 visitas	INIAV/CIBIO/DGAV/ICNF	
	Testar periódicamente os animais em cercado para garantir a sua pureza genética e bom estado sanitário		N° de testes realizados e resultados obtidos	28 testes realizados	INIAV/CIBIO	

Tabela 100. Quadro relativo ao **OE.10: "***Promover ações de translocação com animais imunizados pelo contato natural com RHDV2."*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
OE10.1. Estabelecer rede de cercados de reprodução com animais com elevados níveis de Ac.	Identificação de núcleos de alta densidade de coelho-bravo, recolha de amostras para análise serológica e caracterização das condições biofísicas			Concluido.	CIBIO	OSC, INIAV, ICNF, DGAV
	Análises serológicas			28 análises serológicas	CIBIO	
	Realização de capturas e translocação para cercados de reprodução	Captura de coelhos com elevados níveis de Ac	N.º de coelhos capturados N.º de cercados de reprodução povoados	N=28 N=1	CIBIO, OSC	INIAV, ICNF, DGAV
OE10.2. Promover a translocações com animais imunizados pelo contacto natural com RHDV2	Ensaios de translocações com animais com elevados níveis de Ac, criados em cercados de reprodução (médio prazo)	Captura de animais nos cercados de reprodução e sua translocação para cercados de adaptação/repovoamento	N.º coelhos capturados N.º cercados de adaptação povoados	N=28 N=1	CIBIO, OSC	INIAV, ICNF, DGAV
	Ensaios de acções de transçocação com animais capturados em núcleos com elevados níveis de Ac (curto prazo)	Captura de coelhos com elevados níveis de Ac e sua imediata utilização em translocação para zonas adjacentes, Marcação de animais com colares emissrores (telemetria), e microchips	N.º coelhos capturados N.º cercados de adaptação povoados N de animais marcados com colares emissores e microchips	Em curso	CIBIO, OSC	INIAV, ICNF, DGAV

Tabela 101. Quadro relativo ao OE.11: *"Divulgar e publicar as atividades técnico-científicas desenvolvidas e os resultados científicos obtidos no âmbito do Projecto +Coelho2 para diferentes públicos e promover ações de demonstração."*

OBJETIVO OPERACIONAL	ATIVIDADE	METAS e PRODUTOS	INDICADORES DE RESULTADOS	NÍVEL DE EXECUÇÃO	ENTIDADE RESPONSAVEL	ENTIDADE PARTICIPANTE
Desenvolver mecanismos expeditos de divulgação	Publicar Notícias e Alertas sanitários	Diminuir a permanência de cadáveres de coelho-bravo e lebre no campo através do incentivo à recolha de cadáveres	Data de publicação Nº de publicações	69 noticias 6 aertas	INIAV	DGAV
Adequar os recursos humanos e materiais para a divulgação de conhecimento	Produzir brochuras informativas para caçadores, gestores e Médicos Veterinários	Publicação de folhetos informativos	Data de lançamento dos folhetos Nº de folhetos	2 brochuras	INIAV, DGAV	OSC
	Preparar folhetos sobre Boas Práticas de Gestão Cinegética	Material de divulgação entregue aos destinatários Artigos publicados	N.º de folhetos publicados	1 Manual	INIAV, DGAV	CIBIO
	Publicar artigos em revistas nacionais		Nº de artigos de divulgação publicados	12 artigos em revistas nacionais	INIAV, CIBIO, DGAV	
	Publicar artigos em revistas internacionais		Nº de artigos científicos publicados	12 artigos em revistas internacionais	INIAV, CIBIO, DGAV	
Desenvolver ações de divulgação e demonstração de boas práticas de gestão baseadas nas áreas de estudo	Ações de demonstração de instalação de cercados de reprodução, cercados de adaptação / repovoamento, controlo de predadores e gestão de habitats	Visitas de demonstração às zonas de caça piloto	N.º de jornadas de demonstração N.º de participantes	(COVID-19)	OSC	INIAV, ICNF, DGAV, CIBIO

Anexos

Anexo I

Ficha de Identificação de Amostra Revista

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS EM PORTUGAL

(Despacho nº 4757/2017 de 31 de Maio)

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA PARA EXAME VIROLÓGICO E SEROLÓGICO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS LEPORÍDEOS

REMETENTE

Nome:

Contacto (telefone/telemóvel): E-mail:

Caçador: Gestor: Guarda: Outro:

LOCAL

Localidade:

Freguesia: Concelho: Distrito:

Coordenadas GPS: Latitude Longitude

Zona de Caça: Número Nome

Tipo de Zona de Caça: Associativa Municipal Turística Nacional Outro local:

INFORMAÇÃO SOBRE O CADÁVER ENCONTRADO / ANIMAL CAÇADO

Data de recolha da amostra:

Identificação do cadáver (Código da Zona de Caça | Número de cadáver):

Espécie: Coelho-bravo Coelho doméstico Lebre

Género: Macho Fêmea Faixa Etária: Adulto Juvenil

Ocorrência: Encontrado Morto Caçado Atropelado Outra situação:

Material colhido: Cadáver Caçado: Fígado Baço Sangue Duodeno Fezes

Presença de: Sangue nos orifícios naturais Sinais de mixomatose (edema, mixomas)

Presença de Parasitas: Pulgas Carraças Ténias Cisticercos (vesículas na cavidade abdominal)

Nemátodos (lombrigas) Manchas brancas no fígado Manchas brancas na superfície do intestino

Observou a presença de outros cadáveres? Não Sim Quantos?

Outras observações:

Data de preenchimento do formulário:

Anexo II

Tabelas Anexas

Tabela 1AII. Tipo e localização por unidade territorial NUT II das **27** zonas de caça amostradas (coelho-bravo caçado e lebre ibérica caçada) durante a EV 18/19.

Tipo ZC	Nº Total de ZC	Nº ZC/ NUTII	NUT II	Nº de Identificação da ZC	Nome da ZC
Associativa	7	2	**Norte**	**1365**	ZCA Rates
				2780	ZCA Nabo
		5	**Alentejo**	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras
				1772	ZCA Freguesia do Tramagal
				5854	ZCA Herdade da Esteveira
				6583	ZCA da Herdade da Malhadinha e Outra
Municipal	2	1	**Norte**	**3904**	ZCM Arcos de Valdevez
		1	**Alentejo**	**3426/5560**	ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça
Turistica	18	17	**Alentejo**	**61**	ZCT Cela
				173	ZCT Portela da Brava
				174	ZCT Vale Manantio
				188	ZCT Vale Perdidos
				385	ZCT Várzea
				622	ZCT das Cortes
				841	ZCT dos Prazeres
				1803	ZCT Herdade Alcaria Ruiva
				2156	ZCT da Herdade da Olva e Anexos
				2405	ZCT Herdade do Monte da Vinha
				2426	ZCA Herdade do freixo de Baixo e Outras
				2477	ZCT Neves da Graça
				4810	ZCT de Pucicaros de Cima
				5231	ZCT Malpique e Monte Grande
				5671	ZCT do Monte de Cima
				5759	ZCT Monte Cavaleiro
				5939	ZCT Moninho
		1	**Algarve**	**743**	ZCT Pereiro

Tabela 2AII. Tipo e localização por unidade territorial NUT II das **24** zonas de caça amostradas (coelho-bravo caçado e lebre ibérica caçada) durante a EV 19/20.

Tipo ZC	Nº Total de ZC	Nº ZC/ NUTII	NUT II	Nº de Identificação da ZC	Nome da ZC
Associativa	8	3	**Centro**	**829**	ZCA Pedra da Légua e Outras
				1075	ZCA da Covilhã
				5285	ZCA Ratoeira
		5	**Alentejo**	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras
				565	ZCA Herdade Monte Branco, Lages grandes e outras
				1772	ZCA Freguesia do Tramagal
				5052	ZCA da Herdade de Souseis e anexas
				5854	ZCA Herdade da Esteveira
Municipal	2	1	**Norte**	**3468**	ZCM de Lousada
		1	**Alentejo**	**3426/5560**	ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça
Turistica	14	1	**Centro**	**6531**	ZCT da Pedra da Légua
		12	**Alentejo**	**15**	ZCT Herdade Cerro da Cela e Outras
				61	ZCT Cela
				188	ZCT Vale Perdidos
				622	ZCT das Cortes
				779	ZCT Herdade Arrochais
				1803	ZCT Herdade Alcaria Ruiva
				2156	ZCT da Herdade da Olva e Anexos
				2477	ZCT Neves da Graça
				4810	ZCT de Pucicaros de Cima
				5124	ZCT do Moinho da Ordem
				5671	ZCT do Monte de Cima
				6840	ZCT do Porto Bonito
		1	**Algarve**	**743**	ZCT Pereiro

Tabela 3AII. Amostragem de leporídeos coletada entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020 e percentagens relativas de cada espécie por categoria.

Leporídeos silváticos amostrados	Nº de exemplares	Percentagem relativa
Coelho-bravo (caçado)	601	61,89
Coelho-bravo (cadáver)	169	17,40
Lebre-ibérica (caçada)	49	5,05
Lebre-ibérica (cadáver)	95	9,78
Coelho-bravo (cadáveres de explorações de produção cinegéticas)	35	3,60
Lebre-ibérica (cadáveres do núcleo de reprodução OE6, MG 6)	22	2,27
Total	**971**	**100**

Tabela 4AII. Sexo e classes etárias na amostragem de **coelho-bravo** caçado e de cadáveres prospetados ativamente no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

Espécie	Sexo	Classe etária	Nº de exemplares	Percentagem relativa (%)
Coelho-bravo caçado	**Fêmea**	Adulto	158	26,28
		Juvenil	37	6,15
		Classe etária não determinada	105	17,47
		Total	**300**	
	Macho	Adulto	153	25,46
		Juvenil	43	7,15
		Classe etária não determinada	96	15,97
		Total	**292**	
	Não determinado	Adulto	3	0,46
		Juvenil	0	0
		Classe etária desconhecida	6	0,99
		Total	**9**	
Coelho-bravo cadáver	**Fêmea**	Adulto	32	18,93
		Juvenil	47	27,81
		Classe etária não determinada	0	0
		Total	**79**	
	Macho	Adulto	49	28,99
		Juvenil	32	18,93
		Classe etária desconhecida	0	0
		Total	**81**	
	Não determinado	**Adulto**	1	0,59
		Juvenil	8	4,73
		Classe etária desconhecida	0	0
		Total	**9**	

Tabela 5AII. Sexo e classes etárias na amostragem **lebre-ibérica** caçada e de cadáveres de prospetados ativamente no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

Espécie	Sexo	Classe etária	Nº de exemplares	Percentagem relativa (%)
Lebre-ibérica caçada	**Fêmea**	Adulto	12	24,46
		Juvenil	0	0
		Classe etária não determinada	10	20,41
		Total	**22**	
	Macho	Adulto	15	30,61
		Juvenil	2	4,08
		Classe etária não determinada	9	18,37
		Total	**26**	
	Indeterminado	Adulto	0	0
		Juvenil	0	0
		Classe etária desconhecida	1	2,04
		Total	**1**	
Lebre-ibérica cadáver	**Fêmea**	Adulto	33	34,74
		Juvenil	9	9,47
		Classe etária não determinada	1	1,05
		Total	**43**	
	Macho	Adulto	37	38,95
		Juvenil	7	7,37
		Classe etária não determinada	1	1,05
		Total	**45**	
	Indeterminado	Adulto	2	2,11
		Juvenil	1	1,05
		Classe etária não determinada	4	4,21
		Total	**7**	

Tabela 6AII Origem geográfica e por zona de caça dos exemplares de **lebre-ibérica** caçados na EV 18/19.

NUTII	Distrito	Concelho	Tipo ZC	Nº ZC	Nome ZC	Lebre Caçada (N)
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo	A	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras	4
Alentejo	Beja	Moura	T	**174**	ZCT Vale Manantio	1
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**841**	ZCT dos Prazeres	3
Alentejo	Beja	Mértola	T	**1803**	ZCT Herdade Alcaria Ruiva	5
Alentejo	Beja	Almodôvar	T	**2405**	ZCT Herdade do Monte da Vinha	7
Alentejo	Évora	Viana do Alentejo	T	**2426**	ZCA Herdade do freixo de Baixo e Outras	1
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**2477**	ZCT Neves da Graça	4
Norte	Bragança	Vila Flor/Nabo	A	**2780**	ZCA Nabo	2
Alentejo	Santarém	Alpiarça/Almeirim	M	**3246**	ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça	1
Alentejo	Évora	Mora/Pavia	T	**5231**	ZCT Malpique e Monte Grande	3
Alentejo	Évora	Borba	A	**5854**	ZCA Herdade da Esteveira	2
Alentejo	Beja	Mértola/Alcaria Ruiva	A	**6583**	ZCA da Herdade da Malhadinha e Outra	1
Alentejo	Beja	Ourique	T	**6793**	ZCT da Herdade do Monte Novo	4
Total						**38**

Tabela 7AII Origem geográfica e por zona de caça dos exemplares de **lebre-ibérica** caçados na EV 19/20.

NUTII	Distrito	Concelho	Tipo ZC	Nº ZC	Nome ZC	Lebre Caçada (N)
Alentejo	Évora	Évora/S. Miguel de Machede	A	**565**	ZCA Herdade Monte Branco, Lages grandes e outras	**1**
Algarve	Faro	Alcoutim	T	**743**	ZCT Pereiro	**1**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**1803**	ZCT Herdade Alcaria Ruiva	**2**
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**2477**	ZCT Neves da Graça	**1**
Alentejo	Évora	Mora/Pavia	T	**4810**	ZCT de Pucicaros de Cima	**2**
Alentejo	Évora	Évora	A	**5052**	ZCA da Herdade de Souseis e anexas	**1**
Alentejo	Évora	Borba	A	**5854**	ZCA Herdade da Esteveira	**2**
Centro	Leiria	Leiria	N/A	N/A	Particular/Óscar Neto	**1**
Total						**11**

Tabela 8AII. Origem geográfica e por zona de caça dos cadáveres de **lebre-ibérica** prospetados ativamente no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

NUTII	Distrito	Concelho	Tipo ZC	nº ZC	Nome ZC	Lebre Cadáver
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo	A	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras	**3**
Alentejo	Santarém	Benavente/Companhia Lezírias	T	**66**	ZCT Roubão, Braço de Prata e Outras	**1**
Alentejo	Setúbal	Alcácer do Sal	T	**326**	ZCT da Herdade da Barrosinha e outras	**1**
Alentejo	Santarém	Cartaxo/Ereira	A	**397**	ZCA Herdade Braçal e outras	**1**
Alentejo	Évora	Arraiolos/Vimieiro	A	**457**	ZCA do Rebocho	**2**
Alentejo	Évora	S. Brás de Regadouro	T	**632**	ZCT Herdade da Bala	**1**
Alentejo	Beja	Castro Verde/Entradas	T	**1726**	ZCT Herdade Pães Agua Apariça	**1**
Centro	Castelo Branco	Idanha a Nova/Alcafozes	T	**2176**	ZCT Granja São Pedro	**1**
Centro	Castelo Branco	Idanha a Nova/Aldeia Sta. Margarida	A	**2182**	ZCA Aldeia de Santa Margarida	**1**
Algarve	Faro	Olhão/Moncarapacho	A	**2193**	ZCA do Cerro da Cabeça	**1**
Algarve	Faro	Tavira/Conceição de Tavira	A	**2400**	ZCA das Solteiras	**4**
Alentejo	Beja	Serpa/Vila Nova de S. Bento	A	**2483**	ZCA das Poisadas	**1**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	M	**2761**	ZCM de Santo Tirso	**1**
Alentejo	Beja	Castro Verde	A	**3343**	ZCA de Entradas	**3**
Centro	Guarda	Pinhel	M	**3855**	ZCM de Pinhel	**1**
Alentejo	Setúbal	Alcácer do Sal/Torrão	M	**3947**	ZCM do Torrão	**1**
Algarve	Faro	Tavira/Conceição de Tavira	A	**4150**	ZCA do Alvisquer	**3**
Alentejo	Beja	Castro verde	A	**4202**	ZCA dos Bispos	**1**
Alentejo	Évora	Évora/Torre de Coelheiros	A	**4677**	ZCA do Clube Caça e Pesca do Bacelo	**1**
Alentejo	Santarém	Benavente	T	**4855**	ZCT Herdade do Infantado	**2**
Alentejo	Évora	Viana do Alentejo/Samarra	A	**5260**	ZCA da Aramada III	**2**
Alentejo	Évora	Viana do Alentejo/Aguiar	A	**5265**	ZCA da Aramada II	**2**
Alentejo	Évora	S. Marcos	A	**5347**	ZCA da Acdoe	**1**
Alentejo	Évora	Redondo/Montoito	A	**5407**	ZCA da Freguesia de Montoito III	**6**
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo/Escoural	A	**5419**	ZCA do Escoural II	**1**

Alentejo	Setúbal	Alcácer do Sal	T	**5738**	ZCT Herdade da Batalha	**2**
Alentejo	Évora	Borba	A	**5854**	ZCA Herdade da Esteveira	**1**
Alentejo	Portalegre	Campo Maior/Nossa Senhora da Espectação	A	**5864**	ZCA de Campo Maior	**4**
Alentejo	Beja	Vila Nova de Baronia/Alvito	A	**5987**	ZCA dos Albardeiros	**1**
Alentejo	Portalegre	Monforte	A	**6365**	ZCA do Pombal	**2**
Alentejo	Beja	Beringel	A	**6392**	ZCA Monte da Barrameira	**1**
Centro	Castelo Branco	Idanha a Nova/Rosmaninhal	T	**6396**	ZCT Ribeira da Rata	**2**
Alentejo	Évora	Évora	T	**6431**	ZCT Vale de Moura e Mourinha	**1**
LVT	Setúbal	Montijo/ Canha	A	**6447**	ZCA Corte Baço	**1**
Alentejo	Beja	Serpa/Vale de Pepoitas	T	**6838**	ZCT da Fonte do Pelingroso	**1**
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**6938**	ZCT Vale Gonçalo	**3**
Alentejo	Beja	Aljustrel	T	**7000**	ZCT da Herdade da Beguina	**1**
Alentejo	Évora	Arraiolos/Herdade do Outeiro de Esquila	T	**7065**	ZCT da Herdade do Mortal e outras	**1**
			A	**7178**	ZCA dos Vilares	**1**
LVT	Setúbal	Alcochete/Samora Correia	N/A	N/A	Campo de Golfe	**1**
Alentejo	Beja	Mértola/Corte Pequeno	N/A	N/A	Estrada	**1**
LVT	Setúbal	Setúbal	N/A	N/A	LxCRAS/Estuário do Sado	**1**
Algarve	Faro	Vila Real de S. António/Vila Nova de Cancela	N/A	N/A	Parque Natural da Ria Formosa	**2**
Algarve	Faro	Tavira/Mato de Ordem	N/A	N/A	Parque Natural da Ria Formosa	**1**
Algarve	Faro	Olhão/Moncarapacho	N/A	N/A	Quinta Argentina	**1**
Alentejo	Beja	Beja	N/A	N/A	Particular/Fábio Abade dos Santos	**1**
Alentejo	Beja	Alvito	N/A	N/A	Ricardo Neto	**1**
Alentejo	Santarém	Benavente	N/A	N/A	Particular/João Manuel Paixão Quirino	**1**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	N/A	N/A	ICNF/Nuno Neves	**1**
LVT	Setúbal	Alcochete	N/A	N/A		**2**
Setúbal	Setúbal	Alcochete	N/A	N/A	Particular/Fábio Abade dos Santos	**6**
Alentejo	Beja	Mértola	N/A	N/A	Espirito Santo	**1**
Alentejo	Portalegre	Elvas	N/A	N/A	Clube de Tiro de Elvas	**2**

Alentejo	Beja	Ourique	N/A	N/A	Particular/Diogo Luz	**1**
Alentejo	Beja	Ourique	N/A	N/A	Teresa Costa	**1**
Alentejo	Beja	Ourique	N/A	N/A	Fencaça/Jorge Santos	**1**
Alentejo	Beja	Ourique	N/A	N/A	Particular/Diogo Luz	**1**
Centro	Castelo Branco	Covilhã	N/A	N/A	André Cid Ferreira	**3**
Alentejo	Santarém	Salvaterra de Magos (Marinhais)	N/A	N/A	Particular/Sebastião Miguel	**1**
Total						**95**

Tabela 9AII. Origem geográfica e por zona de caça dos exemplares de **coelho-bravo** caçados na EV 18/19.

NUT II	**Distrito**	**Concelho**	**Tipo ZC**	**nº ZC**	Nome ZC	**Coelho Caçado (N)**
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo	A	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras	**27**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**61**	ZCT Cela	**20**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**173**	ZCT Portela da Brava	**10**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**188**	ZCT Vale Perdidos	**19**
Alentejo	Portalegre	Ponte de Sôr	T	**385**	ZCT Várzea	**10**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	T	**622**	ZCT das Cortes	**19**
Algarve	Faro	Alcoutim	T	**743**	ZCT Pereiro	**11**
Norte	Porto	Póvoa do Varzim	A	**1365**	ZCA Rates	**9**
Alentejo	Santarém	Abrantes	A	**1772**	ZCA Freguesia do Tramagal	**4**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**1803**	ZCT Herdade Alcaria Ruiva	**18**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**2156**	ZCT da Herdade da Olva e Anexos	**5**
Alentejo	Beja	Almodôvar	T	**2405**	ZCT Herdade do Monte da Vinha	**1**
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**2477**	ZCT Neves da Graça	**8**
Norte	Bragança	Vila Flor	A	**2780**	ZCA Nabo	**3**
Norte	Viana do Castelo	Arcos de Vadevez	M	**3904**	ZCM Arcos de Valdevez	**7**
Alentejo	Évora	Mora	T	**4810**	ZCT de Pucicaros de Cima	**12**
Alentejo	Évora	Mora	T	**5231**	ZCT Malpique e Monte Grande	**5**
Alentejo	Évora	Estremoz	T	**5671**	ZCT do Monte de Cima	**38**
Alentejo	Beja	Almodôvar	T	**5759**	ZCT Monte Cavaleiro	**2**
Alentejo	Évora	Borba	A	**5854**	ZCA Herdade da Esteveira	**7**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**5939**	ZCT Moninho	**6**
Alentejo	Santarém	Alpiarça/Almeirim	M	**3246/5560**	ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça	**24**
Total						**265**

Tabela 10AII. Origem geográfica e por zona de caça dos exemplares de **coelho-bravo** caçados na EV 19/20.

NUT II	Distrito	Concelho	Tipo ZC	Nº ZC	Nome ZC	Coelho Caçado (N)
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo	A	**4**	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras	**32**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**15**	ZCT Herdade Cerro da Cela e Outras	**5**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**61**	ZCT Cela	**11**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**188**	ZCT Vale Perdidos	**1**
Alentejo	Évora	S. Miguel de Machede	A	**565**	ZCA Herdade Monte Branco, Lages grandes e outras	**3**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	T	**622**	ZCT das Cortes	**22**
Algarve	Faro	Alcoutim	T	**743**	ZCT Pereiro	**7**
Alentejo	Beja	Moura	T	**779**	ZCT Herdade Arrochais	**9**
Centro	Castelo Branco	Castelo Branco	A	**829**	ZCA Pedra da Légua e Outras	**23**
Centro	Castelo Branco	Covilhã	A	**1075**	ZCA da Covilhã	**14**
Alentejo	Santarém	Abrantes	A	**1772**	ZCA Freguesia do Tramagal	**29**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**1803**	ZCT Herdade Alcaria Ruiva	**20**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**2156**	ZCT da Herdade da Olva e Anexos	**19**
Alentejo	Beja	Castro Verde	T	**2477**	ZCT Neves da Graça	**7**
Norte	Porto	Lousada	M	**3468**	ZCM de Lousada	**14**
Alentejo	Évora	Mora	T	**4810**	ZCT de Pucicaros de Cima	**8**
Alentejo	Setúbal	Alcácer do Sal	T	**5124**	ZCT do Moinho da Ordem	**23**
Centro	Guarda	Celorico da Beira	A	**5285**	ZCA Ratoeira	**4**
Alentejo	Évora	Estremoz	T	**5671**	ZCT do Monte de Cima	**50**
Alentejo	Évora	Borba	A	**5854**	ZCA Herdade da Esteveira	**7**
Centro	Castelo Branco	Castelo Branco	T	**6531**	ZCT da Pedra da Légua	**1**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**6840**	ZCT do Porto Bonito	**3**
Alpiarça/Almeirim	Santarém	Alentejo	M	**3426/5560**	ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça	**24**
Total						**336**

Tabela 11AII. Origem geográfica e por zona de caça dos cadáveres de **coelho-bravo** prospetados ativamente no campo entre 1 de setembro de 2018 e 30 de junho de 2020.

NUTII	Distrito	Concelho	Tipo ZC	nº ZC	Nome ZC	Coelho Cadaver
Alentejo	Évora	Montemor-o-Novo	A	**4**	ZCA Abrunheira, Paço de Aragão e Outras	**40**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**173**	ZCT Portela da Brava	**1**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**188**	ZCT Vale de Perditos	**19**
Alentejo	Beja	Mértola	A	**314**	ZCA Herdade Corcho, Tacão e outras	**1**
Alentejo	Beja	Mértola	A	**321**	ZCA Almarginho e Outras	**1**
Lisboa	Alenquer	Aldeia Gavinha	A	**366**	ZCA Aldeia Gavinha	**6**
Alentejo	Santarém	Santarém	A	**577**	ZCA de Casevel	**2**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	T	**622**	ZCT das Cortes	**1**
Norte	Porto	Póvoa do Varzim	A	**1365**	ZCA Rates	**1**
Centro	Guarda	Sabugal	A	**1512**	ZCA Benespera	**4**
Alentejo	Évora	Alandroal	A	**2128**	ZCA H Magarreiro	**2**
Algarve	Faro	Alcoutim	T	**2210**	ZCT Lotão	**1**
Alentejo	Beja	Almodôvar	T	**2405**	ZCT Herdade do Monte da Vinha	**1**
Norte	Porto	Penafiel	M	**2561**	ZCM Mouzinho	**7**
Norte	Porto	Lousada	M	**3468**	ZCM de Lousada	**2**
Norte	Viana do Castelo	Arcos de Valdevez	M	**3904**	ZCM Arcos de Valdevez	**4**
Centro	Guarda	Sabugal	A	**4103**	ZCA da Parada	**1**
Alentejo	Santarém	Benavente	T	**4855**	ZCT SAMAKI-EXPLORAÇÃO AGRICOLA E FLORESTAL, LDA.	**5**
Alentejo	Évora	Estremoz	T	**5671**	ZCT do Monte de Cima	**2**
Alentejo	Santarém	Almeirim/Santarém	M	**5850**	ZCM Arneiros de Almeirim	**1**
Alentejo	Beja	Ferreira do Alentejo	T	**5876**	ZCT da Herdade de Vale Alarve e Outras	**1**
Alentejo	Beja	Mértola	T	**5939**	ZCT Moninho	**1**
Centro	Castelo Branco	Castelo Branco	T	**6531**	ZCT da Pedra da Légua	**8**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**6838**	ZCT da Fonte do Pelingroso	**1**
Alentejo	Beja	Serpa	T	**6839**	ZCT da Furada	**3**

Alentejo	Beja	Almodôvar	T	**6894**	ZCT da Herdade da Maruta, Pardieiro e Outras	**25**
Norte	Vila Real	Alijó	N/A	**N/A**	Campo de treino de cães	**2**
Lisboa	Mafra	Mafra	N/A	**N/A**	Estrada	**1**
Lisboa	Lisboa	Monsanto	N/A	**N/A**	LxCRAS	**2**
Lisboa	Cascais	Alcabideche	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
Lisboa	Lisboa	Lumiar	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
Setúbal	Barreiro	Barreiro	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
Lisboa	Lisboa	São Domingos de Benfica	N/A	**N/A**	LxCRAS	**2**
Alentejo	Évora	Évora	N/A	**N/A**	Meio Urbano	**1**
Alentejo	Beja	Moura	N/A	**N/A**	N/A	**2**
Centro	Castelo Branco	Castelo Branco	N/A	**N/A**	N/D	**1**
Alentejo	Évora	Évora	N/A	**N/A**	Parque Leilões de Gado da Malagueira e Horta da Porta	**1**
Alentejo	Évora	Évora	N/A	**N/A**	Quinta Nova de Vale Bom	**2**
Alentejo	Beja	Beja	N/A	**N/A**	ICNF - Nuno Neves	**1**
LVT	Setúbal	Montijo/ Infantado	N/A	**N/A**	Particular - Fábio A. Santos	**1**
Norte	Bragança	Vila Flor/Nabo	N/A	**N/A**	Particular - William Calvo	**1**
Alentejo	Santarém	Chamusca/Monte da Chamusca	N/A	**N/A**	s/ descrição	**1**
LVT	Setúbal	Palmela/Pinhal Novo	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
LVT	Lisboa	Oeiras/Linda-a-velha	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
Lisboa	Sintra	Sintra	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
LVT	Lisboa	Sintra/Algueirão	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
LVT	Lisboa	Lisboa	N/A	**N/A**	LxCRAS	**1**
Alentejo	Beja	Alvito/Vila Nova de Baronia	N/A	**N/A**	FENCAÇA - Vasco Sequeira	1
Alentejo	Beja	Moura	N/A	**N/A**	Particular - Fábio A. Santos	**1**
Total						**169**

Anexo III

Protocolo de Monitorização das Populações Naturais de Coelho-bravo e Lebre

Ficha de Contagem Direta de Animais por Distância -Reformulada

	Contagens por distâncias						Contagens de excrementos		
	Por amostragem		Anual		Custo médio aproximado/ano		Por amostragem	Anual	Custo médio aproximado/ano
	2 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	3 réplicas			
Nº observadores	2	2	-	-	-	-	2	-	1200€
Nº dias[1]	2	3	4	6	200€	300€	1	12	
Horas(4h)*pessoa	8	12	16	24			16	192	
Nº deslocações até à zona de caça[2]	2	3	4	6	40€	60€	1	12	122€
Kms percorridos na zona de caça[3]	16-24	24-36	32-48	48-72	13€	20€	0	0	0
Total	**-**	**-**	**-**	**-**	**253€**	**380€**	**-**	**-**	**1322€**

+COELHO

Avaliacão Ecossanitária das Populacões Naturais de Coelho-bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral *financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.*

PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES NATURAIS DE COELHO-BRAVO E LEBRE

De modo a avaliar a evolução e as flutuações das populações naturais de Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e de Lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) ao longo do tempo, foi definido um método de amostragem a realizar em cada uma das áreas de estudo (zonas de caça) definidas.
A amostragem conta assim com a realização de um método amostragem indireto, através da Contagens Direta de Animais por Distâncias (*Distance Sampling*) em percurso pré-definido, diferindo ligeiramente a metodologia consoante a espécie: Coelho-bravo e Lebre-ibérica.

1. Amostragem das populações de Coelho-bravo

Metodologia

Implementação no terreno

a. Definir na área de estudo (Zona de Caça) um percurso entre 8 a 12 km de forma a amostrar zonas com disponibilidade de coelho, e que seja representativo da área de estudo (fig. 1);

b. O percurso deve ser gravado num GPS de modo a que seja replicado de forma igual em todas as amostragens.

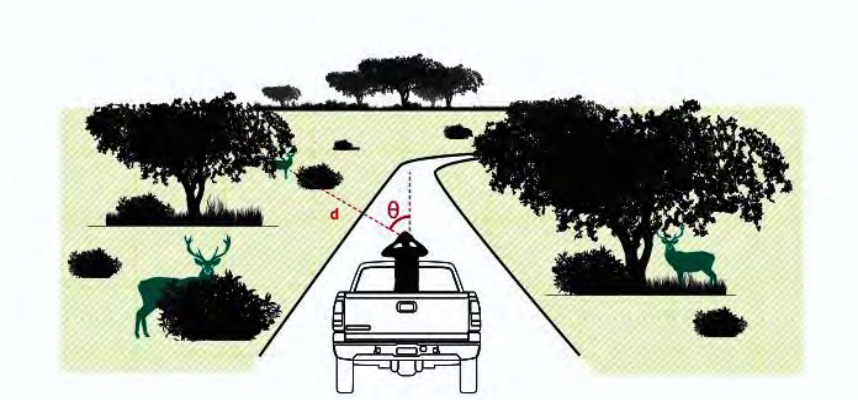


Figura 1 – Representação esquemática da realização do método de amostragem da densidade através da contagem direta de animais em percurso de 8-12km.

Amostragem bianual (com 3 réplicas)

a. As amostragens devem-se realizar duas vezes ao ano de preferência em janeiro/fevereiro e em julho/agosto;

b. O percurso definido para a realização das contagens deve ser o mesmo em todas as amostragens e réplicas, sendo este iniciado e finalizando sempre no mesmo local;

c. O percurso deverá ser realizado mensalmente e efetuado ao amanhecer, iniciando-se sempre à hora do nascer do sol (ter em atenção que a hora varia de mês para mês);

d. Em cada amostragem deverão ser efetuadas **três réplicas** do mesmo percurso de preferência em dias consecutivos;

e. O percurso deverá ser efetuado por dois observadores em viatura de todo-terreno: um observador que deverá conduzir a viatura ao longo do percurso a uma velocidade de cerca de 10 km/h, e outro observador que se localiza na parte traseira da viatura (caixa aberta), que deverá registar as observações efetuadas (figura 1);

f. No início de cada percurso o conta-quilómetros do carro deverá ser posto a zero;

g. Para cada coelho observado dever-se-á registar: i) a distância marcada no conta-quilómetros do carro, ii) o número de animais observado, na coluna correspondente à distância perpendicular do animal ao caminho, iii) as condições climatéricas, iv) e observações que considerem relevantes. Deverão ser registadas também todas as espécies de mamíferos observadas (presas e predadores) (Ver Anexo para recolha dos dados na aplicação);

h. Os registos de campo deverão ser efetuados através do software Epicollect5 para smatphones ou tablets (ver Anexo).

i. Os dados serão atualizados automaticamente na plataforma do Epicollect5. Contudo, caso não seja possível recolher os dados na aplicação, estes deverão ser enviados todos os meses para maiscoelho@iniav.pt com conhecimento para anaserronha@cibio.up.pt e pmonterroso@cibio.up.pt.

2. Amostragem das populações de Lebre-ibérica (amostragem piloto)

Metodologia

Implementação no terreno

a. Definir na área de estudo (Zona de Caça) um percurso entre 8 a 12 km de forma a amostrar zonas com presença de lebre, que seja representativo da área de estudo e em que prevaleça o habitat preferencial da espécie (áreas abertas: ex. pastagens, áreas cerealíferas; e de ecótono);

b. O percurso deve ser gravado num GPS de modo a que seja replicado de forma igual em todas as amostragens.

Amostragem bianual (com 4 réplicas realizadas em 2 dias)

a. A amostragem deve-se realizar duas vezes ao ano de preferência em janeiro/fevereiro (após época venatória) e em julho/agosto (após pico de reprodução);

b. O percurso definido para a realização das contagens deve ser o mesmo em todas as amostragens e réplicas, sendo este iniciado e finalizando sempre no mesmo local;

c. O percurso deverá ser iniciado 30min antes do por do sol. No final do percurso deve-se esperar 1h e realizar seguidamente o percurso de volta, perfazendo assim duas réplicas do mesmo percurso (uma ao anoitecer e outra já de noite).

d. Em cada época (janeiro/fevereiro e julho/agosto) a amostragem deverá realizar-se durante dois dias, de preferência consecutivos, realizando-se **4 réplicas** do mesmo percurso como o descrito na alínea c);

e. O percurso deverá ser efetuado por dois observadores em viatura de todo-terreno: um observador que deverá conduzir a viatura ao longo do percurso a uma velocidade de cerca de 10 km/h, e outro observador que se localiza na parte traseira da viatura (caixa aberta), que deverá registar as observações efetuadas com recurso a um foco (figura 1);

f. No início de cada percurso o conta-quilómetros do carro deverá ser posto a zero;

g. Para cada lebre-ibérica observada dever-se-á registar: i) a distância marcada no conta-quilómetros do carro, ii) o número de animais observado, na coluna correspondente à distância perpendicular do animal ao caminho, iii) as condições climatéricas, iv) e observações que considerem relevantes. Deverão ser registadas também todas as espécies de mamíferos observadas (presas e predadores) (Ver Anexo para recolha dos dados na aplicação);

h. Os registos de campo deverão ser efetuados através do software Epicollect para smatphones ou tablets (ver Anexo).

j. Os dados serão atualizados automaticamente na plataforma do Epicollect5. Contudo, caso não seja possível recolher os dados na aplicação, estes deverão ser enviados todos os meses para maiscoelho@iniav.pt com conhecimento para anaserronha@cibio.up.pt e pmonterroso@cibio.up.pt.

Anexo IV-A

Relatório do Ensaio de Palatibilidade com a Ração +Coelho

PROJETO +COELHO

RELATÓRIO

do

ENSAIO de PALATIBILIDADE com a Ração +Coelho, formulada para coelho-bravo, contendo diferentes aromatizantes

(A-Tomilho, B-Fenacho, C-Anis)



Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

ICNF
Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

MARÇO 2019

RELATÓRIO ELABORADO POR: **Grupo +Coelho**

CRONOGRAMA DOS EVENTOS QUE ANTECEDERAM O ENSAIO

01.01.2018 — ***Resultados das Avaliações Sanitárias do 1º ano do Projeto +Coelho, revelaram elevado parasitismo em algumas ZC e fraca condição corporal dos animais***

Identificada a oportunidade de melhorar a condição geral dos animais através do desenvolvimento de uma Ração;
Identificada a necessidade de tornar a Ração apelativa para o coelho-bravo através da incorporação de aromatizantes.

19.02.2018 — ***Reunião do Grupo +Coelho com a IACA***

Grupo +Coelho desafia IACA para o desenvolvimento de uma Ração formulada especificamente para coelho-bravo

08.03.2018 — ***Reunião do Grupo +Coelho com a IACA e os seus Associados***

Grupo +Coelho reúne com a IACA e alguns dos seus Associados

12.03.2018 — ***Reunião Geral [INIAV/DGAV/ICNF/OSCS/IACA/Associados]***

É definido o enquadramento legal para a comercialização da Ração +Coelho, no âmbito do Projeto homónimo;
São definidas também as ZC habilitadas a realizar os ensaios.

Fevereiro 2018 — **Definição da Formulação da Ração entre os Associados da IACA**

Acordada a formulação para uniformizar a produção nas varias fábricas.

Julho 2018 — **Produzidos 3 lotes distintos de Ração +Coelho**

23.07.2018 — **Venda e distribuição das Rações +Coelho às OSCs**

05.08.2018 — **Distribuição das Rações aos associados de cada OSC**

01.08.2018 — **Inicio dos *Ensaios de Palatibilidade* em sete Zonas de Caça**

30.10.2018 — **Conclusão dos *Ensaios de Palatibilidade***

29.10.2018 a 14.03.2019 — **Envio dos Resultados para o INIAV**

17.03.2019 a 24.03.2019 — **Análise dos resultados e elaboração do presente Relatório**

ENTIDADES PARTICIPANTES NO ENSAIO

- ✓ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV);
  [Margarida Duarte, Mónica Cunha, Nuno Canada]
- ✓ Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV);
  [Yolanda Vaz, Rita Amador, José Manuel Costa, Maria João Fradinho]
- ✓ Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF);
  [Gonçalo Lopes, Ana Hora]
- ✓ Federação Portuguesa de Caçadores (FENCAÇA);
  [Jacinto Amaro, Jorge Maia]
- ✓ Associação Nacional de Proprietários Rurais e Biodiversidade (ANPC);
  [João Carvalho, António Paula Soares, Sebastião Miguel]
- ✓ Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP);
  [Fernando Castanheira-Pinto, José Bernardino, Alexandre Matos, António Moreira, António Lourenço]
- ✓ Associação dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA);
  [Ana Monteiro, Jaime Piçarra]
- ✓ Rações Zêzere S.A.;
  [Rui Fortunato]
- ✓ De Heus Nutrição Animal, S.A.;
  [Candida Cruz]
- ✓ Sorgal - Sociedade de Óleos e Rações, S.A.;
  [José Vieira]
- ✓ Rico Gado Nutrição S.A..
  [Luís Ruivo]

SÚMULA do RELATÓRIO do ENSAIO de PALATIBILIDADE com a Ração +Coelho contendo diferentes aromatizantes; A-Tomilho, B-Fenacho e C-Anis

Objetivo: *Avaliação do impacto da incorporação de aromatizantes (Tomilho, Fenacho ou Anis) numa ração especificamente formulada para coelho-bravo no que toca à preferência de sete populações de coelho-bravo. Os ensaios foram conduzidos entre agosto e outubro de 2018 de forma cega, tendo para isso sido atribuído um código a cada uma das três rações (A, B e C). A correspondência entre estas três designações e os aromatizantes foi sigilosa até à elaboração deste relatório.*

Resultados: *Em seis das sete Zonas de Caça que participaram no ensaio, a Ração A (contendo Tomilho) foi ingerida mais rapidamente pelos animais. Contudo, numa Zona de Caça localizada na região Centro, a Ração C (contendo Anis) foi a preferida pelos animais.*

Conclusões: *Dos três aromatizantes testados, o Tomilho constitui o aromatizante mais atrativo para as populações de coelho-bravo quando comparado com o Fenacho ou com o Anis. Não obstante a preferência do Tomilho em 6 dos 7 ensaios (85.7%), é importante salvaguardar que esta preferência pode variar em função das condições naturais e hábitos alimentares das populações em causa.*

1. OBJECTIVO DO ENSAIO

Identificar qual de três Rações (A, B ou C), produzidas com idêntica formulação mas diferindo no aromatizante adicionado, é mais apelativa para o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*). Em cada uma das Rações foi incorporado um aromatizante específico, nomeadamente: Tomilho (*Thymus vulgaris*), Anis (*Pimpinella anisum*) e Fenacho (*Trigonella foenum-graecum*).

2. OUTCOMES EXPECTÁVEIS

Com o desenvolvimento de um alimento composto não-medicamentoso, pretende-se dispor de uma Ração adequada ao coelho-bravo, que permita complementar a alimentação destas populações silvestres em função das suas necessidades específicas derivantes da disponibilidade de alimento nos distintos habitats das Zonas de Caça aderentes ao Projeto +Coelho. Pretende-se esclarecer se este complemento constitui uma ajuda efetiva para a melhoria da condição física dos animais e, consequentemente, do seu estatuto sanitário acelerando a recuperação das populações.

Prevê-se que este alimento não-medicamentoso seja futuramente distribuído em regiões onde a indisponibilidade ou escassez de alimento seja reconhecida pelos gestores das zonas de caça como um fator limitante na recuperação das populações.
Pretende-se ainda que este alimento composto permita veicular i) antiparasitários, cuja administração se prevê ser iniciada num futuro próximo, e mais tarde também ii) uma vacina oral contra a DHV (uma das medidas do projeto +Coelho enquadrada no eixo de investigação), para o que será necessário assegurar um elevado índice de ingestão da ração, particularmente quando se verificarem condições de abundância de outros alimentos naturais.

3. FUNDAMENTO DO ENSAIO

Os resultados da avaliação sanitária de leporídeos que decorreu na época venatória 2017/2018, revelaram uma heterogeneidade significativa da condição corporal dos animais caçados e dos cadáveres amostrados, bem como elevadas cargas parasitárias intestinais em animais provenientes de algumas das 40 zonas de caça aderentes ao projeto +Coelho. Os resultados da avaliação parasitológica efetuada no 1ºano de Projeto são descritos no Relatório de Atividades da Época cinegética 2017-2018.

Os parceiros do projeto +Coelho consideraram, por isso, importante complementar a alimentação em função das necessidades, apetências e disponibilidades do habitat das espécies alvo, por forma a melhorar a condição física dos animais debilitados e, consequentemente, a resposta imunitária aos vários agentes patogénicos em circulação. Esta medida, já adotada isoladamente por algumas zonas de caça, quando aplicada à escala nacional, permitirá concertar e sincronizar esforços potenciando os seus efeitos.

4. ENQUADRAMENTO DO ENSAIO NO PROJETO +COELHO

A suplementação de alimento quando a disponibilidade de alimento natural e insuficiente, ou inexistente, pode ser decisiva no atual contexto ecológico que a espécie coelho-bravo atravessa, que inclui epizootias e um cenário de alterações climáticas, com períodos de seca extrema, como se verificou em 2017.

Embora a produção de uma Ração especificamente formulada para coelho-bravo não estivesse inicialmente prevista na Memória Descritiva do 1º ano do Projeto +Coelho, este ensaio foi enquadrado no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral do Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) (financiado pelo Fundo Florestal Permanente através do projeto "+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral").
A aquisição dos lotes de Ração foi, por isso, suportada pelas organizações do Sector da Caça (OSCs), por forma a iniciar os ensaios antes do segundo ano de Projeto.
A avaliação da Palatibilidade das Rações está prevista na Memória Descritiva do 2º ano do Projeto +Coelho, através do projeto "+Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal".

5. ENQUADRAMENTO LEGAL DAS ATIVIDADES ENVOLVIDAS NO ENSAIO

As três OSCs de 1º nível (ANPC, CNCP e FENCAÇA), foram legalmente habilitadas para distribuírem este alimento (não-medicamentoso nesta fase), através de protocolo estabelecido com a Divisão de Alimentação Animal da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) no âmbito da valoração experimental dos alimentos medicamentosos (Artigo 12º e Artigo 18º do Decreto-Lei 151/2005 de 30 de agosto).

6. TIPO DE ALIMENTO EM TESTE

Alimento composto não-medicamentoso, com uma formulação específica adequada ao coelho-bravo, para suplementação em contexto de vida livre. A composição deste alimento foi acordada entre os fabricantes por forma a i) satisfazer as necessidades do coelho-bravo em termos de aporte calórico, de fibra, vitamínicas e oligoelementos, mas também para ii) garantir a homogeneização da produção nas várias fábricas envolvidas neste Projeto.
Através da suplementação alimentar com este alimento especificamente formulado e adequado às populações silvestres, em particular nas áreas onde a escassez de alimento seja um fator claramente limitador do restabelecimento destas populações, será espectável o aceleramento da recuperação das populações de coelho-bravo.

7. IDENTIFICAÇÃO DO ALIMENTO COMPOSTO

As embalagens do alimento composto produzidas para este Ensaio, foram identificadas com o logotipo do projeto +Coelho, e com a indicação "*Alimento produzido no âmbito do Projeto + Coelho*". Foram apenas distribuídas aos gestores de Zonas de Caça aderentes àquele projeto.

8. ZONAS DE CAÇA PARTICIPANTES NO ENSAIO DE PALATIBILIDADE DA RAÇÃO +COELHO E SUA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

As OSC de 1º nível Identificaram 14 Zonas de Caça (Tabela 1) com características e condições adequadas à realização dos ensaios de palatibilidade. Destas, foram selecionadas 7 (a negrito na Tabela 1) onde decorreram os ensaios.

Tabela 1. Lista das Potenciais Zonas de Caça identificadas pelas OSCs para realização do Ensaio de Palatibilidade. A negrito estão identificadas as 7 zonas de caça selecionadas para realização dos ensaios.

OSC	ZONA DE CAÇA	Distrito
ANPC	**ZCT SAMAKI-Exploração Agrícola e Florestal, LDA. (4855), Infantado, Benavente, Santarém, Alentejo**	Santarém
ANPC	ZCT de Roubão, Braço de Prata e Outras (66), Companhia das Lezírias, Benavente, Santarém	Santarém
ANPC	ZCT Várzea (385), Ponte de Sôr, Portalegre	Portalegre
ANPC	ZCT das Cortes (622), Ferreira do Alentejo, Beja	Beja
ANPC	ZCT da Pedra da Légua (6531), Alcains	Alcains
FENCAÇA	**ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras (4)*, Casa Branca, Mora, Évora**	Évora
FENCAÇA	**ZCT do Monte de Cima (5671), Evoramonte, Estremoz, Évora**	Évora
FENCAÇA	**ZCM Mouzinho (2561), Canelas, Penafiel**	Penafiel
CNCP	**ZCA Benespera (1512), Sabugal, Guarda**	Guarda
CNCP	ZCT Moninho (5939), Mértola, Beja	Beja
CNCP	**ZCM Lousada (3468), Porto**	Porto
CNCP	**ZCT H da Maruta (6894), Almodôvar, Beja**	Beja

As localizações geográficas das Zonas de Caça participantes estão assinaladas na Figura 1.

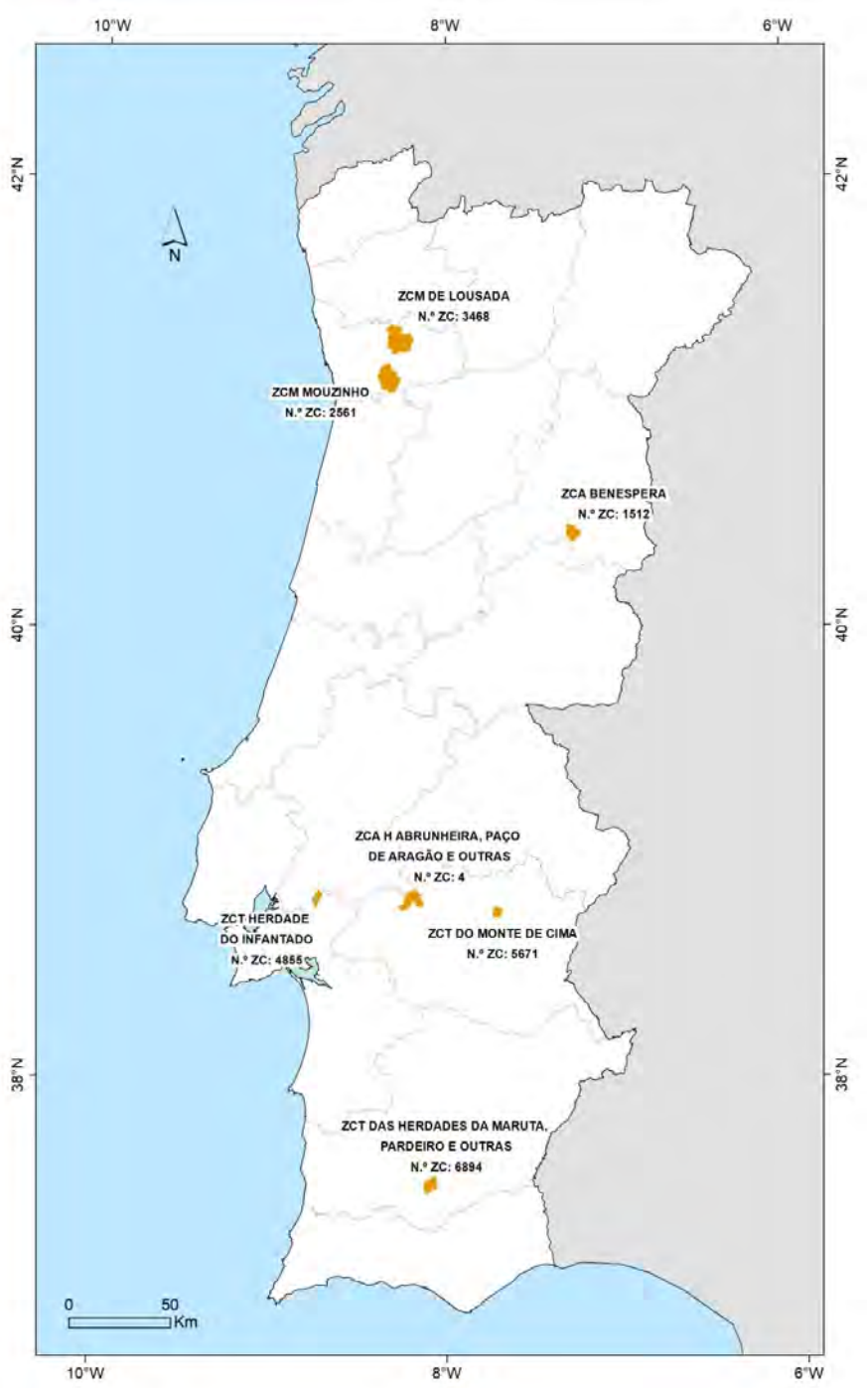


Figura 1. Localização geográfica das Zonas de Caça onde decorreram os *Ensaios de Palatibilidade (mapa de João Fernandes, Departamento de Logística e Sistemas de Informação, INIAV)*.

9. CARACTERISTICAS DOS ENSAIOS, DOS LOCAIS DE ENSAIO, DO NÚMERO DE ANIMAIS EM TESTE E DA DURAÇÃO DOS ENSAIOS

Todos os ensaios foram conduzidos de forma cega, na medida em que era desconhecida a correspondência entre o código atribuído a cada uma das três rações (A, B e C) e a presença/ausência, ou a natureza, do aromatizante incorporado. A identificação dos aromatizantes adicionados às Rações A, B e C, só foi revelada na fase final da elaboração deste relatório.

Tabela 2. Código de correspondência entre as Rações A, B e C e os aromatizantes nestas contido

Ração	*Aromatizante*	*Fornecedor do aromatizante*
A	*Tomilho**	*TNA*
B	*Fenacho*	*Nutrinova*
C	*Anis*	*Pintalubas*

* Aromatizante normalmente utilizado nas rações para coelho pelas Rações Zêzere

Os ensaios decorreram em dois tipos de cenário, nomeadamente em cercados de reprodução, no caso de 3 dos ensaios, e em condições de vida livre para os restantes 4 ensaios. As características dos locais em termos de áreas e disponibilidade natural de alimento, estão descritas na Tabela 3.

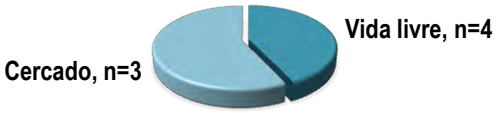


Figura 2. Proporção dos dois tipos de locais (Cercado de Reprodução ou Áreas livres) nos 7 locais onde decorreram os *Ensaios de Palatibilidade*

No contexto destes ensaios, não foi avaliada a influência da presença de alimentos alternativos, naturalmente disponíveis ou fabricados e fornecidos concomitantemente, na taxa de consumo das três Rações.

Tabela 3. Alimentos alternativos disponíveis nos locais onde decorreram os Ensaios

Zonas de Caça	**Distrito**	**Tipo de Local**	**Área aproximada (ha)**	**Outros Alimentos Disponíveis durante o Ensaio**	
				Naturais	**Artificiais**
ZCT SAMAKI-Exploração Agrícola e Florestal, LDA. (4855)	Santarém	Vida livre	800	Bolota, erva espontânea, sementeiras	Nenhum
ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras (4)	Évora	Vida livre	1	Erva expontanea	Ração de Vitela
ZCT do Monte de Cima (5671)	Évora	Vida livre	1	Erva expontanea	Nenhum
ZCM Mouzinho (2561)	Penafiel	Cercado de Reprodução	0,5	Pastos permanentes (aveia e centeio)	Nenhum
ZCA Benespera (1512)	Porto	Cercado de Reprodução	1	Nenhum	Ração Provimi; Mistura de Cereais
ZCM Lousada (3468)	Porto	Cercado de Reprodução	1	Matos, giestas, erva	Nenhum
ZCT H da Maruta (6894)	Beja	Vida Livre, áreas distintas	17 (7+3+7)	Erva espontânea, alguma bolota, semeadas de aveia	Nenhum

Uma vez que todos os ensaios decorreram no período compreendido entre os dois últimos meses do Verão e o primeiro mês do Outono, é expectável que a disponibilidade de alimento natural fosse mais reduzida, favorecendo o consumo das Rações. Assim, a oferta de outros alimentos alternativos, poderá ter simulado situações de maior abundância, consolidando a identificação do aromatizante com maior eficácia.

O número médio de animais em cada ensaio foi de 151 animais, variando entre 15 (ZCM da Lousada) e 600 (ZCT Samaki) (Figura 3).

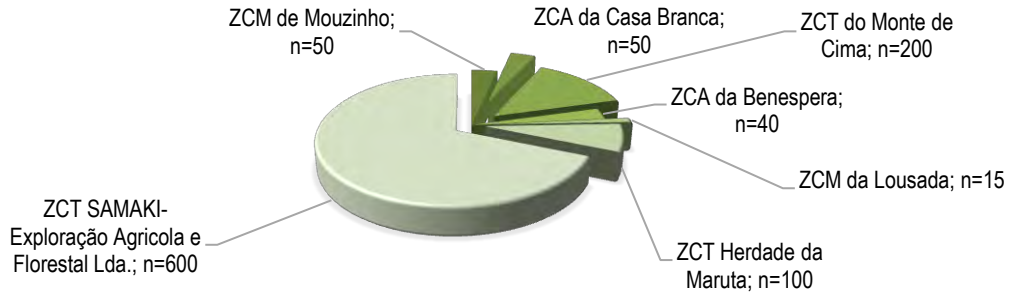


Figura 3. Número estimado de espécimes de coelho-bravo por ZC envolvidos nos *Ensaios de Palatibilidade*

Os sete *Ensaios de Palatibilidade* foram conduzidos entre agosto de 2018 e outubro de 2018 (3 meses). A duração média dos ensaios foi de 64 dias, variando entre de 49 (1,6 meses) a 90 dias (3 meses) (Figura 4).

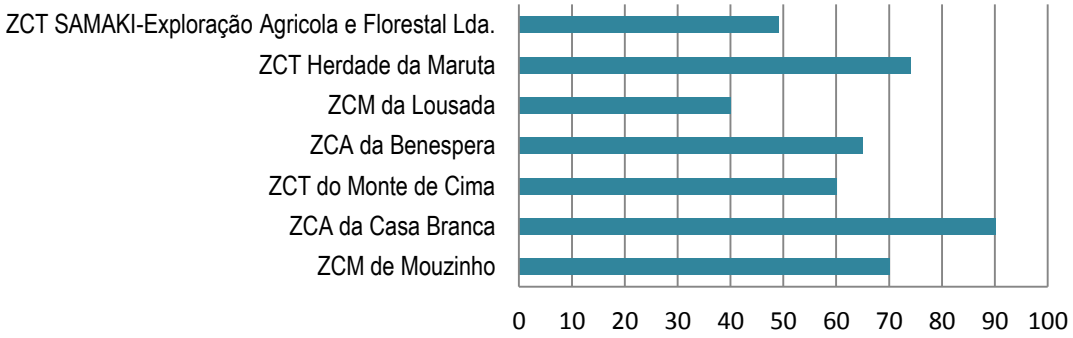


Figura 4. Duração dos *Ensaios de Palatibilidade,* em dias, nas sete ZC selecionadas

10. QUANTIDADE DE ALIMENTO DISPONIBILIZADO POR ENSAIO

Cada OSC adquiriu cerca de 1 tonelada de ração, compreendendo partes iguais das três variedades (A, B e C).

A distribuição da ração aos seus associados foi assegurada pelos responsáveis das OSCs. Cinco ensaios foram efetuados com 90 Kg de cada Ração. Contudo, o Ensaio da ZCT Samaki, conduzido em condições de vida livre e envolvendo 600 animais, foi efetuado com 210 Kg de cada Ração. O ensaio conduzido na ZCM da Lousada compreendeu um total de 75 Kg (25 Kg de cada) (Figura 5).

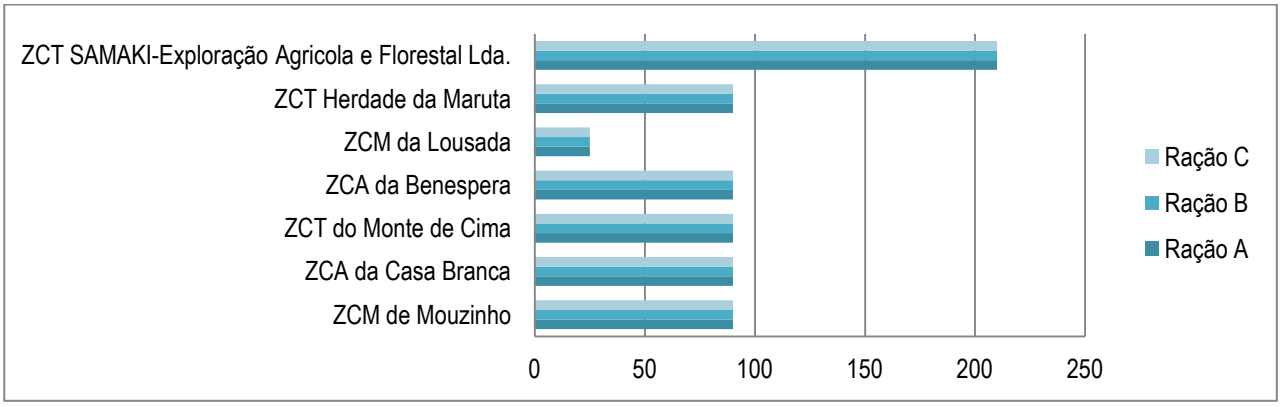


Figura 5. Quantidade total de cada uma das três Rações utilizada/disponível para os 7 Ensaios (Kg).

As quantidades de cada uma das 3 Rações disponibilizadas semanalmente variaram entre 5 e 30 Kg (Figura 6).

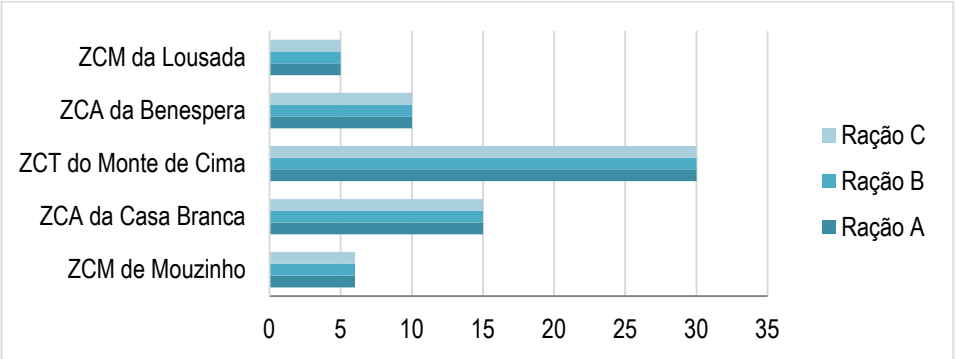


Figura 6. Quantidade das Rações A, B e C, em Kg, disponibilizada semanalmente na Abordagem metodológica 1 (Ponto 14). Nota: A ZCT da Maruta e a ZCT SAMAKI não estão representadas neste gráfico pois não disponibilizaram quantidades fixas semanalmente.

11. PERIODICIDADE DA VERIFICAÇÃO DO CONSUMO

A verificação/avaliação do consumo de Ração foi semanal em seis dos locais de Ensaios, e bissemanal em um dos locais (ZCA da Maruta).

12. NÚMERO DE ALIMENTADORES UTILIZADOS E DISTANCIAMENTO ENTRE ALIMENTADORES

Cada uma das três rações foi colocada num de três contentores posicionados lado a lado, ou em vizinhança muito próxima (0,01 a 0,5 m), para que a preferência de consumo de cada ração não fosse afetada por outras variáveis, como por exemplo localização mais privilegiada ou menor exposição a predação.
O número de alimentadores utilizados em cada um dos Ensaios está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Número de alimentadores e distância entre os alimentadores em cada um dos locais de teste.

ZONA DE CAÇA	Distância entre as 3 Rações no mesmo alimentador (m)	Nº de Alimentadores disponibilizados	Distância entre alimentadores (m)
ZCT SAMAKI-Exploração Agricola e Florestal, LDA. (4855), Infantado, Benavente, Santarém	0,02	5*	500
ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras (4), Casa Branca, Mora, Évora	1 tipo de ração/alimentador	9	500
ZCT do Monte de Cima (5671), Evoramonte, Estremoz, Évora	1 tipo de ração/alimentador	9	500
ZCM Mouzinho (2561), Canelas, Penafiel	0,5	12 (3 alimentadores em cada uma de 4 divisões)	Não aplicável por serem 4 áreas independentes
ZCA Benespera (1512), Sabugal, Guarda	0,05	3*	≈50
ZCM Lousada (3468), Porto	0,010	4*	4-5
ZCT H da Maruta (6894) Almodôvar, Beja	0,05	3*	120 (Comedor 1 e 3) e 300 (Comedor 2 e 3)

*No alimentador foram disponibilizadas simultânea, mas separadamente, as 3 rações

13. TEMPO DE ADAPTAÇÃO À RAÇÃO

O período de adaptação (algo subjetivo, Tabela 5) variou entre 0 dias e >120 dias, ie superior ao período de teste (Figura 4). Curiosamente, em locais onde os animais já estavam habituados a uma ração antes da realização do Ensaio (ZCT Samaki), foi necessário um período de adaptação maior para que aceitassem as Rações +Coelho. A Proporção das populações de coelho-bravo submetidas ao Ensaios que tiveram contacto prévio com algum tipo de Ração é ilustrada na Figura 7.

Tabela 5. Tempo de Adaptação à Ração +Coelho em cada uma das 7 ZC.

OSC	ZONA DE CAÇA	Tempo de adaptação
ANPC	ZCT Samaki-Exploração Agrícola e Florestal, Lda. (4855), Infantado, Benavente, Santarém, Alentejo	Não se chegaram a adaptar completamente
FENCAÇA	ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras (4), Casa Branca, Mora, Évora	0 dia (Imediata)
FENCAÇA	ZCT do Monte de Cima (5671), Evoramonte, Estremoz, Évora	2 dias
FENCAÇA	ZCM Mouzinho (2561), Canelas, Penafiel	0 dia (Imediata)
CNCP	ZCA Benespera (1512), Sabugal, Guarda, Porto	7dias
CNCP	ZCM Lousada (3468), Porto	0 dias (imediata)
CNCP	ZCT H da Maruta (6894) Almodôvar, Beja	2 dias (Ração A); >8 dias para a Ração B; >22 dias para a Ração C

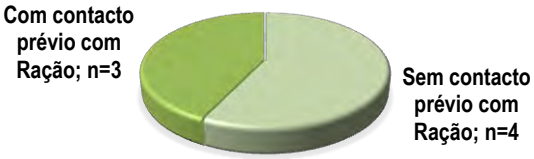


Figura 7. Proporção das populações de coelho-bravo submetidas ao Ensaios que tiveram contacto prévio com algum tipo de Ração

14. ESTRATÉGIAS METODOLOGICAS ADOTADAS PARA ESTIMAR O CONSUMO DIFERENCIAL DAS TRÊS RAÇÕES

Os propósitos do ensaio e as estratégias metodológicas foram discutidos em reunião de março de 2018 onde estiveram presentes os representantes das 3 OSCs.
Dada a heterogeneidade das condições dos locais onde os ensaios iriam ser realizados, foi percetível que as abordagens seguidas pelos Responsáveis pelos ensaios seriam diferentes e ajustadas a esta diversidade.
Para que o procedimento a seguir se adequasse à realidade do campo, foi acordado que este seria elaborado por um dos representantes das OSCs. No entanto, uma vez que este procedimento não chegou a ser concebido e divulgado pelos responsáveis dos ensaios, foi mais tarde elaborada e disponibilizada uma Ficha de Registo (revista por todos os parceiros e reenviada a 31.10.2018), por forma a reunir a informação obtida nos vários ensaios de uma forma mais sistematizada e uniformizada.
Durante os sete ensaios, as três rações foram colocadas lado a lado em todos os alimentadores, *ad libitum*.

Metodologia 1 - *adotada nos ensaios da ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras, da ZCT do Monte de Cima, da ZCM Mouzinho e da ZCM Lousada*

Esta abordagem consistiu na disponibilização de quantidades conhecidas e idênticas de cada uma das 3 rações (A, B e C) em simultâneo e no mesmo local, às populações silvestres de coelho-bravo. Através de pesagens do remanescente de cada uma das 3 rações foi possível determinar o respetivo consumo, e consequentemente qual das Rações foi a preferida pelos animais. Esta metodologia foi seguida em 5 dos sete ensaios e os resultados estão representados na Figura 8.

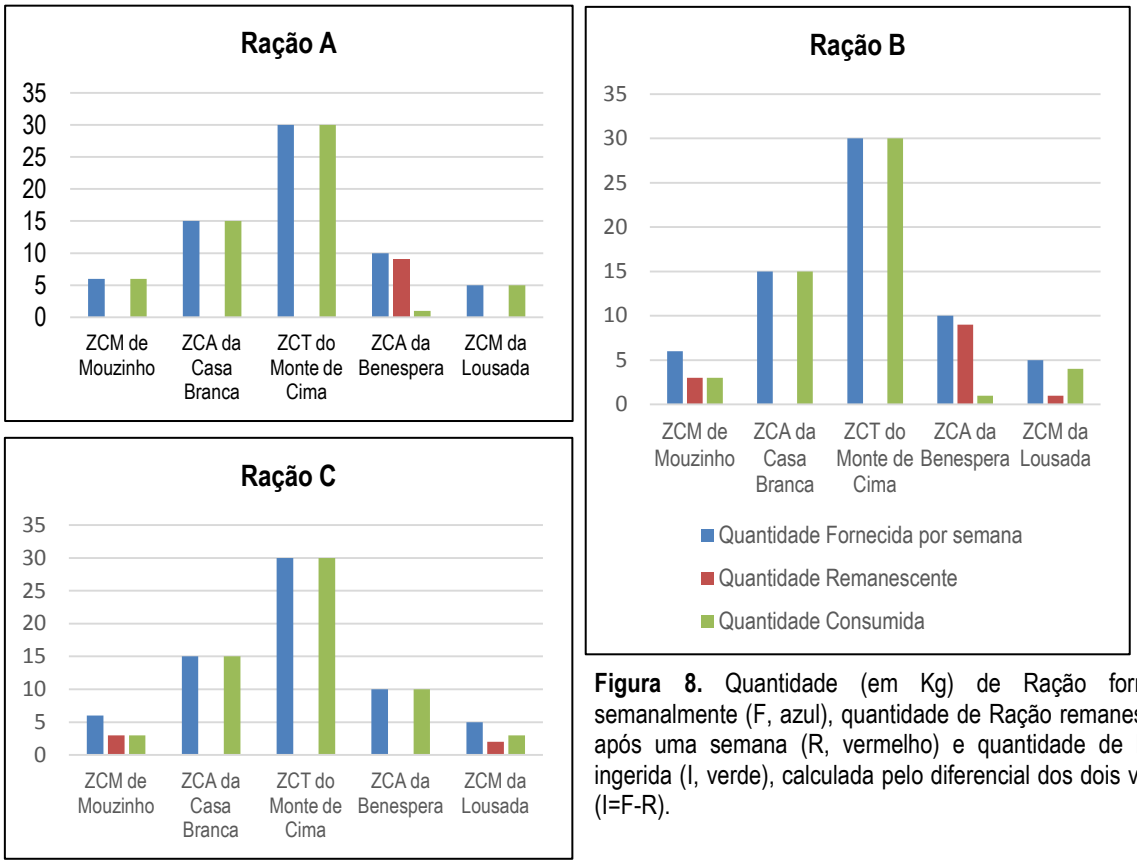


Figura 8. Quantidade (em Kg) de Ração fornecida semanalmente (F, azul), quantidade de Ração remanescente após uma semana (R, vermelho) e quantidade de Ração ingerida (I, verde), calculada pelo diferencial dos dois valores (I=F-R).

Embora não tenha havido Ração remanescente nos ensaios efetuados na ZCA da Casa Branca e na ZCT do Monte de Cima, uma vez que as três Rações foram consumidas no espaço de uma semana (Figura 9), os Responsáveis pelos Ensaios registaram um consumo mais rápido da Ração A.

Metodologia *2 - adotada nos ensaios realizados na ZCA da Maruta e na ZCT SAMAKI*

Duas Zonas de Caça adotaram uma metodologia que consistiu na adição sequencial de quantidades variáveis, mas conhecidas, das três Rações, de acordo com a taxa de consumo.

No caso da ZCT Herdade da Maruta, os 90 Kg de cada ração encontravam-se totalmente consumidos ao dia 37º no caso da Ração A, ao dia 58º no caso da Ração B e ao dia 75º no caso da Ração C (Figura 9), correspondendo naturalmente a uma preferência pela Ração A, seguida da Ração B.

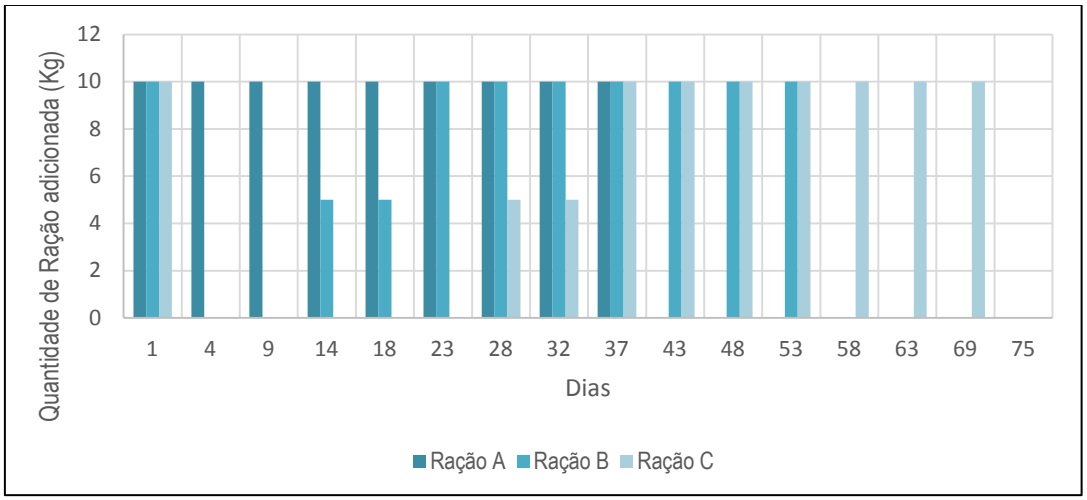


Figura 9. Quantidade adicionada de cada uma das três Rações, disponibilizada de acordo com o consumo (Kg).

Na ZCT Samaki-Exploração Agrícola e Florestal, Lda. foram utilizados 4 alimentadores com a capacidade para 30 Kg, posicionados em locais com condições distintas, nomeadamente:

i) proximidade de zonas de sementeiras (Comedouro #10);
ii) zona de mato denso (Comedouro #6);
iii) zona com um pio de água (Comedouro # 7);
iv) zona completamente seca (Comedouro #9).

Na Figura 10 apresentam-se os abastecimentos dos quatro comedouros ao longo do ensaio. Os abastecimentos foram interrompidos quando a quantidade de Ração disponível já não era suficiente para repor os 4 comedouros (31º dia para a Ração A).
O abastecimento mais frequente com a Ração A (200 Kg abastecidos até ao 24º dia), revela a preferência dos animais. A Ração B foi a menos consumida, visível no menor consumo total que atingiu apenas os 68 Kg de Ração. Verificou-se um consumo maior de Ração A no Comedouro #6 (60 Kg), correspondente a zona de mato denso, onde a disponibilidade de alimento natural é menor.

Tabela 6. Abastecimento total (em Kg) dos 4 comedouros do Ensaio na ZCT SAMAKI

	Ração A (kg)	**Ração B (kg)**	**Ração C(kg)**	Total (kg)
Comedouro #6	60	18	20	149
Comedouro #7	45	16	17	137
Comedouro#9	48	17	18	134
Comedouro 10	47	17	18	128
Total(kg)	**200**	**68**	**73**	**548**

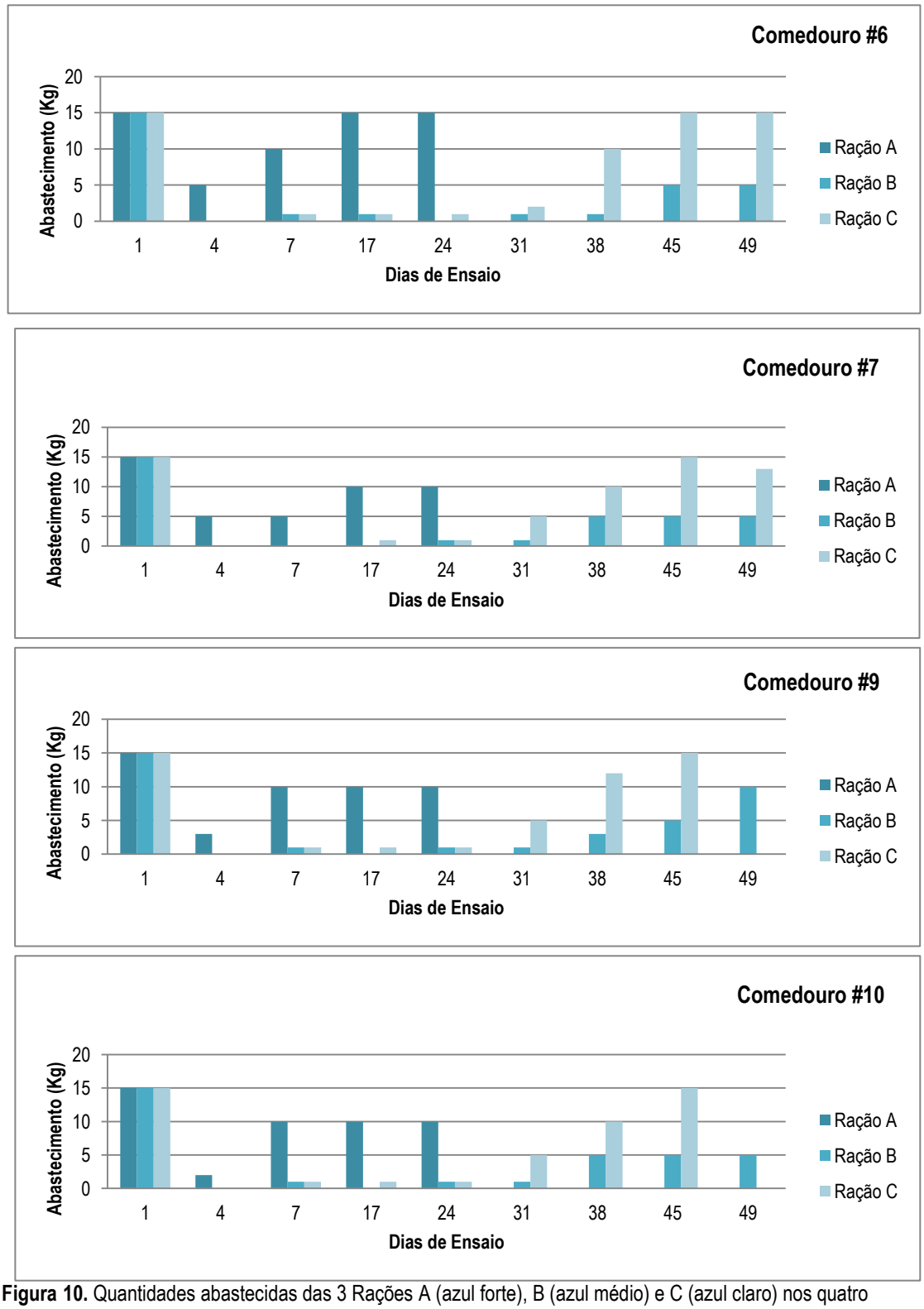


Figura 10. Quantidades abastecidas das 3 Rações A (azul forte), B (azul médio) e C (azul claro) nos quatro comedouros (#6, #7, #9, #10) ao longo dos 49 dias de ensaio.

Também neste caso os animais estavam habituados a uma ração comercial para coelhos (Valouro) com diferente formulação, o que pode ter dificultado a aceitação das rações em teste.



Figura 11. Fotos capturadas durante o Ensaio na ZCT Samaki.

Em 2 dos 7 ensaios foram ainda incluídas outras rações, que não as rações +Coelho, nomeadamente;

- ✓ uma Ração Comercial para Vitelos, com elevado teor proteico, muito apreciada pelos coelhos-bravos e a primeira a ser consumida;
- ✓ uma Ração Comercial para coelho doméstico (*Provimi Super Coelho)*, habitualmente oferecida aos animais, que no ensaio foi a primeira a terminar;

Curiosamente foi na ZCA da Benespera, onde a Ração *Provimi* foi oferecida em simultâneo com as 3 Rações +Coelho, que se verificou uma preferência para a Ração C, ao contrário da tendência observada nos outros seis locais. Esta preferência pode estar eventualmente relacionada com uma maior semelhança da palatibilidade da Ração C com esta ração comercial (*Provimi*). Os valores quantitativos de oferta e consumo destas rações adicionais ao Ensaio, não foram reportados.

No caso do Ensaio da ZCT Samaki, a Ração Comercial (*Valouro*), habitualmente oferecida, foi removida durante o teste.

15. LIMITAÇÕES DOS ENSAIOS

Os *Ensaios de Palatibilidade* tiveram algumas limitações, nomeadamente:

i) falta de uniformização das metodologias utilizadas para aferir o consumo *da ração;*
ii) reduzido número de locais onde o ensaio foi efetuado (n=7);
iii) limitação da avaliação a 3 meses do ano (compreendendo maioritariamente o Verão);
iv) reduzido número de animais alvo do ensaio;
v) impossibilidade de se efetuar uma análise estatística, dada o reduzido número de dados;
vi) algum grau de subjetividade nas interpretações;

16. CONCLUSÕES RETIRADAS DOS ENSAIOS DE PALATIBILIDADE

Não obstante as limitações dos ensaios identificadas, foi possível constatar uma preferência notória pela Ração A, em seis dos sete locais onde decorreram os ensaios de palatibilidade. Na Figura 12 ilustram-se os diferenciais de consumo nos Ensaios onde a Ração A foi a preferida.

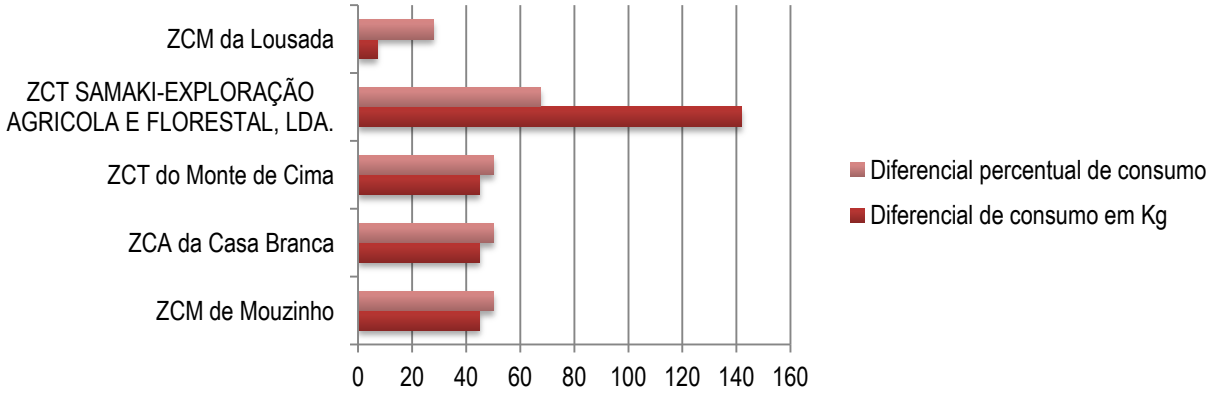


Figura 12. Diferencial de consumo (em Kg (rosa) ou em % (vermelho)) entre a Ração preferida (A) e a Ração preterida (B ou C).

No ensaio realizado na ZCA da Benespera (distrito da Guarda), ao contrário do que se verificou nas restantes 6 ZC, a Ração C foi a preferida, com um diferencial de consumo de 77,7% (Figura 13).

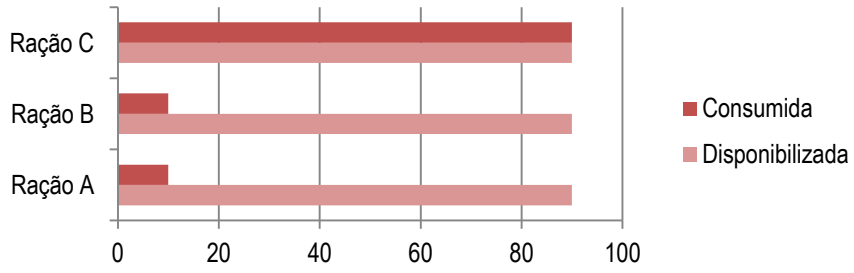


Figura 13. Diferencial de consumo (em Kg) entre a Ração preferida (C) e as Rações preteridas (A e B) na ZCA da Benespera.

Quando questionados sobre qual a Ração preferida, 6 dos 7 Responsáveis elegeram a Ração A (Figura 14).

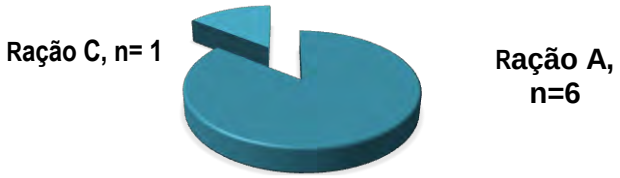


Figura 14. Respostas à questão "Qual a Ração mais consumida?" colocada aos Responsáveis pelos Ensaios.

Relativamente à Ração menos consumida, 4 participantes indicaram apenas uma Ração enquanto 3 participantes consideraram duas igualmente preteridas (Figura 15). A Ração B foi nomeada por 5 participantes como sendo a ração de menor preferência, isoladamente ou em conjunto com outra ração.
A Ração C foi identificada por quatro participantes (Figura 15) como a ração menos consumida, isoladamente ou em conjunto com a Ração B. Apenas um participante identificou a Ração A como a menos consumida (conjuntamente com a Ração B).

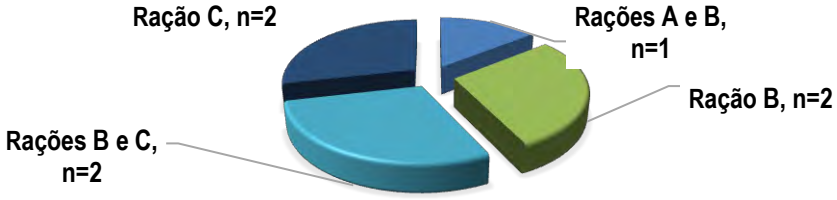


Figura 15. Ração/Rações menos consumida/as, de acordo com os Responsáveis pelos Ensaios

Atribuindo 1 ponto a cada escolha simples e 0,5 ponto a cada uma das escolhas duplas, obtêm-se o gráfico da Figura 16 que evidencia, isoladamente, a menor preferência pelas Rações B e C e a maior preferência pela Ração A.



Figura 16. Rações menos escolhidas (preteridas)

Alguns dos Responsáveis pelos Ensaios reportaram que, uma vez consumida a Ração preferida, se verificou também o consumo integral das outras Rações.

Em conclusão, dos três aromatizantes testados, o Tomilho constitui o mais atrativo para as populações de coelho-bravo quando comparado com o Fenacho ou com o Anis. Não obstante a preferência pelo Tomilho em 6 dos 7 ensaios (85.7%), é importante salvaguardar que esta predileção pode variar em função das condições naturais e hábitos alimentares das populações em causa.

Relatório elaborado no âmbito do Projeto +Coelho
24 de Março de 2019

Anexo IV-B

Relatório dos Dados Parasitológicos obtidos no âmbito do Projeto +Coelho

PROJETO +COELHO

RELATÓRIO

DADOS PARASITOLOGICOS OBTIDOS NO ÂMBITO DO PROJECTO +COELHO



Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Documento de apoio à seleção das ZC a incluir no Ensaio de Desparasitação (medida *7.5 Melhoria da condição física dos animais: administração de ração não- medicamentosa e de ração medicamentosa em zonas de caça selecionadas)*

1. ZC nº 4 ZCA H Abrunheira, Paço de Aragão e Outras

Montemor-o-Novo, Évora, Alentejo

Cadáveres

1.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 84,2% (16/19)

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (16/19)

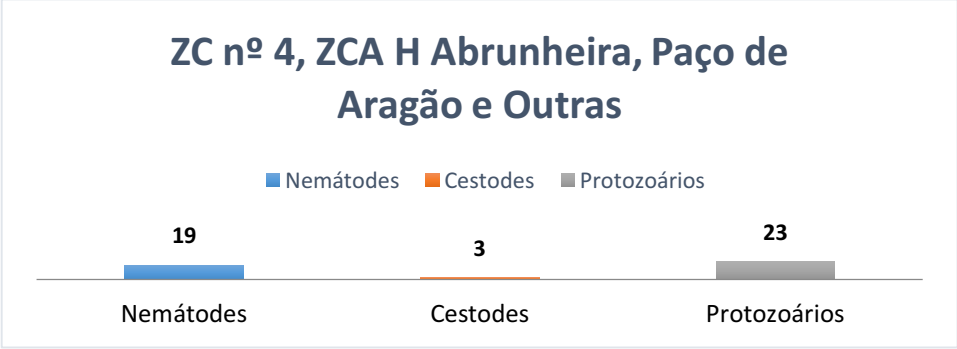
Percentagem de negativos: 16% (3/19)

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do Projeto +Coelho_1, foram observadas grandes infestações em cadáveres de coelho-bravo por *Graphidium strigosum* em 31,25% dos animais (5/16) e por *Eimeria média* em 6,25% (1/16) dos animais.



Presença vs Ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Cadáveres
1.2. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 84% (16/19)

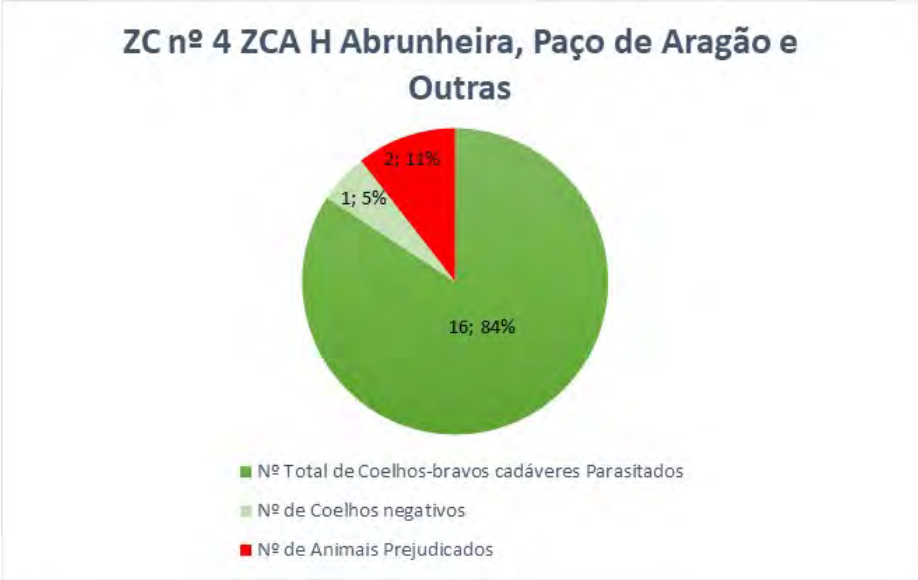
Percentagem de infeções simples: 10,5% (2/19) por *Eimeria* (1 com *E. perforans* e E. *média*; 1 com *E. stidae*, *E. piriforme*, *E. media*)

Percentagem com infeções mistas: 73,7% (14/19)

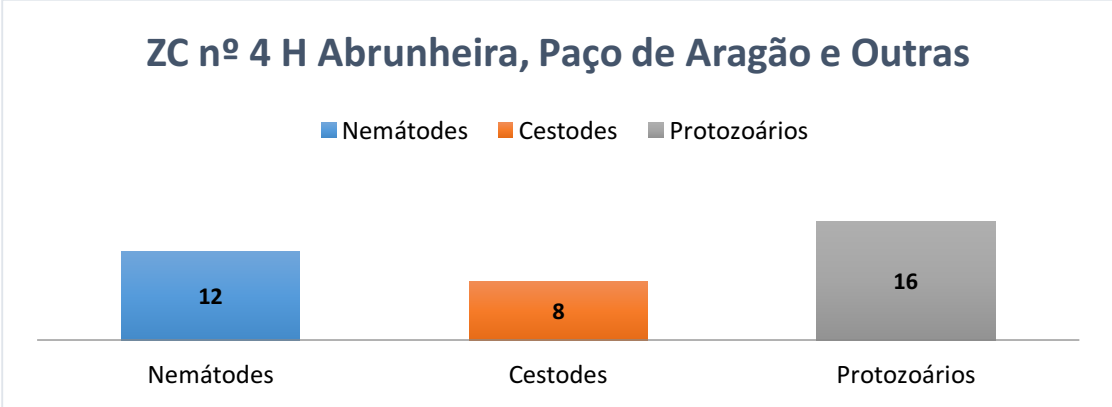
Percentagem de negativos: 5,3% (1/19)

Percentagem de prejudicados: 10,5% (2/19)

No âmbito do Projeto+ Coelho_2, foram observadas grandes infestações em cadáveres de coelho-bravo por *G. strigosum* 6,3% (1/16), *Citotenia sp* 6,3% (1/16), *Anoplocephalida* 6,3%(1/16) e *Andrya sp* 6,3% (1/16).



Presença vs Ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

Caçados:
Ano 2018-2019

Observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 4 ténias de coelho-bravo no âmbito do Projeto+Coelho_2, correspondendo a 14,81% (4/27).

2. ZC nº 66 Roubão, Braço de Prata e Outras

Benavente, Santarém, Alentejo

Cadáveres

2.1. Ano 2018-2019

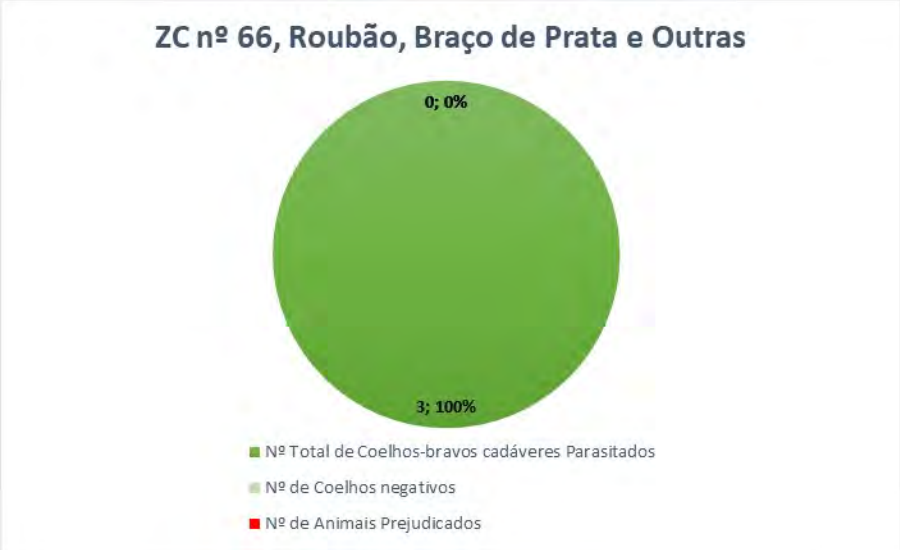
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (3/3)

Percentagem de infeções simples: 33,3% (1/3)

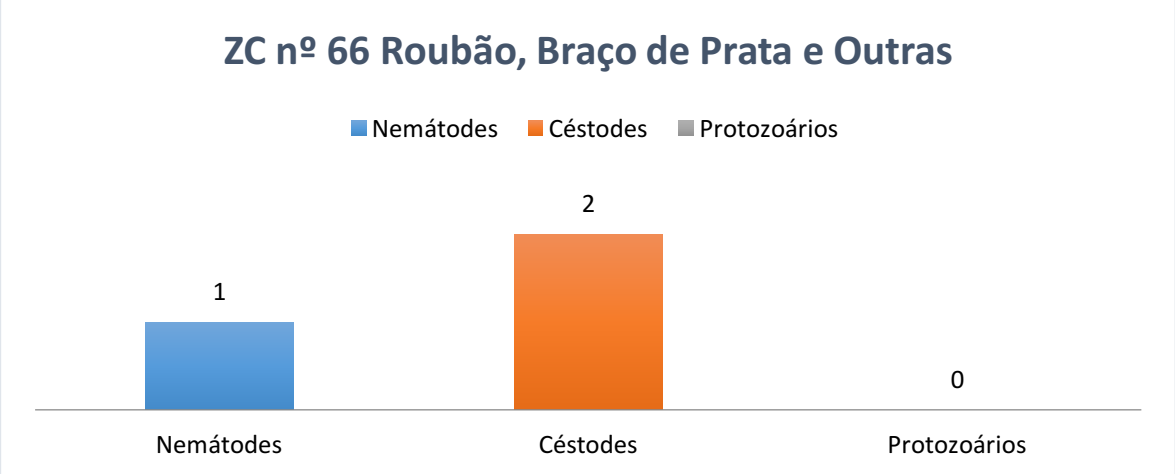
Percentagem com infeções mistas: 67% (2/3)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs Ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

3. ZC nº 68 ZCA Herdade do Mixão e Outras

Alandroal, Évora, Alentejo

Cadáveres

3.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 75,0% (3/4)

Percentagem de infeções simples: 33,3% (1/3) por *Eimeria* (*Eimeria irresidua*, *E. perforans* e *E. magna*)

Percentagem com infeções mistas: 67% (2/3)

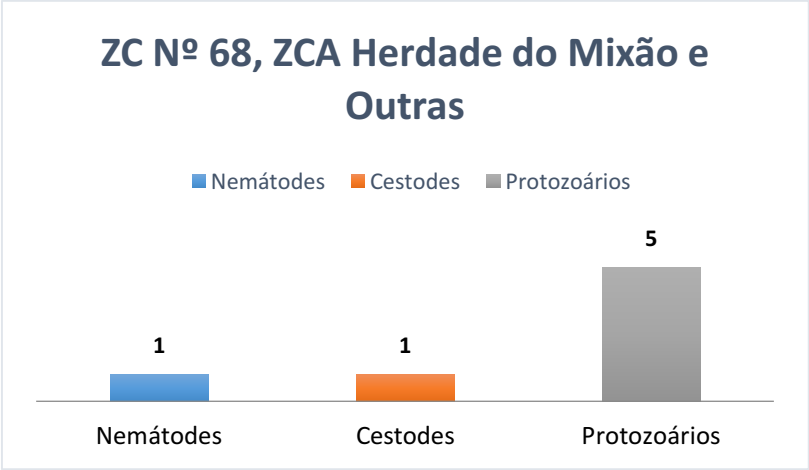
Percentagem de negativos: 25% (1/4)

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1, foram observadas grandes (GRA) infestações em cadáveres de coelho-bravo por *E. piriformis* 33,3% (1/3), *E. irresidua* 33,3% (1/3), *E. perforans* 66,7% (2/3) e por *Andrya* sp 33,3% (1/3).



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

4. ZC n º 173 ZCT Portela da Brava

Cadáveres

4.1. Ano 2018-2019

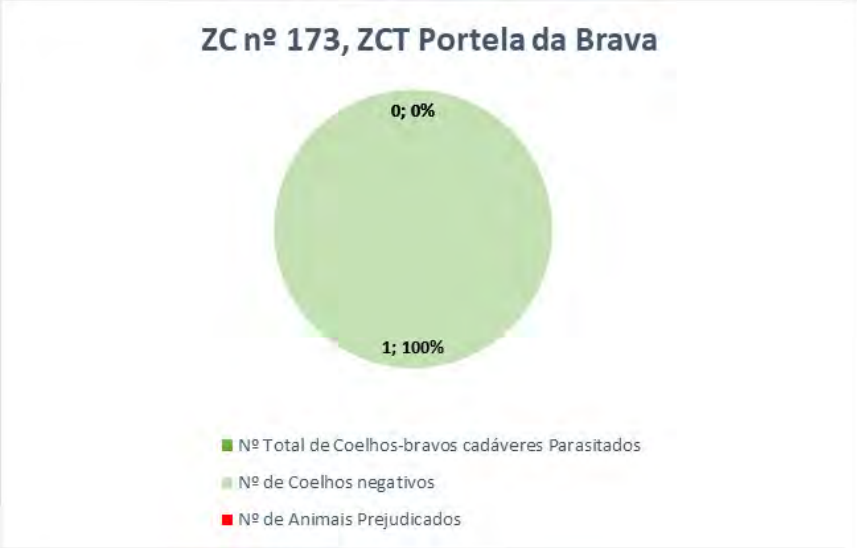
Percentagem de cadáveres parasitados: 0%

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 100% (1/1)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019

5. ZC nº 188 ZCT Vale de Perditos

Serpa, Beja, Alentejo

Cadáveres

5.1. Ano 2017-2018

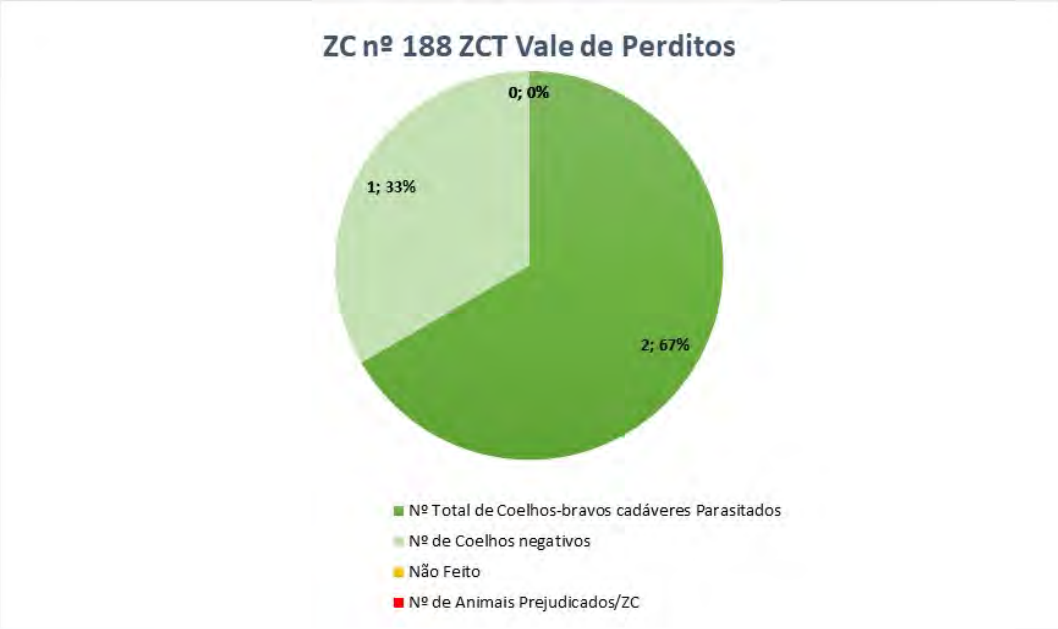
Percentagem de cadáveres parasitados: 66,7% (2/3)

Percentagem de infeções simples: 50% (1/2) por *Eimeria media*

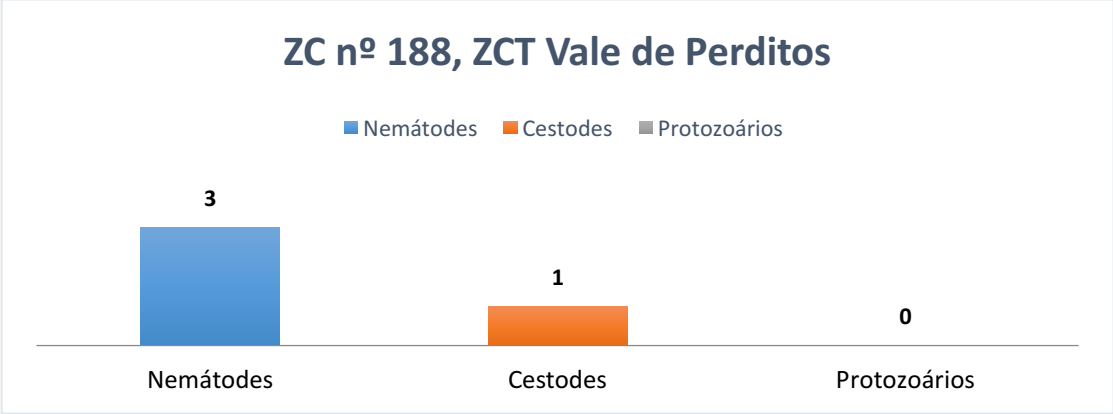
Percentagem com infeções mistas: 50% (1/2)

Percentagem de negativos: 33% (1/3)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Cadáveres
5.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (3/3)

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (3/3)

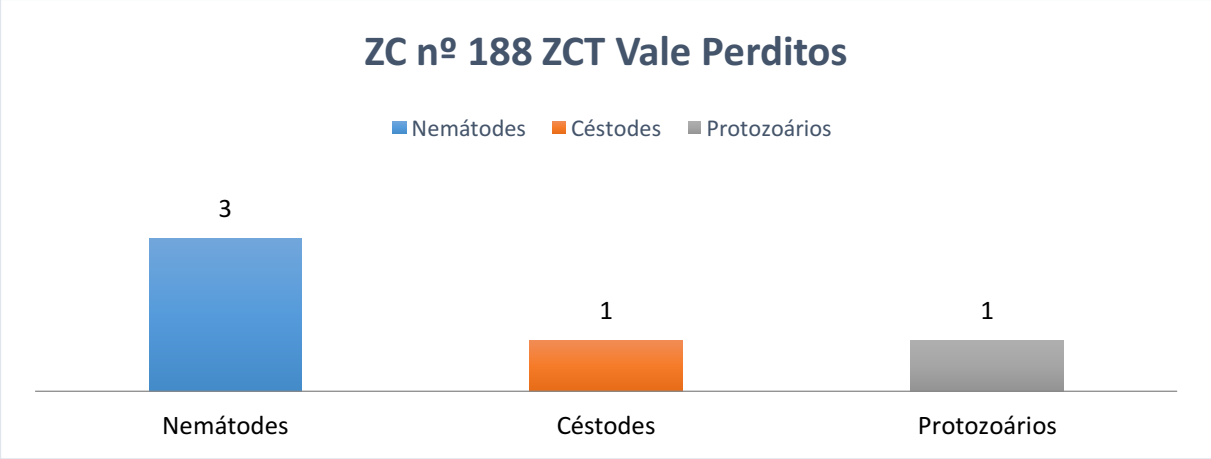
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_2 foram identificadas grandes cargas parasitárias por Passarulus ambiguus num cadáver de coelho-bravo 33,3% (1/3).



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

6. ZC nº 290 ZCA Ortiga

Mação, Santarém, Alentejo

Cadáveres

6.1. Ano 2017-2018

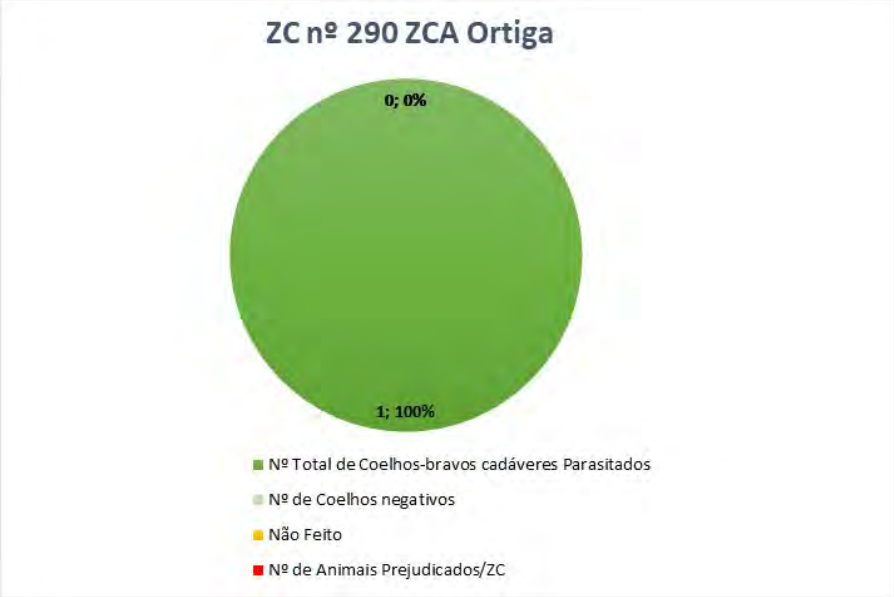
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

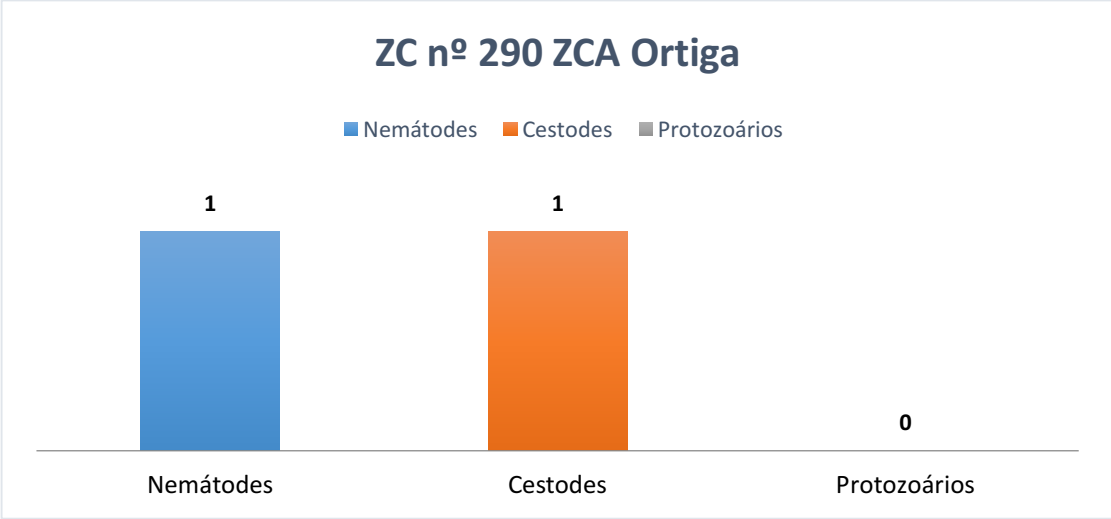
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

7. ZC nº 314 ZCA Herdades do Corcho, Tacão e Outras

Mértola, Beja, Alentejo

Cadáveres

7.1. Ano 2017-2018

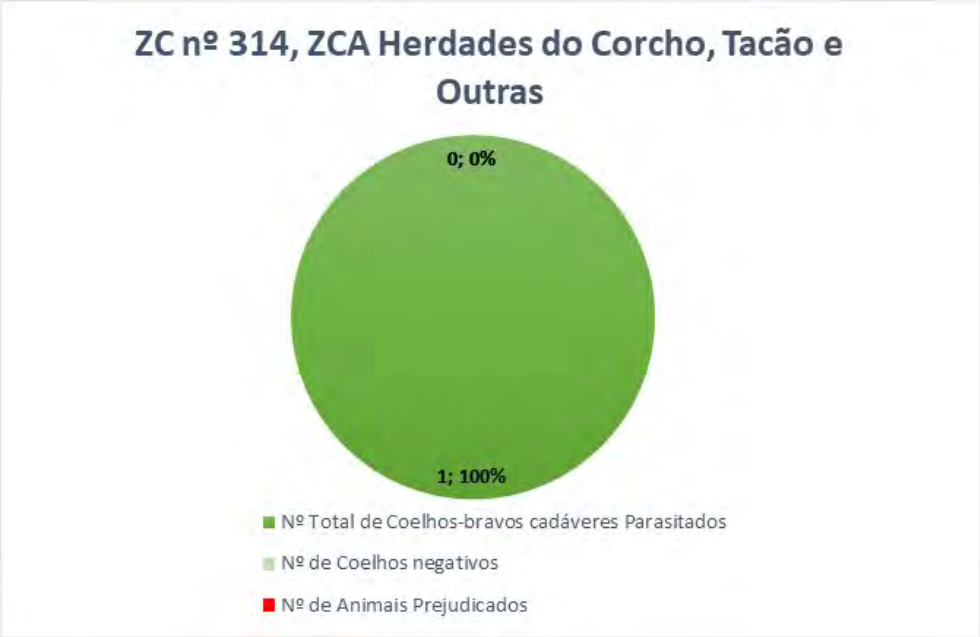
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

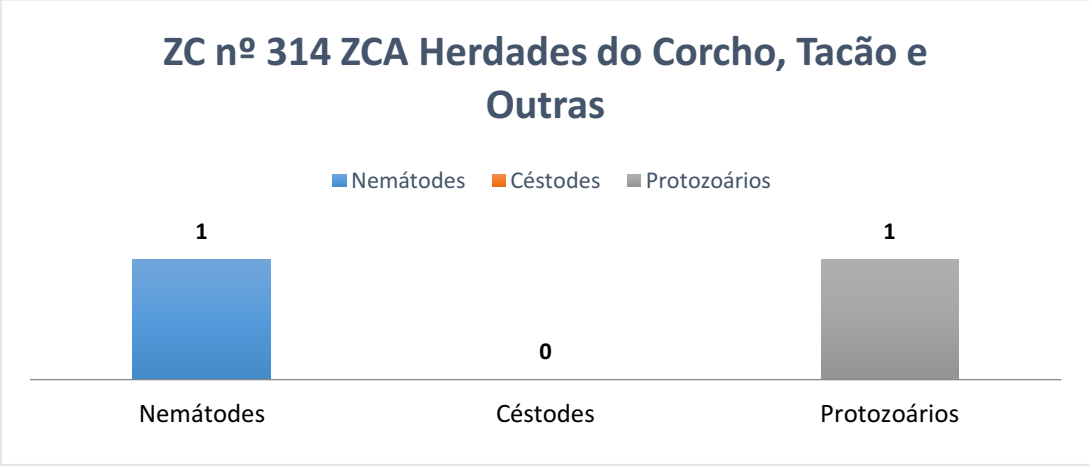
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

8. ZC nº 321 ZCA H Almarginho e Outras

Mértola, Beja, Alentejo

Cadáveres

8.1. Ano 2017-2018

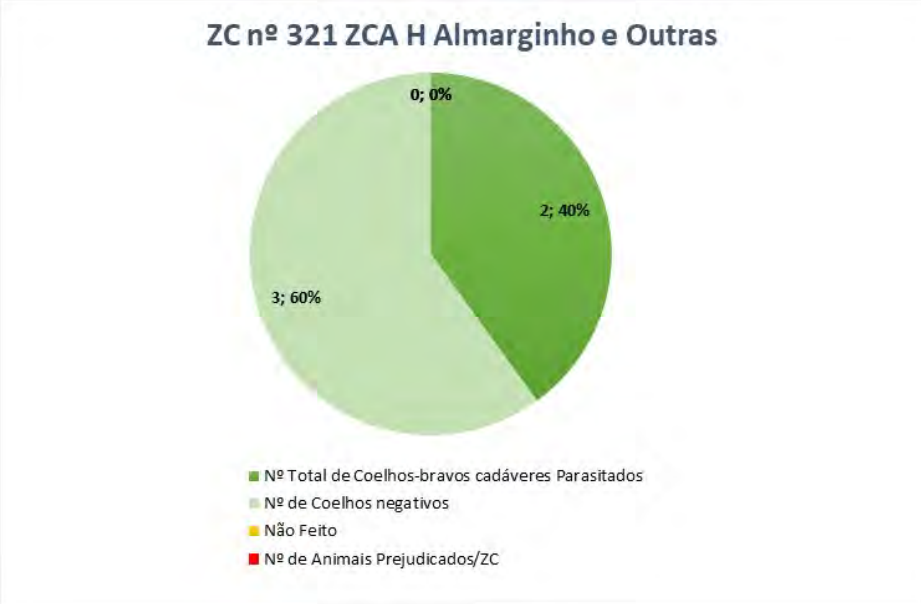
Percentagem de cadáveres parasitados: 40% (2/5)

Percentagem de infeções simples: 50% (1/2) por *Dermatoxys veligera*

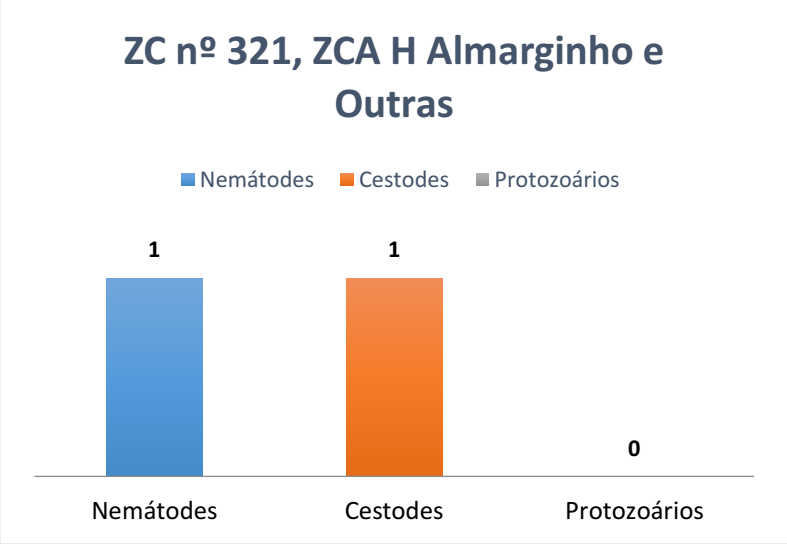
Percentagem com infeções mistas: 50% (1/2)

Percentagem de negativos: 60% (3/5)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

8.1. Ano 2018-2019

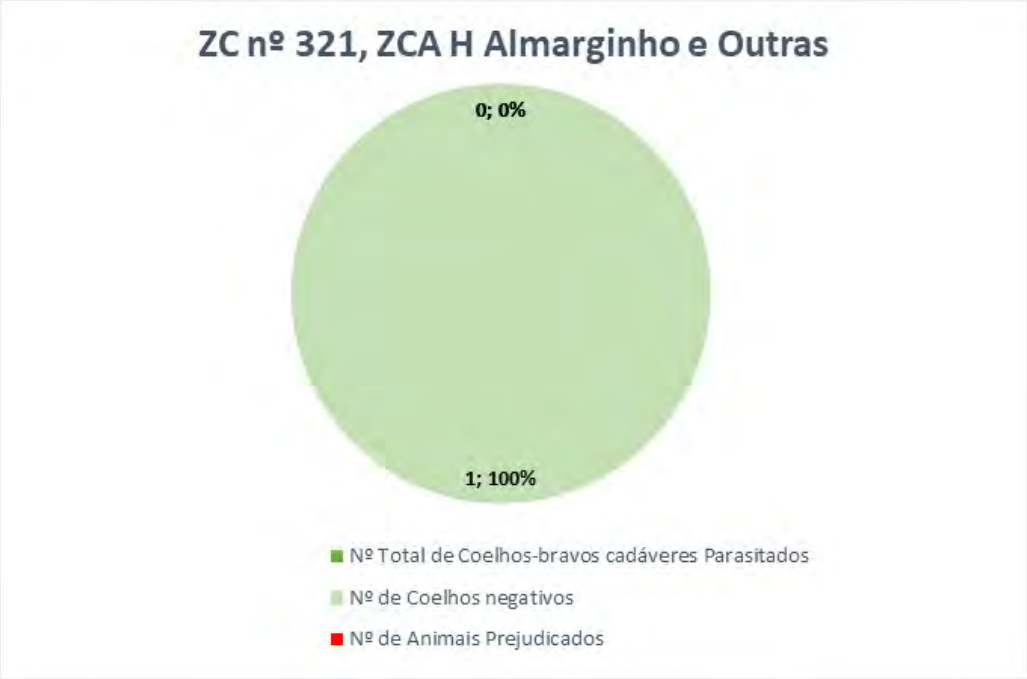
Percentagem de cadáveres parasitados: 0%

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 100% (1/1)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019

9. ZC nº 577 ZCA de Casevel

Santarém, Santarém, Alentejo

Cadáveres
9.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (2/2)

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (2/2)

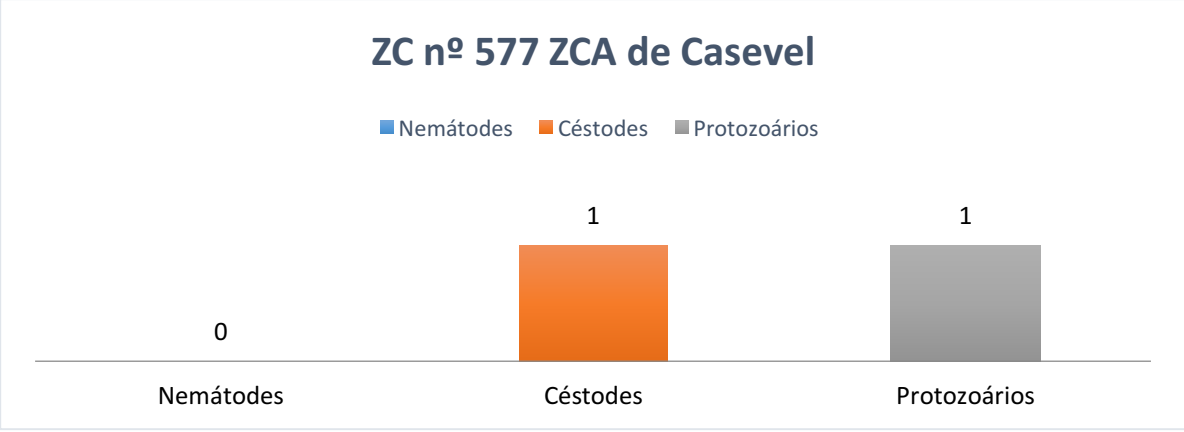
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_2 foram identificadas grandes cargas parasitárias por *Citotenia sp*. num cadáver de coelho-bravo parasitado 50% (1/1).



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

10. ZC nº 622 ZCT das Cortes

Ferreira do Alentejo, Beja, Alentejo

Cadáveres

10.1. Ano 2017-2018

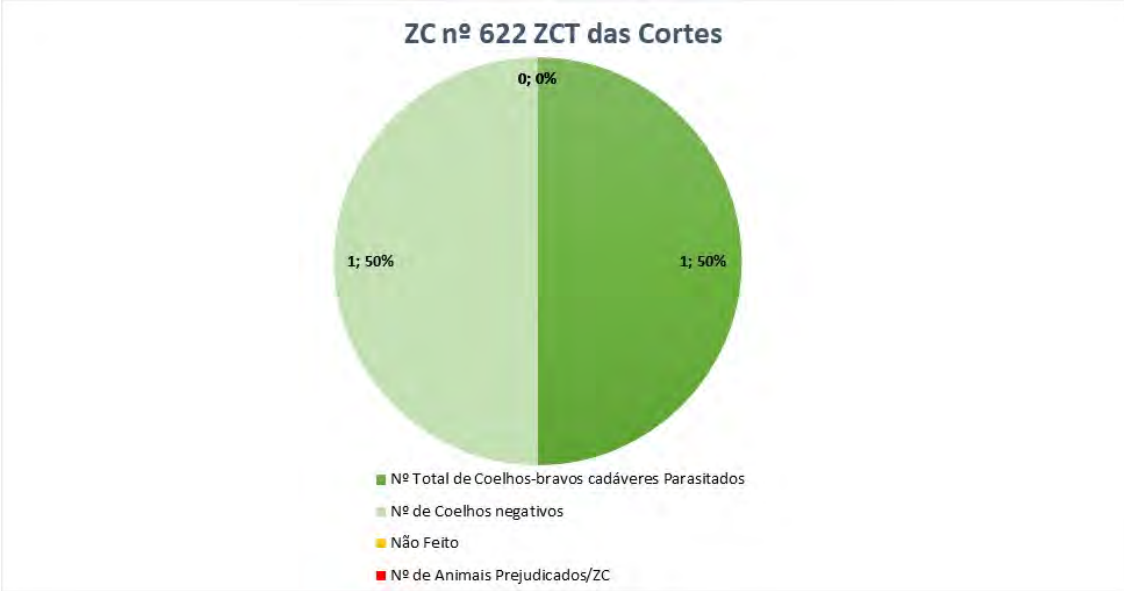
Percentagem de cadáveres parasitados: 50% (1/2)

Percentagem de infeções simples: 100% (1/1) por *Citoténia* sp.

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 50% (1/2)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018

11. ZC nº 743 ZCT do Pereiro e Outras

Alcoutim, Faro, Algarve

Cadáveres

11.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (4/4)

Percentagem de infeções simples: 0%

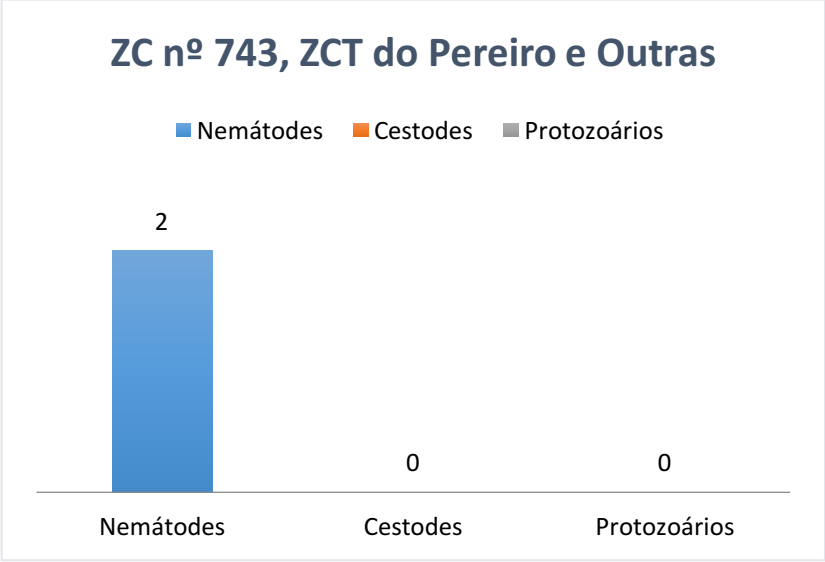
Percentagem com infeções mistas: 100% (4/4)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

12. ZC nº 1365 ZCA Rates

Póvoa de Varzim, Porto, Norte

Cadáveres

12.1. Ano 2017-2018

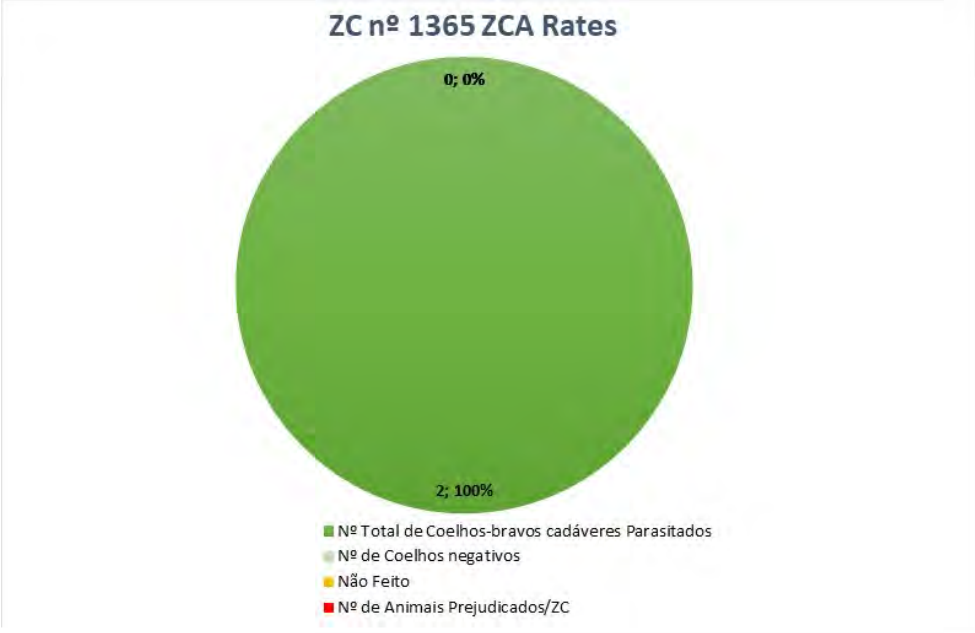
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (2/2)

Percentagem de infeções simples: 0%

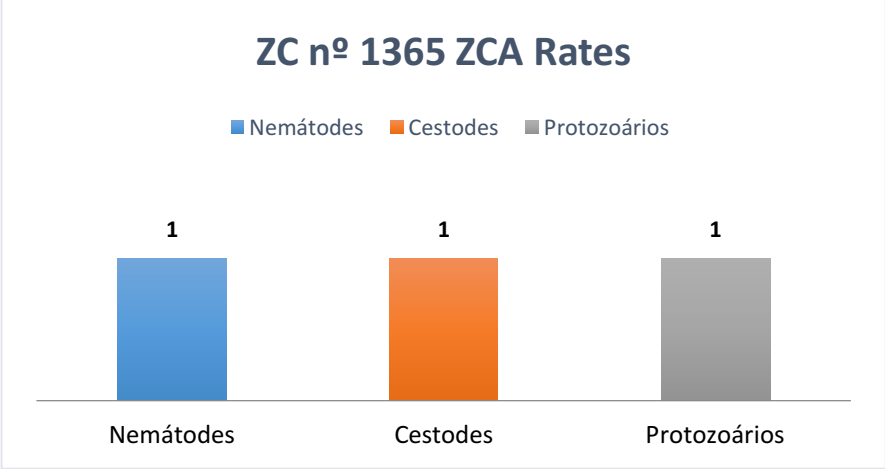
Percentagem com infeções mistas: 100% (2/2)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

13. ZC nº 1689 ZCT Galega

Chamusca, Santarém, Alentejo

Cadáveres

13.1. Ano 2017-2018

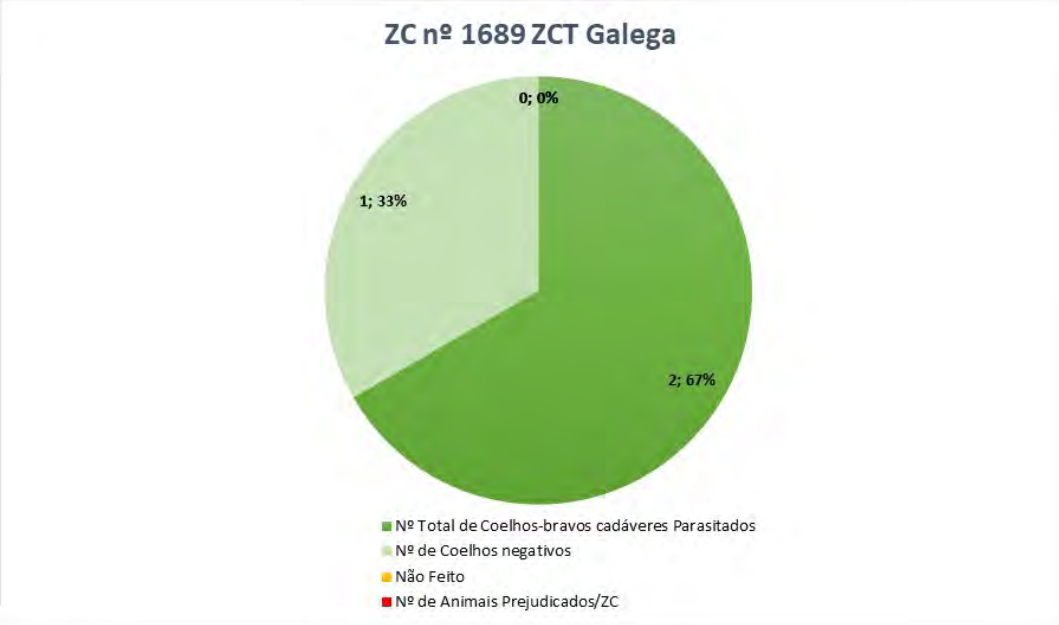
Percentagem de cadáveres parasitados: 66,7% (2/3)

Percentagem de infeções simples: 100% (2/2) por *Eimeria* (1 com *E. magna* e 1 com *E. perforans*)

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 33% (1/3)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018

14. ZC nº 1803 ZCT Alcaria Ruiva

Mértola, Beja, Alentejo

Cadáveres

14.1. Ano 2017-2018

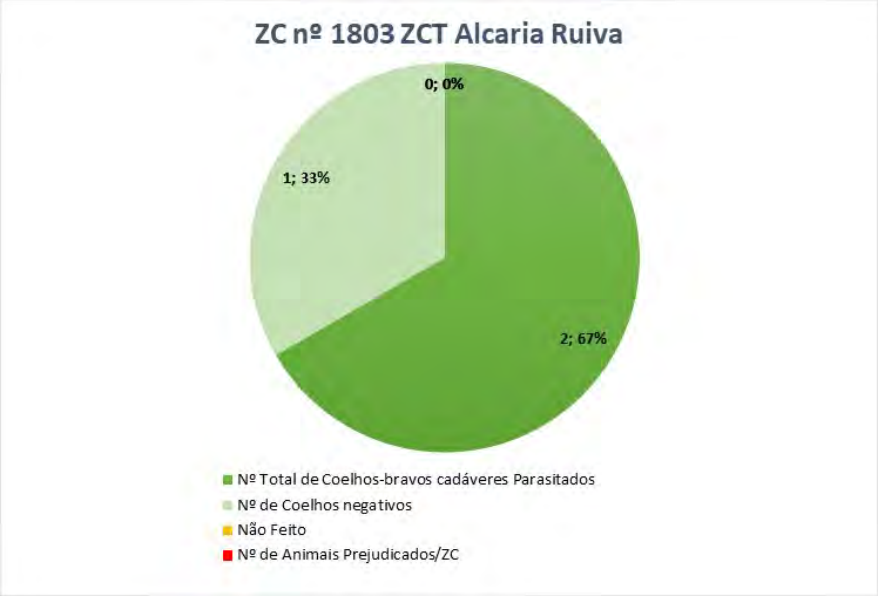
Percentagem de cadáveres parasitados: 66,7% (2/3)

Percentagem de infeções simples: 0%

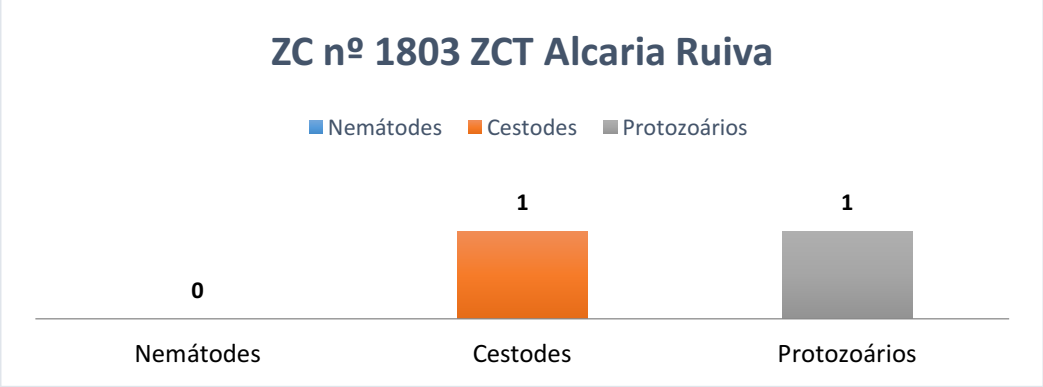
Percentagem com infeções mistas: 100% (2/2)

Percentagem de negativos: 33% (1/3)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Caçados:

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 4 ténias de coelho-bravo. Duas foram entregues no âmbito do +Coelho_1, correspondendo a 5,6% (2/36) e duas no âmbito do +Coelho_2 correspondendo a 11,11% (2/18).

15. ZC nº 2128 ZCA H Magarreiro

Santarém, Santarém, Alentejo

Cadáveres

15.1. Ano 2018-2019

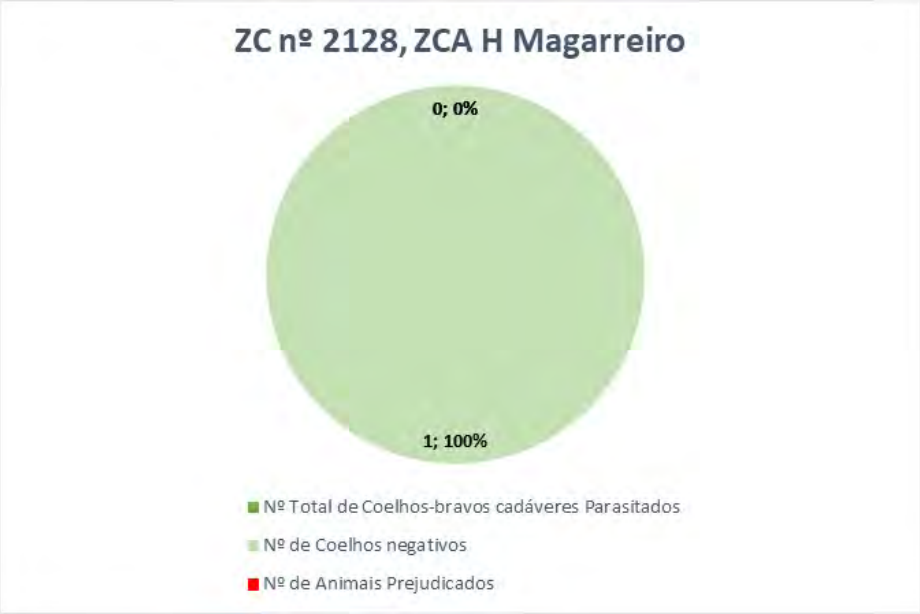
Percentagem de cadáveres parasitados: 0%

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 100% (1/1)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019

16. ZC nº 2168 ZCA Freguesia de Arazede

Montemor-o-Velho, Coimbra, Centro

Cadáveres

16.1. Ano 2017-2018

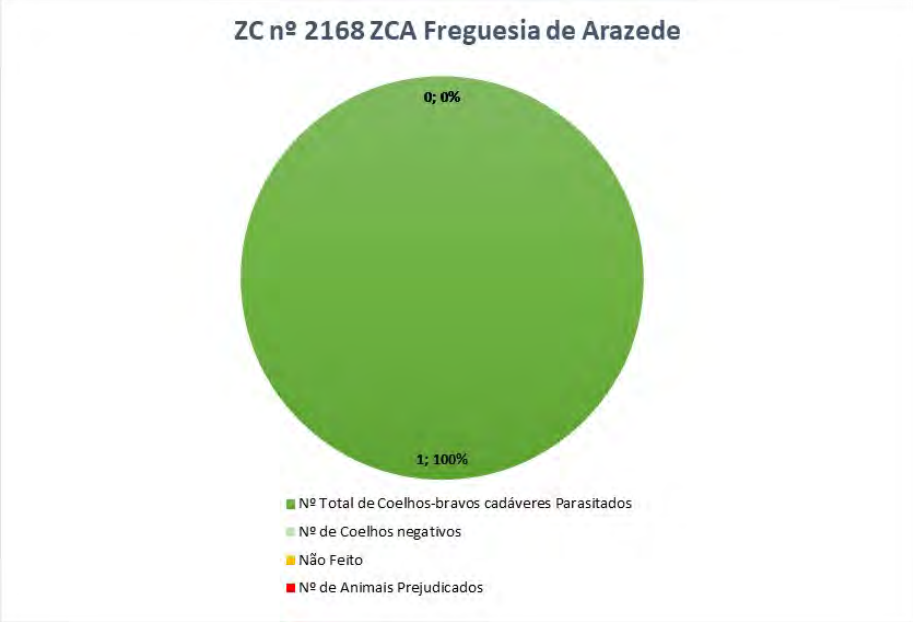
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 100% (1/1) por *Eimeria* (*E. perforans* e *E. flavescens*)

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018

17. ZC nº 2405 ZCT de Vale Gonçalo/Monte das Vinhas?

Almodôvar, Beja, Alentejo

Cadáveres

17.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

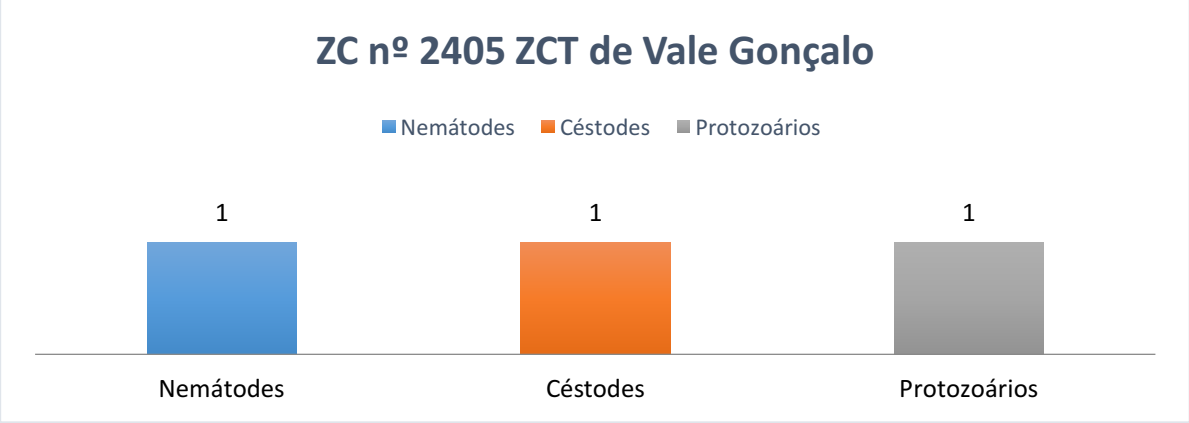
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

18. ZC nº 2444 ZCA Casas Novas

Odemira, Beja, Alentejo

Cadáveres

18.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

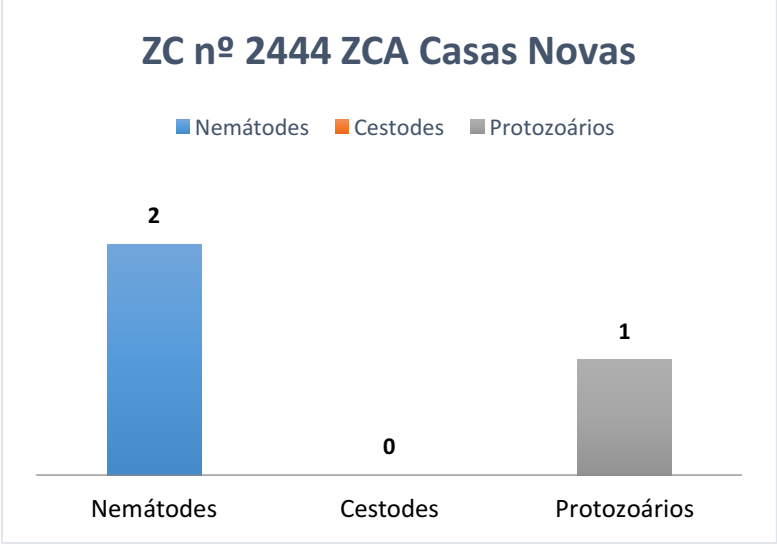
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

19. ZC nº 2561 ZCM Mouzinho

Penafiel, Porto, Norte

Cadáveres

19.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (17/17)

Percentagem de infeções simples: 5,9% (1/1) por ovos de estrongilideos

Percentagem com infeções mistas: 94% (16/17)

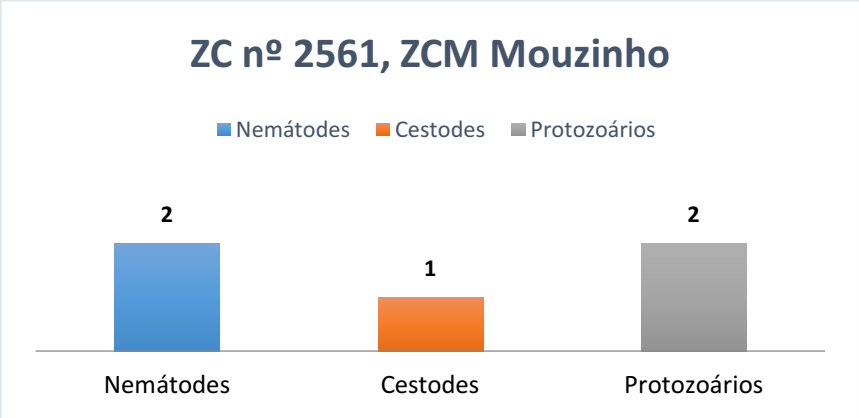
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1, foram observadas grandes (GRA) infeções em cadáveres de coelho-bravo por *Graphidium strigosum* 35,3% (6/17), *E. stidae* 17,6% (3/17), e *Trichurus leporis* 5,9% (1/17).



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

19.2. <u>Cadáveres</u>
Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 0%

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 100% (7/7)



Presença vs ausência 2018-2019

20. ZC nº 4581 ZCM Marco de Canaveses

Marco de Canaveses, Porto, Norte

Cadáveres

20.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

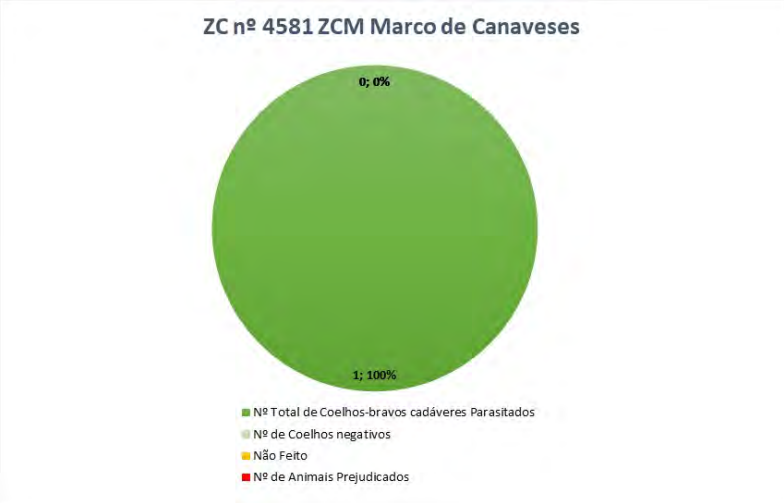
Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100 (1/1)

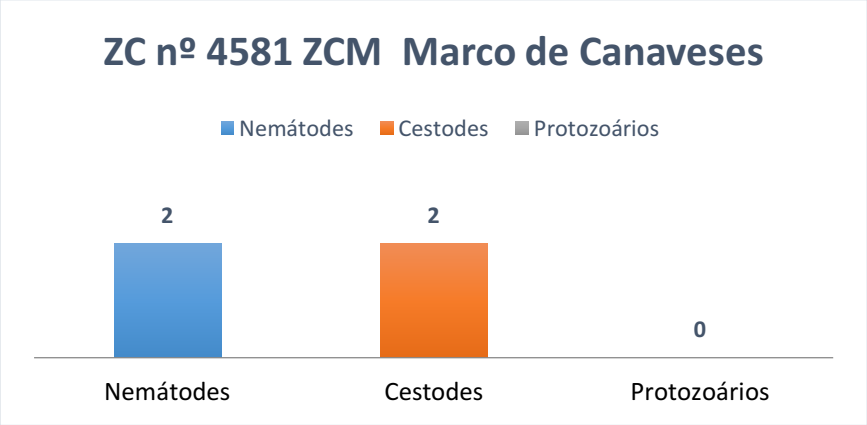
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho 1, foram detetadas grandes infestações (GRA) por *G. strigosum*, e *Andrya sp*. num cadáver de coelho-bravo.



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Caçados:

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foi entregue 1 ténia de coelho-bravo no âmbito do +Coelho_1 correspondendo a 16,7% (1/6).

21. ZC nº 4855 ZCT SAMAKI-EXPLORAÇÃO AGRICOLA E FLORESTAL, LDA.

Benavente, Santarém, Alentejo

Cadáveres

21.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 14,3% (1/7)

Percentagem de animais não testados:86% (6/7)

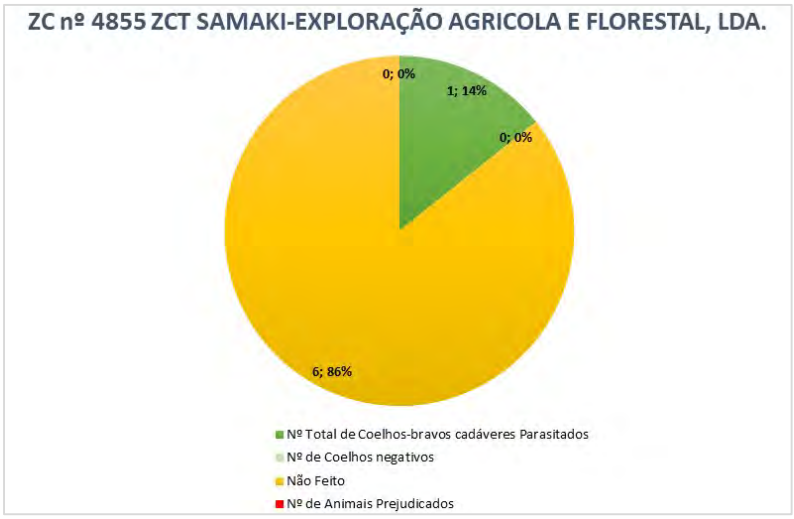
Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1 foram detetadas grandes infestações (GRA) por *E. stidae* num cadáver de coelho-bravo 100% (1/7).



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

21.2. Cadáveres
Ano 2018-2019

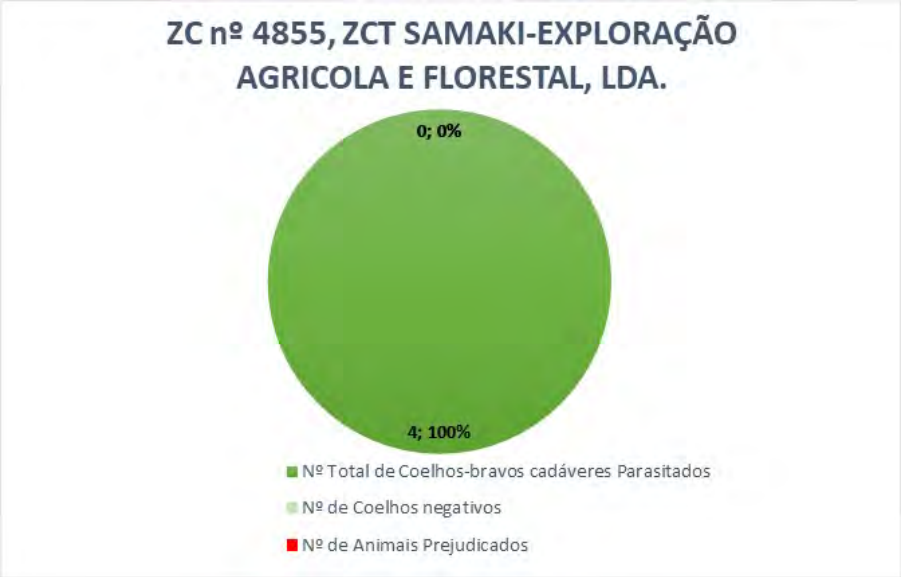
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (4/4)

Percentagem de infeções simples: 50% (2/2)

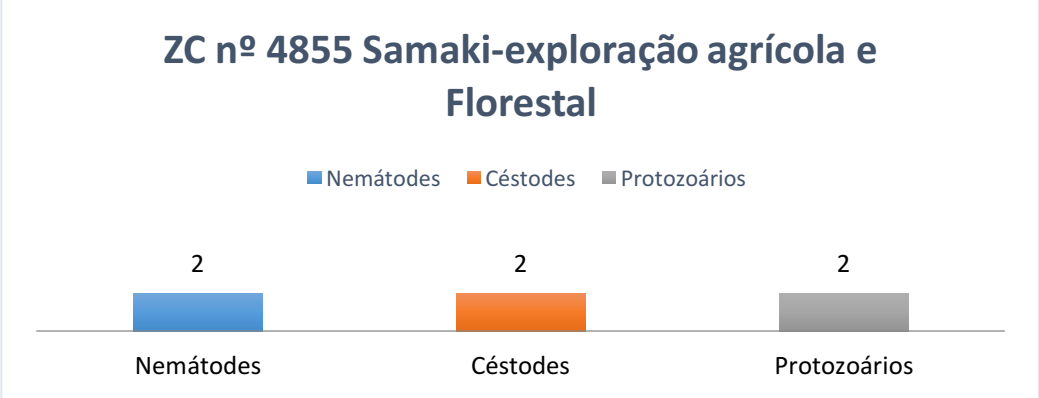
Percentagem com infeções mistas: 50% (2/2)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

22. ZC nº 5231 ZCT Malpique e Monte Grande

Mora, Évora, Alentejo

Cadáveres

16.1. Ano 2017-2018

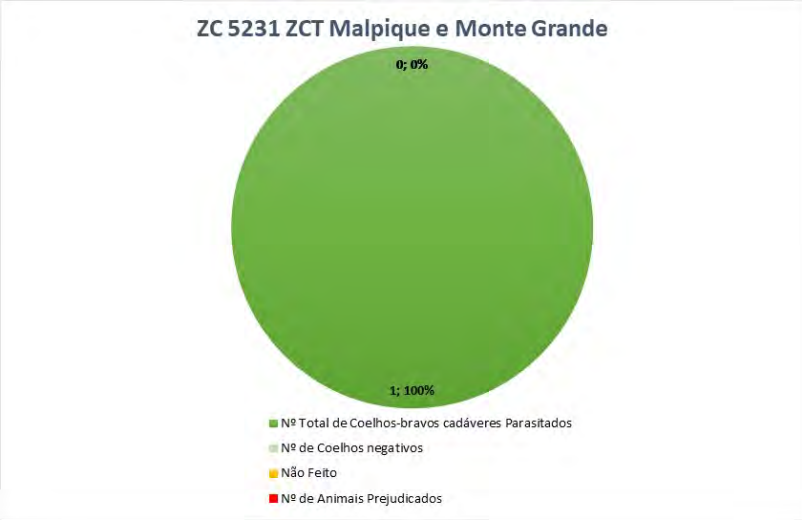
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 100% (1/1) por *Dermatoxys veligera*

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018

Caçados:

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foi entregue 1 ténia de coelho-bravo no âmbito do +Coelho_2, correspondendo a 20% (1/5).

23. ZC nº 5671 ZCT do Monte de Cima

Estremoz, Évora, Alentejo

Cadáveres

23.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (4/4)

Percentagem de infeções simples: 25% (1/4) por *Eimeria (E. perforans e E. media)*

Percentagem com infeções mistas: 75% (3/4)

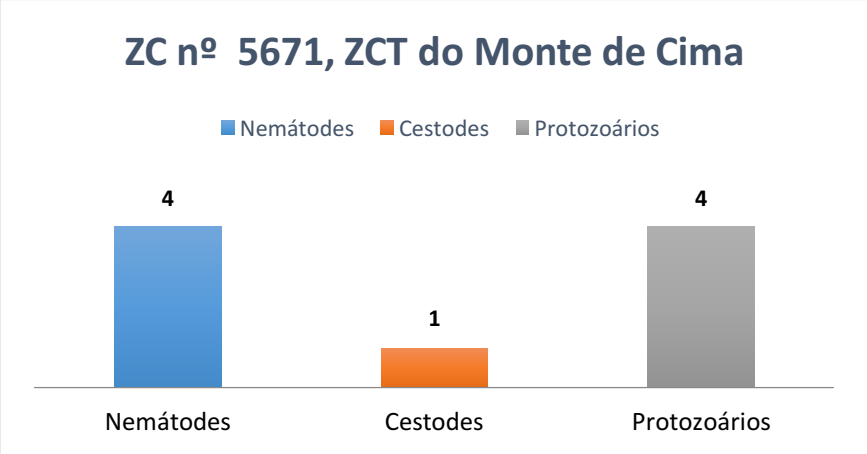
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1 foram identificadas grandes (GRA) infestações por G. strigosum em 2 dos cadáveres de coelho-bravo parasitados correspondendo a 50% (2/4).



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Cadáveres

23.2. Ano 2018-2019

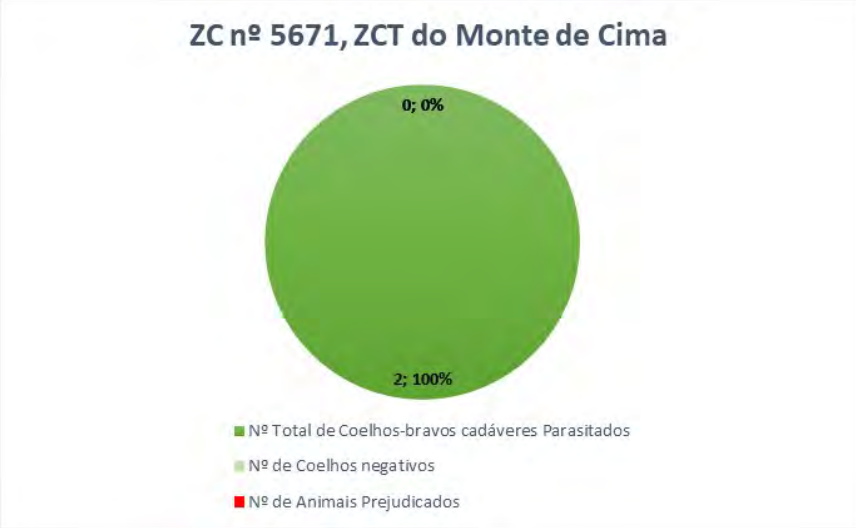
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (2/2)

Percentagem de infeções simples: 0%

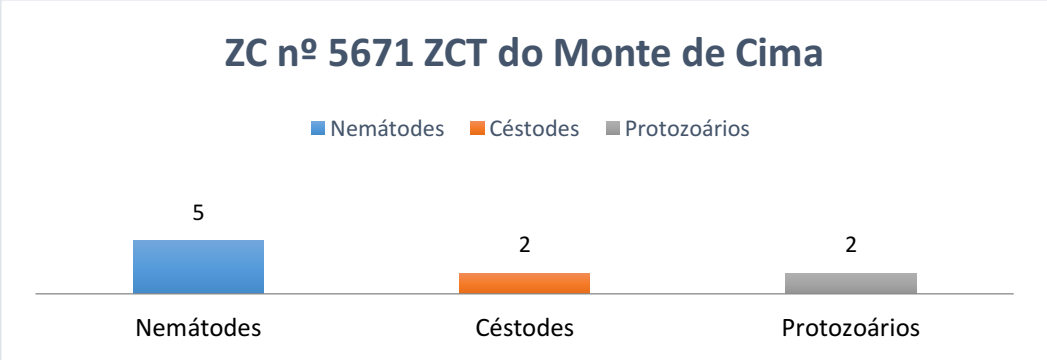
Percentagem com infeções mistas: 100% (2/2)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

Caçados:

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foi entregue 1 ténia de coelho-bravo no âmbito do +Coelho_2, correspondendo a 2,6% (1/38).

24. ZC nº 5850 ZCM Arneiros de Almeirim

Almeirim/Santarém, Évora, Alentejo

Cadáveres

24.1. Ano 2017-2018

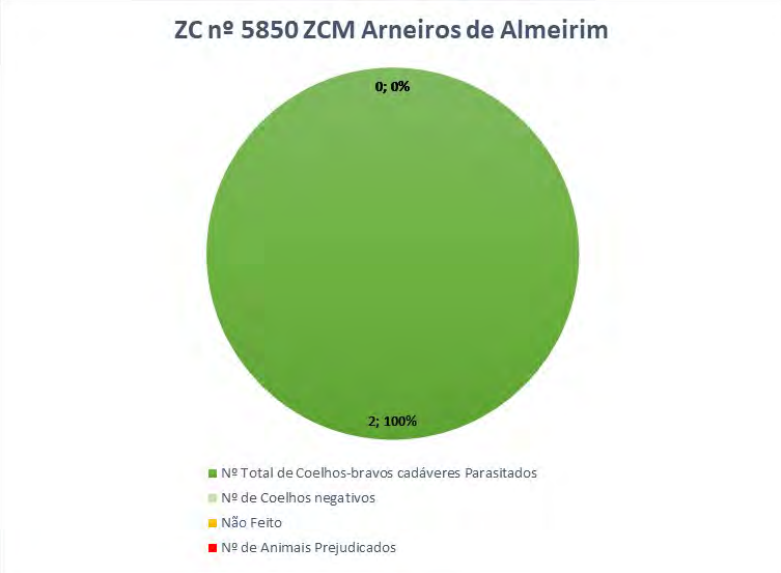
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (2/2)

Percentagem de infeções simples: 0%

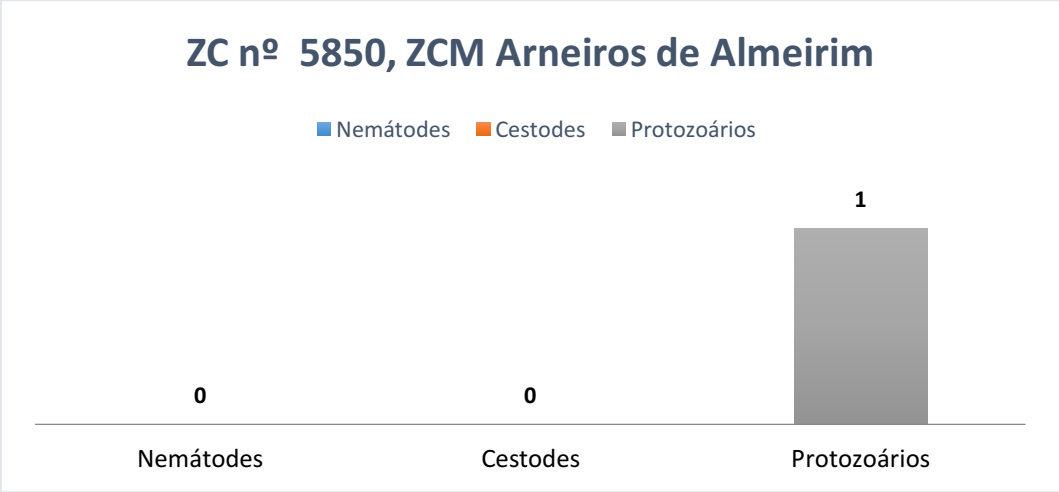
Percentagem com infeções mistas: 100% (2/2)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

25. ZC nº 5854 ZCA Herdade da Esteveira

Borba/Elvas, Évora/Portalegre, Alentejo

Cadáveres

25.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

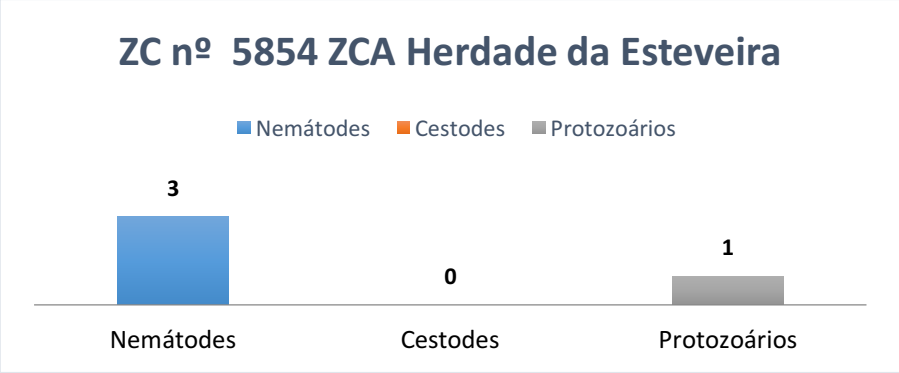
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

26. ZC nº 5876 ZCT da Herdade de Vale Alarve e Outras

Ferreira do Alentejo, Beja, Alentejo

Cadáveres

26.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (3/3)

Percentagem de infeções simples: 33,3% (1/3) por *Passalurus ambiguus*

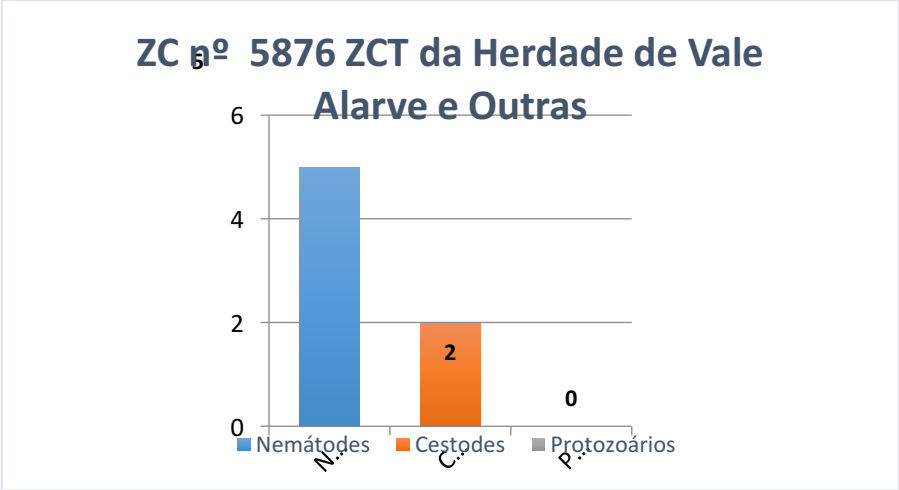
Percentagem com infeções mistas: 67% (2/3)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

26.2. Ano 2018-2019

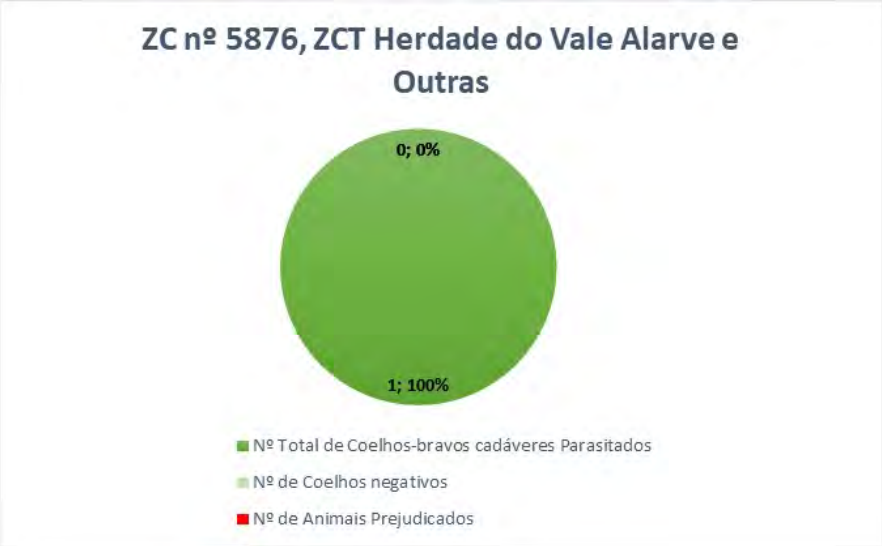
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

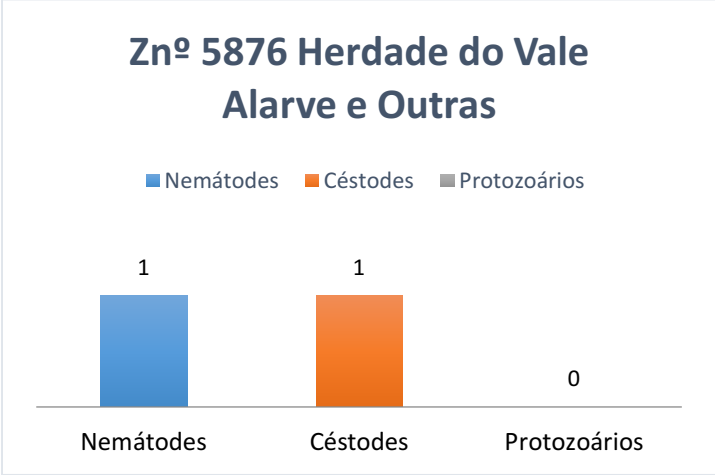
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

<u>Caçados:</u>

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 3 ténias de coelho-bravo no âmbito do +Coelho_1, correspondendo a 8,6% (3/35).

27. ZC nº 5939 ZCT Moninho

Mértola, Beja, Alentejo

Cadáveres

27.1. Ano 2017-2018

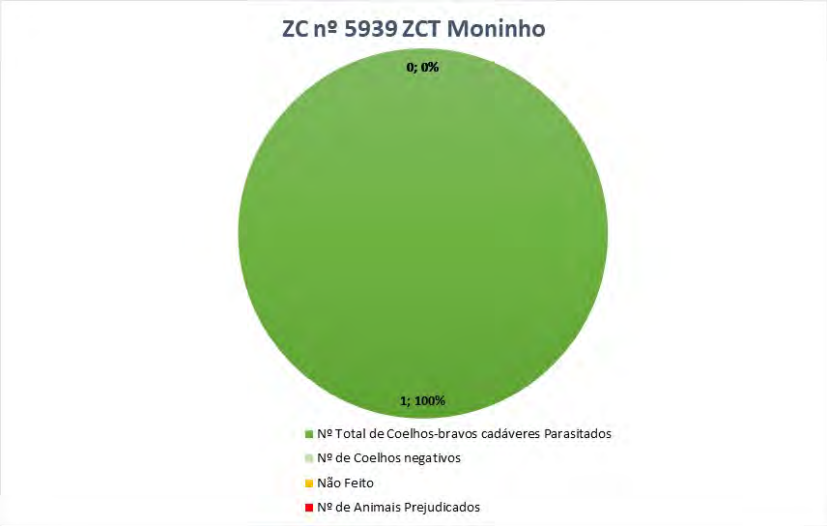
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

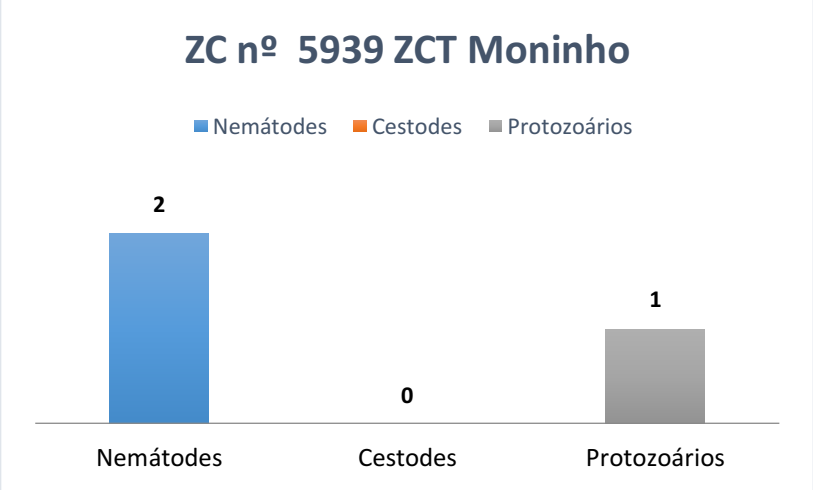
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

27.2. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

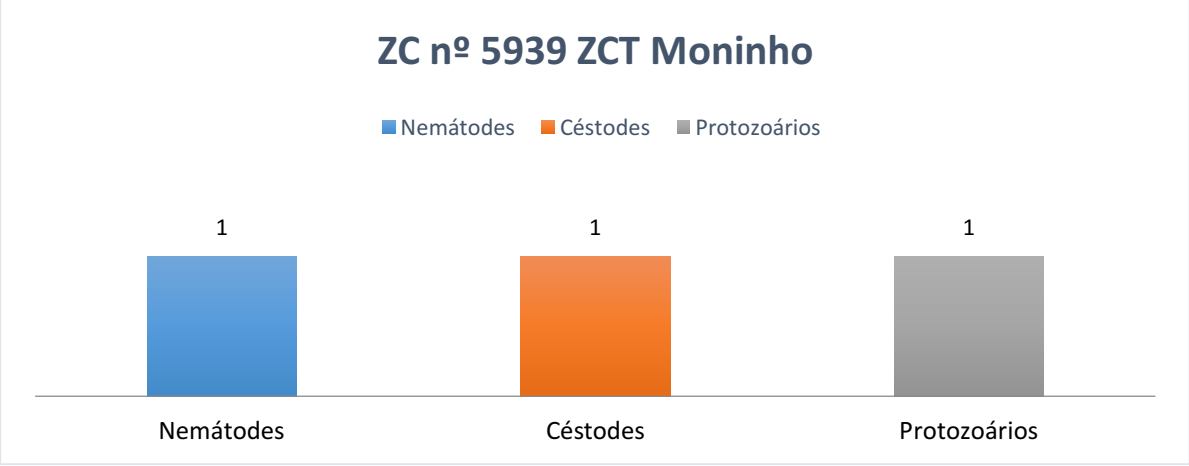
Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_2 foram identificadas grandes cargas parasitárias por E. perforans no cadáver de coe-lho-bravo recebido.



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

<u>Caçados:</u>

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 2 ténias de coelho-bravo no âmbito do +Coelho 1, correspondendo a 6,7% (2/30).

28. ZC nº 6030 ZCT Santa Ana

Avis, Portalegre, Alentejo

Cadáveres

28.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

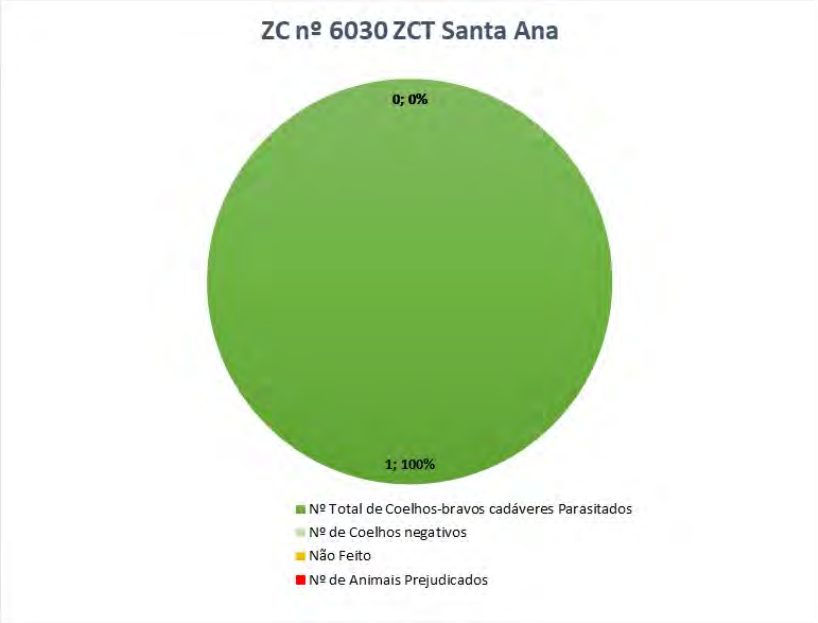
Percentagem de infeções simples: 100% (1/1) por *Eimeria* (*E. piriform*, *E. irresidua*, *E. perforans*, *E. media*)

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1 foram identificadas grandes infestações por *E. irresidua* e *E. media* no único cadáver parasitado recebido.



Presença vs ausência 2017-2018

29. ZC nº 6267 Matraque

Portel, Évora, Alentejo

Cadáveres

29.1. Ano 2017-2018

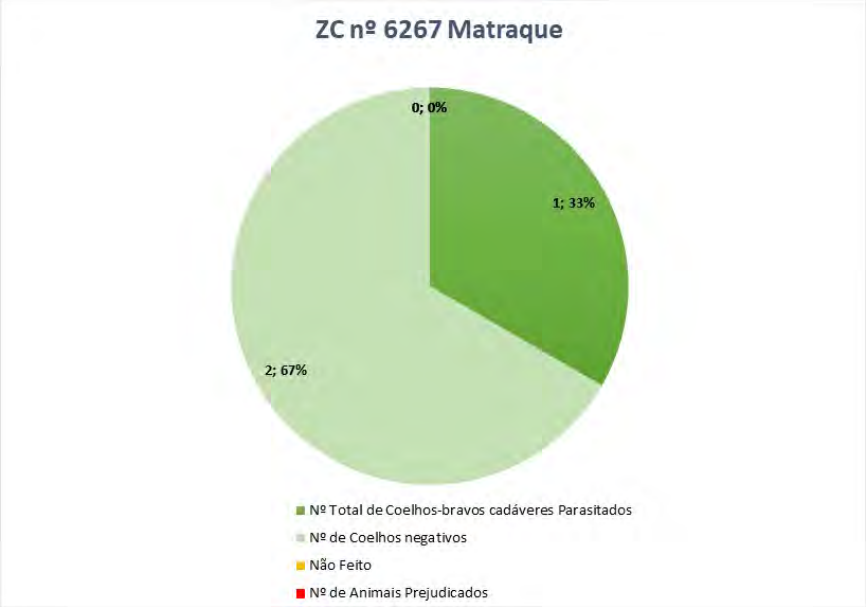
Percentagem de cadáveres parasitados: 33,3% (1/3)

Percentagem de infeções simples: 100% (1/1) por oocistos eimeria

Percentagem com infeções mistas: 0%

Percentagem de negativos: 67% (2/3)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018

30. ZC nº 6336 ZCT HERDADE da Pachola

Évora, Évora, Alentejo

Cadáveres

30.1. Ano 2017-2018

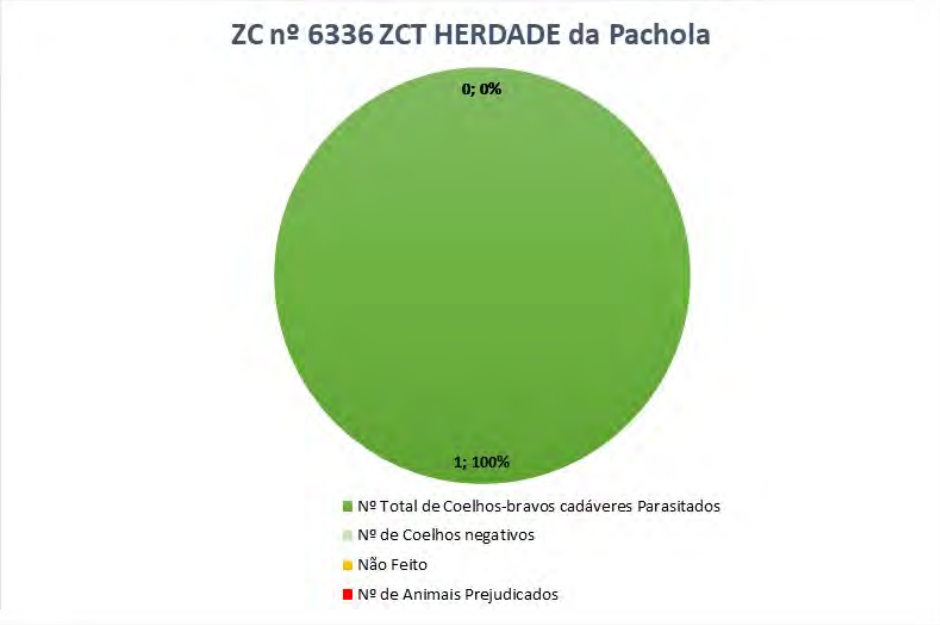
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

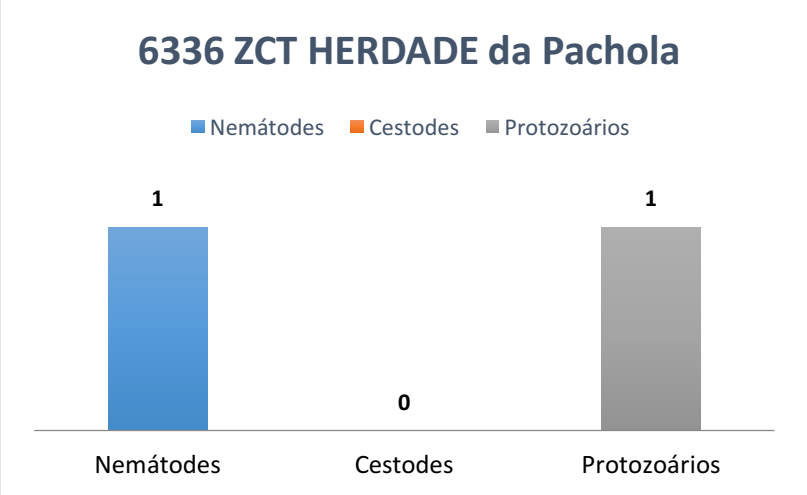
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

31. ZC nº 6531 ZCT da Pedra da Légua

Castelo Branco, Castelo Branco, Centro

Cadáveres

31.1. Ano 2017-2018

Percentagem de cadáveres parasitados: 50% (1/2)

Percentagem de infeções simples: 0%

Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

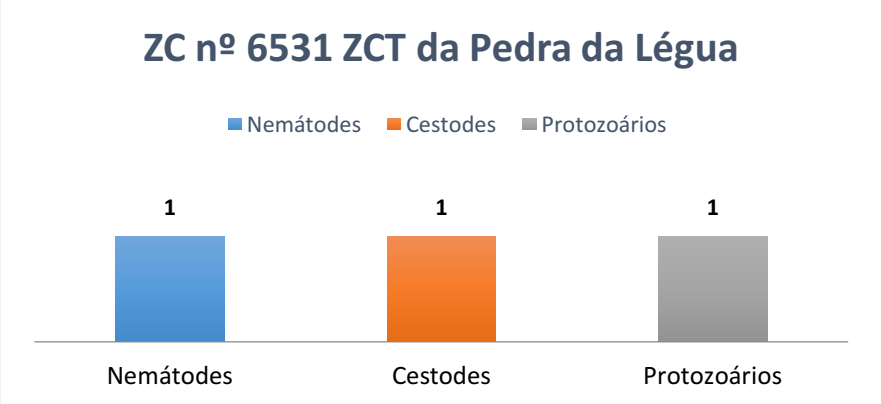
Percentagem de negativos: 50% (1/2)

Percentagem de prejudicados: 0%

No âmbito do +Coelho_1 foram identificadas grandes infestações por *Citotenia sp.* no único cadáver parasitado.



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

Cadáveres

31.2. Ano 2018-2019

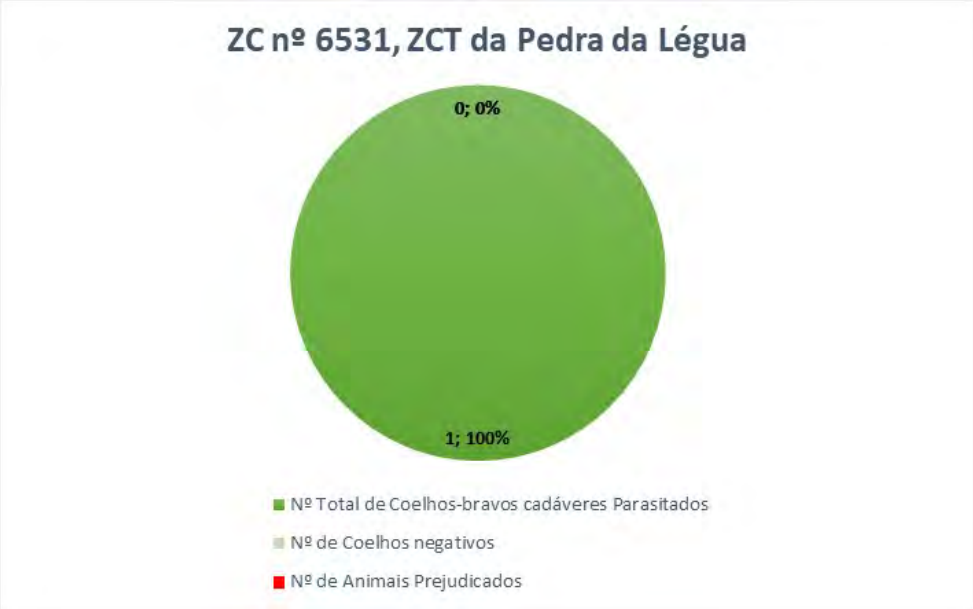
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (1/1)

Percentagem de infeções simples: 0%

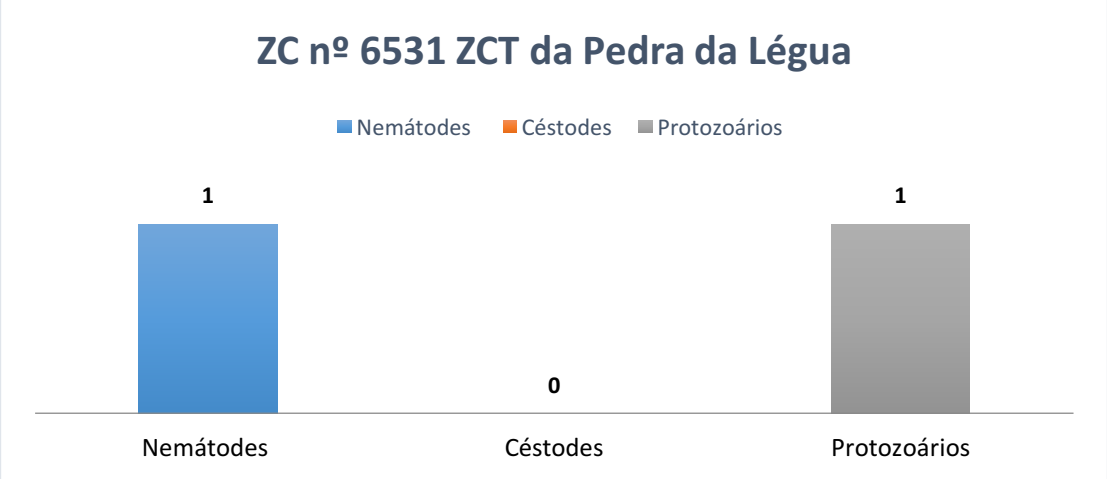
Percentagem com infeções mistas: 100% (1/1)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

32. ZC nº 3246/5560 ZCM das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça

Alpiarça/Almeirim, Santarém, Alentejo

Cadáveres

32.1. Ano 2017-2018

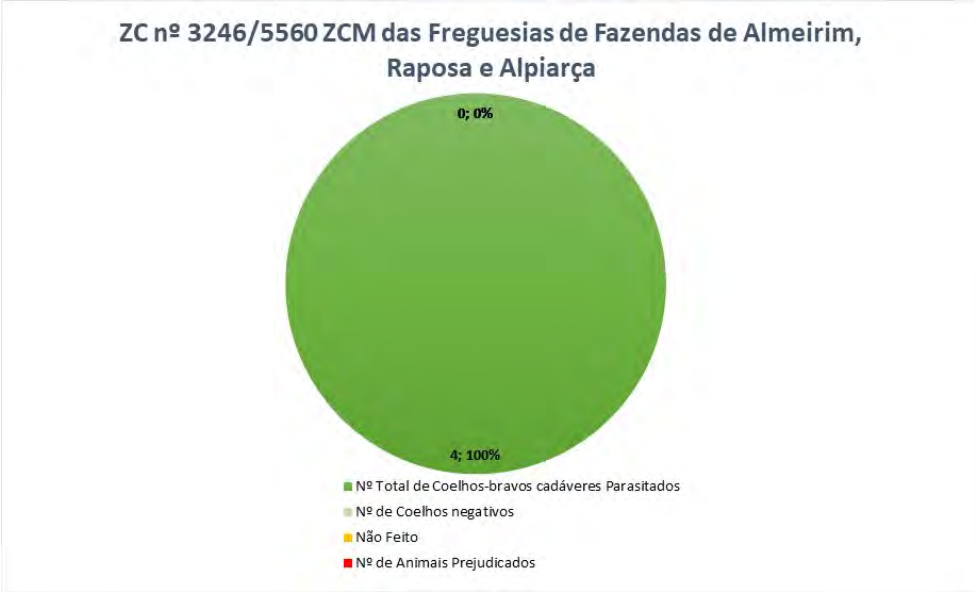
Percentagem de cadáveres parasitados: 100% (4/4)

Percentagem de infeções simples: 25% (1/4)

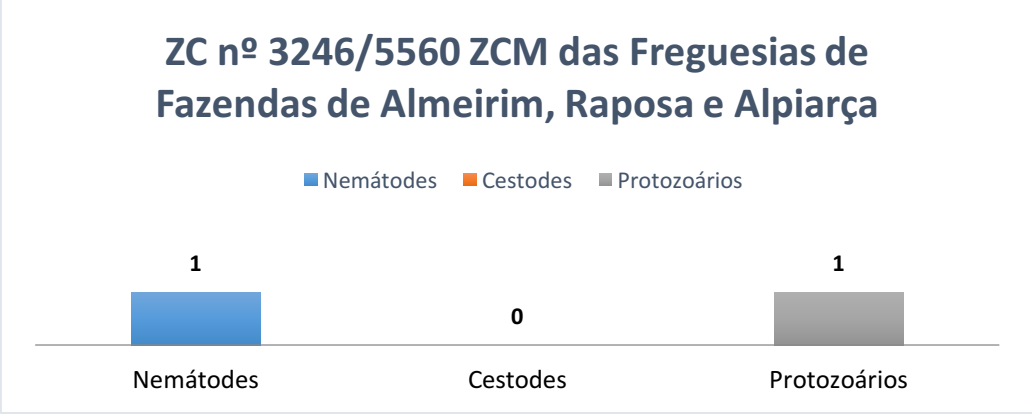
Percentagem com infeções mistas: 75% (3/4)

Percentagem de negativos: 0%

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2017-2018



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2017-2018

33. ZC nº 6894 ZCT Maruta, Pardieiro e Outras

Almodôvar, Beja, Alentejo

Cadáveres

33.1. Ano 2018-2019

Percentagem de cadáveres parasitados: 90% (9/10)

Percentagem de infeções simples: 55,5% (5/9)

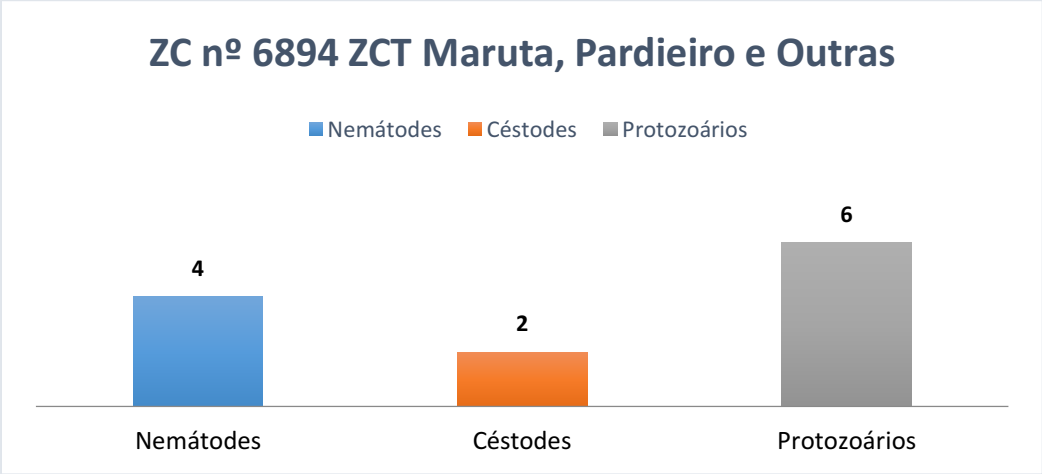
Percentagem com infeções mistas: 44,4% (4/1)

Percentagem de negativos: 10% (1/10)

Percentagem de prejudicados: 0%



Presença vs ausência 2018-2019



Percentagens relativas de cada tipo de parasitas em 2018-2019

Caçados:

Foi oi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 5 ténias de coelho-bravo no âmbito do +Coelho_1, correspondendo a 13,2% (5/38).

Zonas de caça de onde apenas foram recebidos parasitas de animais caçados

34. ZC nº 385 ZCT Várzea

Ponte de Sôr, Portalegre, Alentejo

Caçados

Foi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 3 ténias de coelho-bravo (+Coelho_2) correspondendo a 30% (3/10).

35. ZC nº 1144 ZCT Corte Gafo

Mértola, Beja, Alentejo

Caçados

Foi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 4 ténias de coelho-bravo (+Coelho_1) correspondendo a 8,5% (4/47).

36. ZC nº 2193 ZCA do Cerro da Cabeça

Tavira, Faro, Algarve

Caçados

Foi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 2 ténias de coelho-bravo (+Coelho_1) 4,7% (2/43).

37. ZC nº 2207 ZCT Quinta do Duque

Viana do Alentejo, Évora, Alentejo

Caçados

Foi observado parasitismo em animais caçados: foi entregue 1 ténia de lebre (+Coelho_1) correspondendo a 50% (1/2).

38. ZC nº 4296 ZCA dos Martuços

Silves, Faro, Algarve

Caçados

Foi observado parasitismo em animais caçados: foram entregues 7 ténias no âmbito do +Coelho_1. Duas de coelho-bravo correspondendo a 11,8% (2/17). Cinco de lebre correspondendo a 20% (5/25) e um cisticerco de lebre correspondendo a 4% (1/25).

Anexo IV-C

Relatório dos exames coprológicos pré-desparasitação realizados em três Zonas de Caça aderentes ao Projeto +Coelho

Relatório dos exames coprológicos pré-desparasitação

realizados em três Zonas de Caça aderentes ao Projeto +Coelho,

no âmbito do Ensaio de Desparasitação, que operacionaliza

a Medida 7.5. do Projecto +Coelho 2, intitulada "*Melhoria da condição física dos animais: administração de ração não-medicamentosa e de ração medicamentosa em zonas de caça selecionadas*"

Objetivo

Este estudo piloto pretendeu avaliar a ocorrência de infeções parasitárias e quantificar as cargas parasitárias em populações de coelho-bravo de Zonas de Caça identificadas pelas Organizações do Setor da Caça parceiras (FENCAÇA, ANPC, CNPC), por forma poder estimar-se corretamente a eficácia das medidas de desparasitação que forem subsequentemente implementadas, por comparação dos valores obtidos após desparasitação.

Critério de escolha dos locais de colheita

As colheitas foram efetuadas em **zonas de caça** pertencentes às três Organização do Setor da Caça (OSC) e identificadas como aderentes ao Projeto +Coelho2. Foi recomendada a identificação de duas Zonas de Caça por OSC, onde tivessem sido detetadas cargas parasitárias elevadas no decurso da avaliação sanitária efetuada pelo Projeto +Coelho 1 e +Coelho 2. Foi providenciado um relatório contendo os dados parasitológicos para assistir a esta escolha disponível em *link*.

Método de recolha

Em cada ZC foram identificados **quatro locais** distanciados entre si, potencialmente ocupados por subpopulações distintas de coelho-bravo. As colheitas foram efetuadas separadamente nestes quatro locais da zona de caça. Em cada dia de colheita foram reunidos 4 sacos por ZC.

Periodicidade de colheita

Foram efetuadas colheitas mensais, durante 3 meses (dezembro, janeiro e fevereiro/março).

Zonas de caça selecionadas; Locais de colheita; Dias de colheita

ZCA 4 Herdade da Abrunheira, Paço de Aragão e Outras, Distrito de Évora, Concelho de Montemor-o-Novo.

Locais de colheita: Galinhas, Mato, Ciborro, Horta

Dias de colheita: 17.12.2019; 22.01.2020; 11.03.2020.

ZCT 5671 MONTE DE CIMA, Distrito de Évora, Concelho de Estremoz.

Locais de colheita: Arrife Pego, Monte Cima, Palheiro, Álamo

Dias de colheita: 18.12.2019; 21.01.2020; 11.03.2020.

ZCA 1512 BENESPERA, Distrito da Guarda, Concelho da Guarda.

Locais de colheita: 1 (parque de criação exterior) ,2 (parque de criação exterior), 3 (1º compartimento), 4 (pavilhão)

Dias de colheita: 19.12.2019; 20.01.2020; 27.02.2020.

Codificação das Zonas de Caça participantes

As zonas de caça foram codificadas por atribuição arbitrária das designações ZC1, ZC2, ZC3. Os locais foram codificados como ZC1/1 a ZC1/4, ZC2/1 a ZC2/4 e ZC3/1 a ZC3/4.

Metodologia laboratorial

As análises coprológicas foram efetuadas no Laboratório de Parasitologia do INIAV, para identificação e quantificação de 3 grupos de parasitas. Uma quantidade de fezes (5 g) foi homogeneizada e testada pelo método de flutuação utilizando o Mini-FLOTAC.

Protozoários (Coccídeas)

Nos lagomorfos, nomeadamente o coelho-bravo, são hospedeiros de muitas espécies de protozoários do género *Eimeria*. Os oocistos são as formas de resistência no ambiente dessas

espécies de protozoários e são identificados pelas técnicas coprológicas de flutuação. A maioria das espécies infetam as células da mucosa intestinal, mas nos lagomorofos da família Leporidae há uma espécie, a *Eimeria stiedae* que infeta as células dos canalículos biliares. A identificação de infeções mistas por duas ou mais espécies de *Eimeria* é muito frequente.

Nemátodes

Várias espécies de nemátodos têm sido identificadas no decurso de exames parasitológicos efetuados na sequência de necrópsias realizadas a coelhos-bravos, nomeadamente *Graphidium strigosum*, *Dermatoxys veligera*, *Passalurus ambiguus*, *Trichostrongylus retortaeformis*, *Trichurus leporis* e *Nematodirus* spp.. As análises coprológicas permitem apenas identificar grupos de parasitas, nomeadamente das famílias Trichostrongylidae, Oxyuridae e Strongyloididae. Os nemátodos do género *Nematodirus* (família Trichostrongylidae), devido às características dos seus ovos, são facilmente identificados nestas análises. À exceção de *Nematodirus* spp., os resultados da contagem de nemátodes são apresentados em número de ovos de Estrongilídeos gastrointestinais.

Céstodes

Os cestodes são também identificados através das análises coprológicas, não sendo, contudo, fácil a identificação ao nível do género ou espécie.

Limitações do ensaio

1. Foram analisadas 3 ZC e não 6, como previsto.
2. As análises efetuadas permitiram apenas quantificar o número total de oocistos ou de ovos, ou seja, a soma de oocistos ou de ovos de todas as espécies presentes na amostra.
3. As amostras de fezes processadas neste ensaio, representam grupos de animais, cujo número de indivíduos (coelhos), não é determinado.

Resultados

Os dados mais consistentes e relevantes, foram revelados pelas contagens de oocistos por grama de fezes (opg), observando-se infeções relevantes nas três zonas de caça em várias colheitas (Gráfico 1). Com efeito, verificaram-se valores elevados de oocistos (>500) na primeira colheita, efetuada em dezembro de 2019 nas 3 zonas de caça em estudo (ZC1/1, ZC2/1, ZC3/1, colunas azuis). Nas colheitas seguintes, as cargas parasitárias foram inferiores, embora na ZC3 superaram quase sempre os 500 oocistos por grama de fezes. Na ZC1 e na ZC3, as infestações por *Eimeria* aproximaram-se ou ultrapassaram 2000 oocistos por grama de fezes.

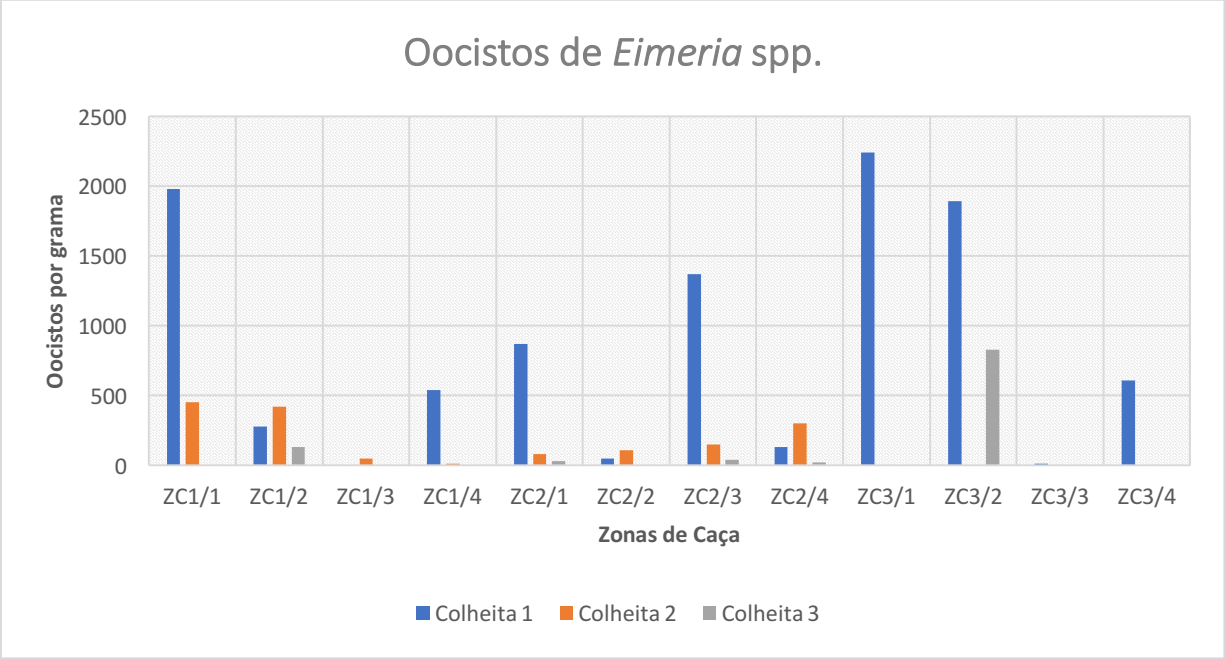


Gráfico 1. Contagem de oocistos de *Eimeria* spp.

A análise coprológica revelou uma baixa contagem de ovos de nemátodes (Gráfico 2), particularmente de ovos de estrongilídeos gastrointestinais (EGI). Apenas em uma análise (ZC2, janeiro de 2020) se observou uma grande carga parasitária no grupo de animais de onde foram colhidas as amostras.

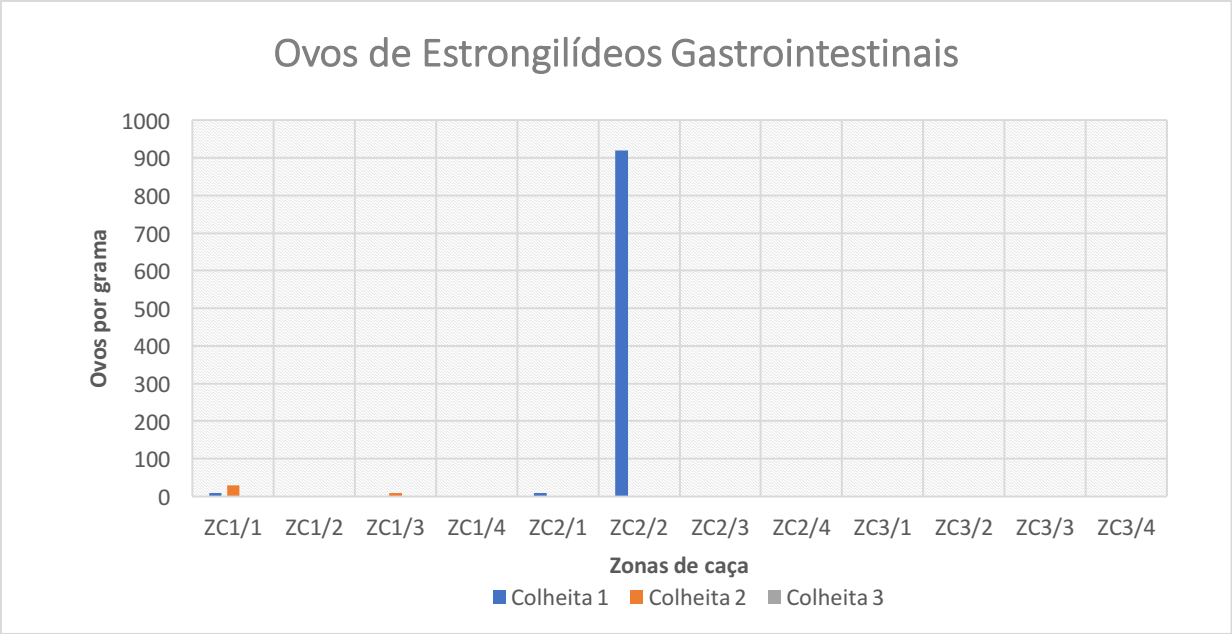


Gráfico 2. Contagem de ovos de Estrongilídeos gastrointestinais.

Os *Strongyloides* spp. (Gráfico 3) são os nemátodes gastrointestinais cujos ovos foram observados com maior frequência, particularmente nas ZC1 e ZC2. Não foram identificados na ZC3.

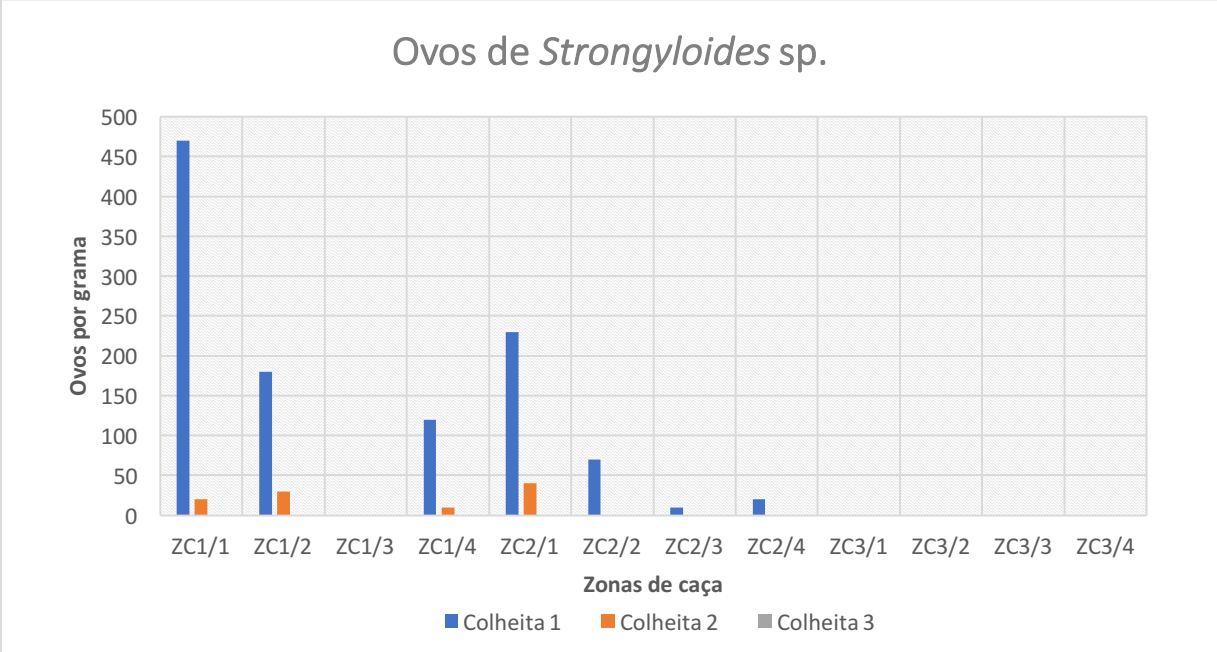


Gráfico 3. Contagem de ovos de *Strongyloides* sp.

Foram observados ovos de *Nematodirus* em todas as ZC (Gráfico 4.). Destacou-se a ZC3, onde foram observados nas várias colheitas. As contagens foram sempre baixas, nunca passando os 50 opg. Num dos pontos de colheita da ZC3, foram identificados em duas das colheitas.

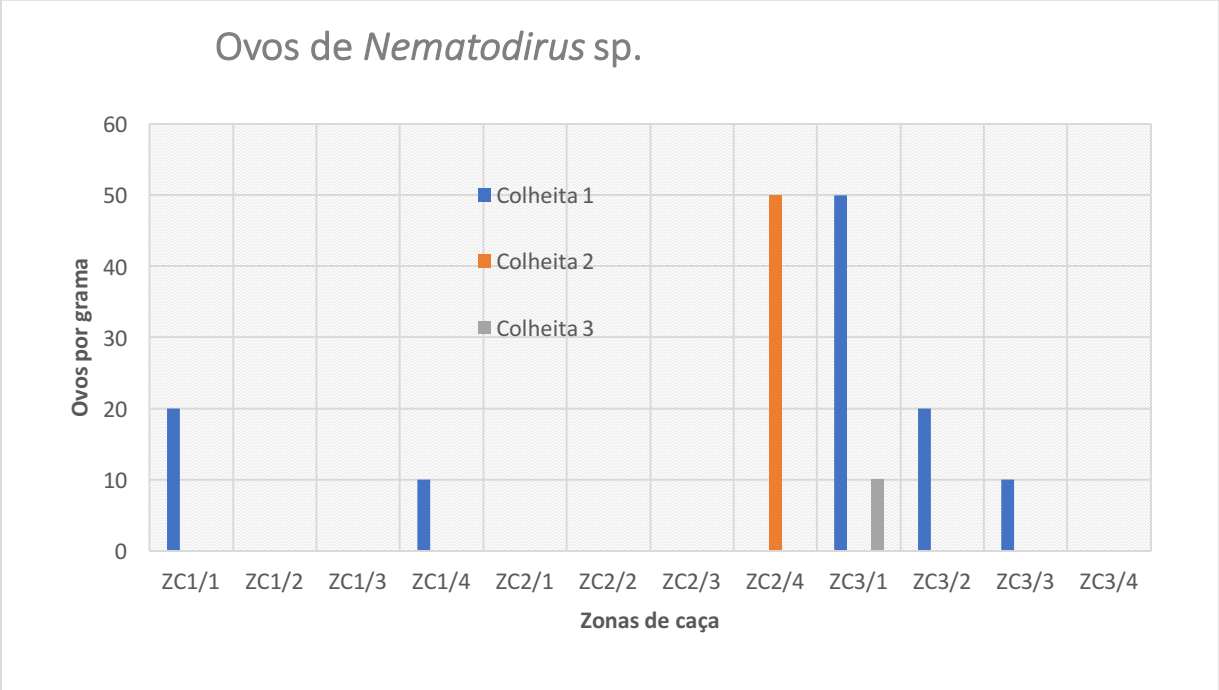


Gráfico 4. Contagem de ovos de *Nematodirus* sp.

Apesar de existirem evidências de grande parasitismo por cestodes nos coelhos caçados de algumas zonas de caça, análises coprológicas efetuadas nas 3 ZC selecionadas para este ensaio piloto, não evidenciaram níveis de parasitismo preocupantes por ténias.

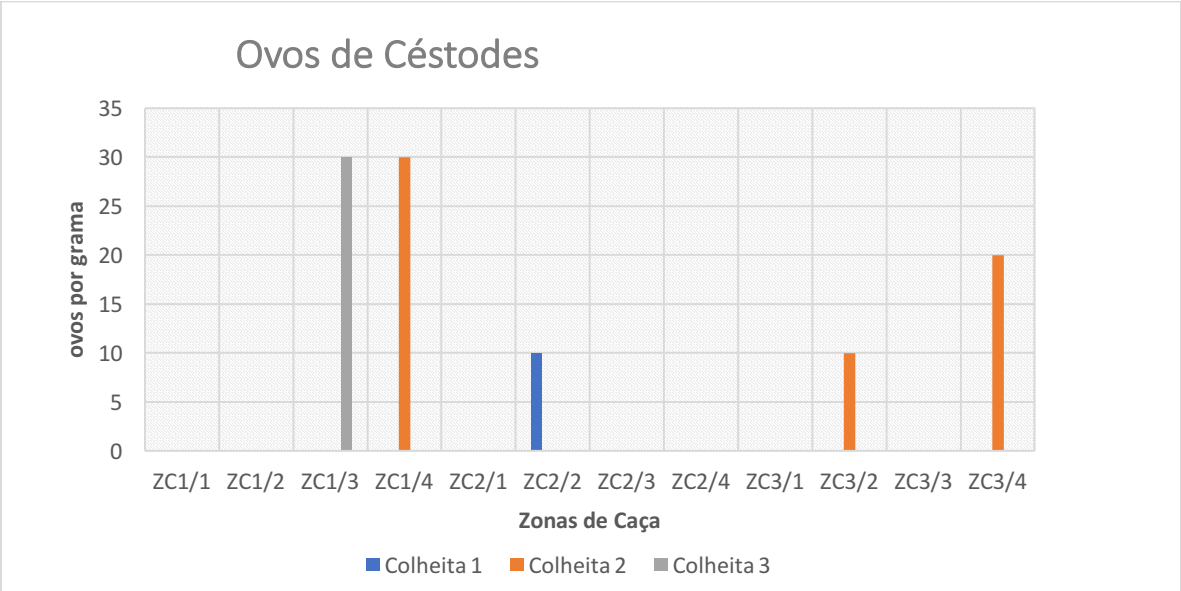


Gráfico 5. Contagem de ovos de Céstodes

Considerações sobre a amostragem

As amostras recolhidas representam um grupo desconhecido de animais, tanto em número como em classe etária, não existindo garantias de que sejam apenas originarias de coelho-bravo. Como foram testadas amostras de grupo, poderá ter-se verificado o efeito de diluição, i.e., os animais com cargas parasitárias elevadas e eventualmente com potencial patogénico, poderão não ter sido identificados, pelo facto de as suas fezes terem sido misturadas com as de outros animais da mesma população, com menos parasitas. Este fenómeno poderá explicar que, em ZC em que se sabia haver animais muito parasitados, as análises coprológicas terem dado contagens baixas, por haver muitos animais pouco parasitados e poucos muito parasitados. No entanto, se a colheita representa fezes de muitos animais, e as contagens de parasitas são elevadas, pode concluir-se que haverá muitos animais parasitados.

Conclusões e recomendações

Não obstante a heterogeneidade das cargas parasitárias ao longo do tempo, os resultados deste diminuto estudo piloto, corroborados pelos dados das necrópsias, sugerem que a coccidiose ocorra de forma generalizada nas populações de coelhos-bravos nas várias zonas de caça do nosso país. Pelo contrário, a ocorrência de outros parasitas, nomeadamente de nemátodos e cestodes parece ser irregular no território português, e de acordo com o que é possível extrapolar dos locais amostrados, não justificam por isso a desparasitação sistemática das populações silvestres para estes grupos de parasitas.

Os resultados deste ensaio piloto ***justificam assim a desparasitação periódica para protozoários, mas não para cestodes e nemátodos***.

A desparasitação permitirá dar continuidade a este ensaio.

10 de abril de 2020

Jacinto Gomes
(Laboratório de Parasitologia / UEISPSA-INIAV)

Margarida Duarte
(Coordenadora do Projeto + Coelho 2)

Anexo IV-D

Protocolo de Recolha de Fezes para Exame Parasitológico

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS

PROJECTO +COELHO 2

MEDIDA 7.5. Melhoria da condição física dos animais: administração de ração não- medicamentosa e de ração medicamentosa em zonas de caça selecionadas

PROTOCOLO DE RECOLHA DE FEZES PARA EXAME PARASITOLÓGICO

Este estudo pretende avaliar a ocorrência de infeções parasitárias assim como efetuar a quantificação das cargas parasitárias nas populações de coelho-bravo. Uma boa avaliação destes parâmetros permitirá estimar corretamente a eficácia das medidas a implementar no âmbito do Projeto +Coelho 2, com vista à redução do parasitismo e consequente melhoria da condição física dos animais.

1 LOCAIS DE COLHEITA DE FEZES

1.1. As colheitas deverão ser efetuadas em **duas zonas de caça** por Organização do Setor da Caça, de preferência onde foram detetadas cargas parasitárias elevadas no decurso da avaliação sanitária do Projeto +Coelho 1 e +Coelho 2.

1.2 Em cada ZC devem ser identificados **quatro locais** distanciados entre si, correspondentes a subpopulações de coelho-bravo. As colheitas deverão ser efetuadas separadamente nestes quatro locais da zona de caça (latrinas), de modo a recolher-se fezes de diferentes populações (4 sacos por dia de colheita por ZC).

1.3 Nas quatro áreas selecionadas, as populações deverão estar habituadas a consumir ração, que será o veículo dos antiparasitários em teste.

1.4 Deverá haver alguma garantia de que as fezes recolhidas pertencem a um grupo de animais, para que posteriormente à desparasitação se possa relacionar os animais que ingerem a ração medicamentosa com as fezes por eles eliminadas.

2 PERIODICIDADE E PERÍODO DA RECOLHA

2.1. Serão feitas colheitas **mensais**, de preferência no mesmo dia, durante 3 meses consecutivos (novembro, dezembro e janeiro) antes da desparasitação, e novamente (3 meses) depois da desparasitação.

3 PROCEDIMENTO DE RECOLHA DE FEZES

3.1. Abrir um saco de plástico, de preferência transparente;
3.2. Calçar uma luva, ou alternativamente, introduzir a mão num segundo saco de plástico;
3.3. Recolher fezes de coelho-bravo, de preferência recentes, para o saco de plástico, até perfazer o equivalente ao volume de uma caneca; deverá recolher fezes dos, sempre que possível;
3.4. Fechar o saco de plástico com as fezes com um nó.
3.5. Introduzir a Ficha de Identificação do material (preenchida, dobrada e colocada dentro da bolsa), dentro de um outro saco, juntamente com as fezes; fechá-lo com um nó.
3.6. Guardar as fezes no frio (+4ºC), até à sua entrega num dos pontos de recolha assinalados no verso desta folha.

4 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

4.1. Todas as amostras fezes deverão ser acompanhadas pela respetiva Ficha de Identificação preenchida.

4.2. Deverá também registar a informação relativa a todas as colheitas numa tabela resumo (em anexo), a ser entregue ao INIAV no final do ensaio, que corresponderá a cada Zona de Caça em estudo. Na tabela deverá constar a informação solicitada, nomeadamente a data de colheita e o tipo de fezes (frescas, semi-frescas e secas) recolhidas em cada um dos quatro pontos selecionados por ZC. A localização dos quatro locais selecionados em cada ZC, deve ser identificado em mapa Google, anexado à tabela resumo, ou alternativamente indicado pelas respetivas coordenadas geográficas.

5 PONTOS DE ENTREGA (dias úteis)

5.1 As amostras devem ser entregues no espaço de uma semana no Polo de Oeiras do INIAV. Caso seja mais conveniente podem também ser entregues no Polo de Vairão ou no Polo de Évora.

1 – Oeiras - INIAV - Sede - *Campus* Oeiras
Av. da República, Quinta do Marquês | 2780 - 157 OEIRAS
Tel.: 214 403 500
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: maiscoelho@iniav.pt ; margarida.duarte@iniav.pt

2 – Vairão - INIAV- Laboratório Nacional de Referência de Segurança Alimentar
Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena
4485-655 Vairão - VILA DO CONDE | Tel.: 252 660 600
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: zulmira.lopes@iniav.pt; monica.cunha@iniav.pt

3 – Évora - Laboratório de Veterinária de Évora
Quinta do Pomarinho - Estrada das Alcaçovas, Km9
7000-090 ÉVORA | Tel.: 266 752 028
Contacto: patricio.nuncio@iniav.pt



PRECAUÇÕES IMPORTANTES:

- As fezes devem se conservadas no frigorifico sem serem congeladas porque a congelação compromete as análises parasitológicas.
- As fezes não devem ser manuseadas com as mãos.

Anexo IV-E

Ficha de Identificação da Amostra de Fezes para Exame Parasitológico

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS EM PORTUGAL

(Despacho nº 4757/2017 de 31 de Maio)

PROJECTO +COELHO 2

Medida 7.5. Melhoria da condição física dos animais: administração de ração não-medicamentosa e de ração medicamentosa em zonas de caça selecionadas

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE FEZES PARA EXAME PARASITOLÓGICO

REMETENTE

Nome do coletor:

Contacto (telefone/telemóvel): E-mail:

Caçador: Gestor: Guarda: Outro:

LOCAL

Localidade:

Freguesia: Concelho: Distrito:

Coordenadas GPS: Latitude Longitude

Zona de Caça: Número Nome

Tipo de Zona de Caça: Associativa Municipal Turística Nacional Outro local:

INFORMAÇÃO SOBRE AS FEZES RECOLHIDAS

Data de recolha da amostra de fezes:

Identificação da Zona de Caça onde é feira a recolha (Código da Zona de Caça | Número da amostra):

Espécie a que pertencem as fezes: Coelho-bravo ☐ Existem vestígios de Lebre? ☐

Observação no local: Fezes abundantes: ☐ Fezes escassas: ☐

Condições das fezes: Frescas ☐ Semi-frescas ☐ Secas ☐

Outras observações:

Data de preenchimento do formulário:

Anexo IV-F

Ficha de Registo de Colheitas por Zona de Caça

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS EM PORTUGAL

(Despacho nº 4757/2017 de 31 de Maio)

PROJECTO +COELHO 2

Medida 7.5. Melhoria da condição física dos animais: administração de ração não-medicamentosa e de ração medicamentosa em zonas de caça selecionadas

EXAME PARASITOLÓGICO

FICHA DE REGISTO DE COLHEITAS POR ZONA DE CAÇA

ZONA DE CAÇA

Código da Zona de Caça:

Localidade:

Freguesia: Concelho: Distrito:

Coordenadas GPS: Latitude Longitude

RESPONSÁVEL LOCAL PELO ENSAIO

Nome:

Função na OSC:

Telefone: Contacto:

	Local de colheita 1			Local de colheita 2			Local de colheita 3			Local de colheita 4			Operador/Contacto
	Descrição ou coordenadas			Descrição ou coordenadas			Descrição ou coordenadas			Descrição ou coordenadas			
Data	**F**	**SF**	**S**	**F**	**SF**	**S**	**F**	**SF**	**S**	**F**	**SF**	**S**	
COLHEITAS PRÉ-DESPARASITAÇÃO													
COLHEITAS PÓS- DESPARASITAÇÃO													

Indicar, com uma cruz, se as fezes de cada colheita e em cada local são frescas (F), semi-frescas (SF) ou secas (S).

Anexo V-A

Dossier Técnico

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
(INIAV, I.P.)





DOSSIER TÉCNICO

PRODUÇÃO DE LOTE DE VÍRUS DA MIXOMATOSE, ISOLADO DE CADÁVER DE LEBRE POSITIVA, IRREVERSIVELMENTE INATIVADO POR β- PROPRIOLACTONA PARA UTILIZAÇÃO COMO CONTROLO POSITIVO NO ENSAIO DE VACINAÇÃO DE LEBRES (MEDIDA 7.6 DO PROJETO +COELHO 2)

Este Dossier Técnico descreve os métodos de ISOLAMENTO, MULTIPLICAÇÃO, INACTIVAÇÃO IRREVERSÍVEL e de CONTROLO de Vírus da Mixomatose de Lebre-Ibérica, isolado em células de linha RK13, a partir de material biológico de um animal diagnosticado positivo a mixomatose em outubro de 2018.

Este lote de vírus inativado será EXCLUSIVAMENTE UTILIZADO como controlo positivo num ensaio de vacinação (medida 7.6 da Memória Descritiva do Projecto +Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal, Código do projeto:2019014300001), que pretende avaliar a eficácia de vacinas comerciais desenvolvidas para coelho doméstico, em lebre-ibérica.

Pretende-se com este ensaio esclarecer se estas ferramentas podem ser úteis no controlo da mixomatose nesta espécie, uma vez que a mixomatose constitui atualmente a maior causa de mortalidade em lebre-ibérica em Portugal.

Todas as etapas de produção são desenvolvidas no Laboratório de Virologia do INIAV (UEISPSA, Oeiras), o LNR de Portugal para as doenças dos animais.

O Projecto +Coelho 2 é financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

OEIRAS, Março de 2020

1. Matérias-primas utilizadas

1.1 Matérias-primas de origem biológica. Todas as matérias-primas de origem biológica utilizadas neste ensaio, à exceção da estirpe viral, são produtos comercializados na Europa ou nos Estados Unidos, e, caso se aplique como é o caso do soro fetal de bovino (FBS), cumprem o disposto na "*Guideline for Minimising the Risk of Introducing Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents Through Vetertinary Biologicals*".

1.1.1. Vírus da mixomatose

A estirpe viral utilizada foi obtida a partir da pálpebra da primeira lebre-ibérica diagnosticada positivamente a mixomatose nos LNR do INIAV, e que teve o número de análise PAT-18-34622.

1.1.2. Células de Linha

Para o isolamento do vírus da mixomatose foram utilizadas células de linha de rim de coelho, RK13 (ATCC CCL 37).

1.1.3. Misturas de Antibióticos

As misturas de antibióticos utilizados como suplementos do meio de cultura das células RK13, são adquiridos a empresas comerciais, verificando-se todos os requisitos exigidos na legislação. São elas:

1.1.2.1. Antibiotic Antimycotic Solution (100×), stabilized with 10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin and 25 µg amphotericin B per mL, sterile-filtered, , incorporada no meio de cultura a 1:100. Gibco, nº de catalogo 15240, lote nº 2112697, (certificado nos anexos 1).

1.1.2.2. Gentaminina 50mg/ml (Gibco), suitable for cell culture, comercializado pela Thermofischer, incorporada no meio de cultura a 1:1000 nº de catalogo 15750, lote nº2097845 (certificado nos anexos 1).

1.1.4. Solução de Tripsina. Solução 0,25% trypsin EDTA Gibco, nº de catalogo 25200-072, lote 2120649 (certificado nos anexos 1)

1.1.5. Soro Fetal de Bovino

Heat-inactivated (HI) fetal bovine serum incorporado no meio de cultura a 5-10% para cultivo de células e 2% para adsorção de vírus. Gibco, nº de catalogo 10500, lote nº 2036254K (certificado nos anexos 1).

1.2. Materias-primas de origem não-biológica

1.2.1 Meio de Cultura Dulbecco (DMEM-Dulbecco Modified Eagle Medium), Gibco, preparado nos Laboratórios do INIAV. O pH é ajustado a 7,0 ±0,2, filtrado por filtro 0,2µm estéril e conservado numa câmara frigorifica reservada a materiais não infetados (Câmara N1, Ep.38.1). Nº de catalogo 12800-82, lote nº 2090484 (registo de preparação nos anexos 1).

1.2.2. Tampão PBS. O tampão PBS (Fosfato salino) é preparado nos Laboratórios do INIAV, como descrito no Modelo Mod.G-024/1-PBS (registo de preparação nos anexos 1, sendo conservado numa câmara frigorifica reservada a materiais não infetados (Câmara N1; Ep.38.1).

1.2.3. β-Propiolactone 97% (CAS Number 57-57-8). **(**3-Hydroxypropionic acid lactone ou Hydracrylic acid β-lactone), Grade II, marca Sigma-Aldrich.
Certificado de análise na secção dos Anexos 1.

1.2.4. Saponina. SAPONIN (CAS 47036-50G-F), lote nº BCCB1055, SIGMA, comercializado pela MERCK, aprovado e usado como adjuvante em vacinas de âmbito de investigação. Incorporada na concentração final de 2mg/ml de dose vacinal.
Satisfaz o disposto no Regulamento (CE) nº 2377/90 de 26 de junho de 1990, que no que toca aos limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal.
Certificado de análise nos Anexos 1.

1.3 Materiais descartáveis

Garrafas de cultivo de células

-Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks, T25, filter CAS 156367 Thermofischer

-Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks, T175, filter CAS 159910 Thermofischer

Placas de 96 poços,

-Nunc™ Edge 2.0 96-Well Plates. 0.35cm2/well. Nunclon Delta Surface Treatment. Nunclon Delta certified for monolayer formation, cloning efficiency, non-cytotoxic, non-pyrogenic, and sterilityIndivually Wrapped. CAS 167425. Thermofischer.

Pipetas descartáveis

-Individually Wrapped, plastic film packaging, plugged, 5ml CAS 170366 Thermofischer

-Individually Wrapped, plastic film packaging, plugged, 10 ml CAS 170356 Thermofischer.

1.4 Equipamentos

1.4.1 Estufa New Brunswick Galaxy 170 S, S7/43 (sala 59) e New Brunswick Galaxy 170 S, S.7/42 (Sala 39);

1.4.2 Centrifuga Heraeus Multifuge-XIR, S5/22 (Sala 60);

1.4.3 Ultracentrifuga Beckman, Otima LE-80K, Ep.36.4 (Sala 36);

1.4.4 Microscópio Olympus CK 2, Ep.39.1(sala 59) e Olympus CK2 S.7/20 (Sala 39);

1.4.5 Termociclador Biorad C1000 Thermal Cycler, S2.34/35 (Sala 46).

2 Declaração de conformidade com os requisitos TSE(s)

Apenas aplicável ao SFB, referido no ponto 1.1.4

3 Estirpe viral a utilizar como Controlo Positivo do Ensaio

A estirpe viral utilizada foi obtida a partir da primeira lebre-ibérica diagnosticada positivamente a mixomatose nos LNR do INIAV, e que teve o número de análise PAT-18-34622. Esta lebre fêmea, detetada com lesões nodulares e edema das pálpebras e região perianal, foi caçada numa zona de caça do distrito de Évora. O resultado foi comunicado à DGAV. O evento foi reportado à OIE pela DGAV.

Link para o reporte de mixomatose em lebre em Portugal:
https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=28628

4 Técnicas Laboratoriais

4.1. Isolamento de vírus

O isolamento do vírus foi efetuado no âmbito do diagnóstico virológico, no Laboratório de Virologia do INIAV, de acordo com o descrito no SOP#1 (página 29).

4.2. Manutenção de culturas celulares

A manutenção das culturas celulares de RK13 é efetuada pela metodologia descrita na Procedimento Operativo *PO-03-PSA/VIR Preparação e* manutenção de culturas celulares para diagnóstico Virológico do Laboratório de Virologia do INIAV (Anexo 2).

4.3. Propagação/Manutenção da estirpe vacinal

Células RK13 são cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e antibióticos (Sala 59). Quando atingem 80% de confluência, são transferidas para a Sala 40 do BSL-3, onde o meio é removido e é adicionado o inóculo viral (em volume suficiente para cobrir a garrafa ou placa). Este é deixado a adsorver durante 60 min, com agitação a cada 20 min. É então adicionado meio de cultura DMEM contendo 5% de SFB. As células são incubadas até aparecimento de ECP (Efeito citopático). Todo o procedimento de manipulação de vírus e células infetadas é realizado em câmara de fluxo laminar vertical presente nas salas referidas.

4.4. Purificação do vírus

Células RK13 infetadas, recuperadas por raspagem em meio sem soro (10 ml por garrafa /175 cm^2), são armazenadas em Tubos Falcon de 15 ml e submetidas a 3 ciclos de congelação-descongelação a -20ºC. A suspensão é então clarificada a 1500 g durante 10 min e o vírus recuperado do sobrenadante por ultracentrifugação a 30000g, 60 min. O sedimento contendo as partículas virais é ressuspendido em Tampão PBS estéril e conservado a -80ºC no Biobanco do INIAV).

4.5. Titulação do vírus

O vírus é titulado pelo método de diluição limite, nomeadamente pela determinação da $TCID_{50}$. A dose infeciosa 50% para cultura de tecidos ($TCID_{50}$/mL) quantifica a quantidade de vírus necessária para produzir ECP em 50% das culturas inoculadas.

Para tal são preparadas diluições seriadas na base 10 de vírus em meio de cultura DMEM sem soro. As células, cultivadas em placas de 96 poços nas condições acima descritas, são infetadas com as diferentes diluições e incubadas a 37ºC em atmosfera com 5% de CO_2.

Após a incubação, que pode estender-se a 7 dias, a percentagem de morte celular (evidenciado pelo ECP) é observada e registrada manualmente para cada diluição do vírus, e os resultados são usados para calcular o valor de TCID50, por recurso ao método Reed-Muench.

4.6. Inativação do vírus

A inativação do vírus da mixomatose é efetuada com β-Propiolactone 97% (CAS Number 57-57-8). SOP#4 na página 34.

5. Controlo da estirpe Vacinal

Não aplicável

6. Meios de cultura utilizados para a identificação, conservação e controlo (ex. indicar a composição quantitativa do meio, o método de preparação, incluindo procedimento de esterilização, controlos efetuados nos meios preparados no laboratório); ***Não aplicável***

6. **Processo de mistura**

A saponificação da vacina será efetuada por agitação lenta durante 30 minutos da suspensão de vírus inativado com Saponin vaccine adjuvant – na concentração final de 2mg/ml;

8. Volume máximo de cada lote/mistura; ***Não aplicável***

9. Ensaios de controlo no produto final

O produto final será avaliado quanto à inativação irreversível do vírus pela inoculação de células RK13 (duas placas de 96 poços). A ausência de efeito citopático, é indicativo de ausência de vírus infecioso. No entanto, a ausência de multiplicação residual de vírus será também confirmada por Imunofluorescência Indireta.

Serão efetuados testes de esterilidade por inoculação de meios de cultura líquidos e sólidos para confirmação de ausência de contaminação bacteriana por bactérias aeróbicas e anaeróbicas.

ANEXOS 1

FICHAS TÉCNICAS DE PRODUTOS
e
CERTIFICADOS DE ANÁLISE

gibco

Certificate of Analysis

Antibiotic-Antimycotic (100X), liquid
Prepared with 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 ug/mL streptomycin sulfate, and 25 ug/mL amphotericin B in 0.85% saline.

Catalog Number:	15240
Lot Number:	2112697
Storage Temperature:	-5 to -20C
Expiration Date:	2020-11

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
[1] Osmolality	>=305 to <=350	323	mOsm/kg
[2] pH	>=5.2 to <=7.0	6.0	
[3] Sterility	Negative	Negative	

Read SDS.

Maria J. Micale

Quality Systems Department Date: 04-Dec-20

REFERENCES:

1 Thermo Fisher Scientific Specifications.
2 Thermo Fisher Scientific Specifications.
3 Current Edition of USP, Thermo Fisher Scientific Modified.

Life Technologies Corporation
3175 Staley Rd., Grand Island, New York 14072, United States

gibco

Certificate of Analysis

FBS, Qualified, Heat Inactivated
Origin: Brazil

Catalogue Number: 10500
Lot Number: 2036254K
Expiration Date: 2023-05

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
a01 Bacterial	Negative	Negative	
a02 Fungal	Negative	Negative	
a04 Mycoplasma	Negative	Negative	
a15 BVD	Tested	Tested	
a25 PI3	Negative	Negative	
a35 IBR	Negative	Negative	
a96 Endotoxin	0.000 to 50	0.400	EU/mL
b01 pH	6.90 to 7.80	7.43	pH Units
b02 Osmolality	280 to 340	313	mOs/kg H2O
c01 Albumin	1.70 to 3.50	2.16	g/100mL
c02 Alpha Globulin	0.70 to 2.00	1.54	g/100mL
c03 Beta Globulin	0.30 to 0.90	.31	g/100mL
c04 Gamma Globulin	10.00 to 200.00	35.35	ug/mL
c05 Total Protein	3.50 to 5.50	4.00	g/100mL
c06 Haemoglobin	1.00 to 30.00	15.39	mg/100mL
c07 Electro Profile	Typical	Typical	
d01 CE	0.70 to 1.40	1.00	
d02 PE	0.70 to 1.40	1.16	
d03 Diploid Growth	0.70 to 1.40	1.00	
d04 Toxicity	Satisfactory	Satisfactory	
d05 Rel Myel/Hybrid	0.70 to 1.40	1.01	
q01 Documentation	Satisfactory	Satisfactory	
q02 Appearance (Liquid)	Satisfactory	Satisfactory	

gibco

Certificate of Analysis

Trypsin-EDTA (1X), liquid
.25% Trypsin with EDTA

Catalog Number:	25200
Lot Number:	2120649
Storage Temperature:	-5 to -20C
Expiration Date:	2021-10

Caution: For manufacturing, processing, or repacking.

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
[1] In-Vitro Bioassay	Acceptable	Acceptable	
[2] Mycoplasma Testing *Testing is performed on raw material Trypsin prior to use in manufacturing.*	Negative	Negative	
[3] Osmolality	>=270 to <=320	288	mOsm/kg
[4] pH	>=7.2 to <=8.0	7.4	
[5] Porcine Parvovirus Testing *Testing is performed on raw material Trypsin prior to use in manufacturing.*	Negative	Negative	
[6] Sterility Testing	Negative	Negative	

Read SDS.

Raw stock trypsin has been verified for e-beam irradiation and has tested negative for PPV, mycoplasma and PCV 1/2.

Barbara J. Schueler

Quality Systems Department Date: 29-Oct-2019

Life Technologies Corporation
3175 Staley Rd., Grand Island, New York 14072, United States

gibco

Certificate of Analysis

Dulbecco's Modified Eagle Medium
powder, high glucose
with L-glutamine
with pyridoxine hydrochloride
with 110 mg/L sodium pyruvate
without sodium bicarbonate

Catalog Number:	12800
Lot Number:	2090484
Storage Temperature:	2 to 8C
Storage Instructions:	Dark and dry
Expiration Date:	2022-03
Originated From:	2075897_P01/12800

For in vitro diagnostic use.

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
[1] Endotoxin Testing	Check & Record	<0.03	EU/mL
[2] Osmolality	>=320 to <=355	343	mOsm/kg
[3] pH before additions	>=5.9 to <=6.4	6.2	
[4] Solubility	Acceptable	Acceptable	
[5] Sp2 Toxicity Assay	Acceptable	Acceptable	

Read SDS

Barbara J Schueler

Quality Systems Department Date: 03-Apr-2019

REFERENCES:

1 Current United States Pharmacopeia, <85> Bacterial Endotoxins Test.

2 Thermo Fisher Scientific Specifications.

3 Thermo Fisher Scientific Specifications.

4 Thermo Fisher Scientific Specifications.

5 Thermo Fisher Scientific Specifications, Ref.: GIBCO Catalog. Cell Line Used: Sp2/0-Ag14 (ATCC No. CRL-1581). Test samples were evaluated for nutritional support of target cells utilizing the murine myeloma cell line Sp2/O-Ag14 (Sp2). Comparable growth rates of Sp2 cells in samples of complete test medium were obtained relative to parallel cultures grown in reference control medium.

Life Technologies Corporation
3175 Staley Rd., Grand Island, New York 14072, United States

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:	SAPONIN for molecular biology, used as non-ionic surfactant
Product Number:	47036
Batch Number:	BCCB1055
Brand:	Sigma
CAS Number:	8047-15-2
Formula:	
Formula Weight:	
Quality Release Date:	08 FEB 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	LIGHT YELLOW TO YELLOW AND LIGHT BEIGE TO BEIGE AND LIGHT BROWN TO BROWN AND YELLOW--BEIGE AND YELLOW-BROWN	LIGHT BROWN
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
THIN LAYER CHROMATOGR.	CORRESPONDS TO STANDARD	CORRESPONDS TO STANDARD
SOLUBILITY (COLOR)	YELLOW TO VERY DARK YELLOW AND LIGHT BROWN-YELLOW TO VERY DARK BROWN-YELLOW	DARK BROWN-YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY HAZY	HAZY
SOLUBILITY (METHOD)	1G IN 10ML WATER	1G IN 10ML WATER
SULFATED ASH	10 - 20 %	14.6 %
CARBON CONTENT	FOR INFORMATION	43.16 %
HYDROGEN CONTENT	FOR INFORMATION	6.10 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
MISCELLANEOUS TESTS	SAPOGENIN 8 - 25 %	14.6 %
EXTRANEOUS ACTIVITIES	DNASES, RNASES, PROTEASES, PHOSPHATASES NOT DETECTABLE	DNASES, RNASES, PROTEASES, PHOSPHATASES NOT DETECTABLE

Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

gibco

Certificate of Analysis

GENTAMYCIN (50MG/ML)
Origin : UK

Catalogue Number : 15750
Lot Number : 2097845
Expiration Date : 2021-04

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
a01 Bacterial	Negative	Negative	
a02 Fungal	Negative	Negative	
b01 pH	4.00 to 6.00	4.98	pH Units
d03 Diploid Growth	0.70 to 1.40	0.85	
d04 Toxicity	Satisfactory	Satisfactory	
q01 Documentation	Satisfactory	Satisfactory	
q02 Appearance (Liquid)	Satisfactory	Satisfactory	

Quality System Department

Date : 23-Apr-2019

Life Technologies Limited
3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA4 9RF UNITED KINGDOM

inlav

PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA/DILUENTE

UEIS:PSA
Laboratório/Sector: LNRSA-VIROLOGIA

Meio de cultura/diluente: PBS **Código: PBS**

Instrução de Preparação: Fosfato de Sódio Monobásico ($NaH_2PO_4H_2O$) - 3.45g
Hidrogeno fosfato de Sódio Dodecahidrato ($Na_2HPO_4\ 12H_2O$) - 26.80g
Cloreto de Sódio (Na CL) - 84.74g
Água destilada (H_2O) - 10000 ml.
Pesar e dissolver todos os reagentes em H_2O e perfazer o volume de 10000ml; distribuir em frascos de 1000ml.
Esterilizar por autoclave a 121°C, durante 20 minutos.
Condições de armazenamento: 2° - 8°C **Validade: 6 meses**

Data	Meio desidratado ou componentes	Lote do fabricante		Quantidade (Peso/Volume)	Refª do Equipamento [balança, Equipamento de aquecimento, Autoclave, micropipeta, potenciómetro, etc.	Lote interno			Operador	Observações
		Refª	Validade			Ref.	PH final	Qt.		
2020-01-20	$NaH_2PO_4H_2O$	A638746	-/-/-	3.45g	Balança S.9-14				[illegible]	
2020-01-20	$Na_2HPO_4\ 12H_2O$	A189879	-/-/-	26.80g	Balança S.9-14	2020-01-20			[illegible]	
2020-01-20	Na Cl	K91068804	-/-/-	84.74g	Balança S.9-14				[illegible]	
2020-01-20	Água destilada		-/-/-	10.000 ml	Proveta Agitador S 2/12				[illegible]	
			/_/_							
			/_/_							
			/_/_							
			/_/_							

Mod.G-024/1 (11.2014) *Página 1 de 1*

- Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento –

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
β-Propiolactone – Grade II, ≥99%

Product Number:	**P5648**
Batch Number:	**SLCF5742**
Brand:	SIGMA
CAS Number:	57-57-8
MDL Number:	MFCD00005169
Formula:	$C_3H_4O_2$
Formula Weight:	72.06 g/mol
Storage Temperature:	Store at -20 °C
Quality Release Date:	04 FEB 2020



Test	Specification	Result
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Proton NMR	≥ 90 %	≥ 97 %
Purity (GC)	≥ 90 %	98 %

Carolyn Baird, Supervisor
Quality Assurance
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

FORMULÁRIO PARA PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO DE PROJETO DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

Este formulário inclui sete secções:

- **Secção 1**: Detalhes administrativos sobre o projeto, pessoas e estabelecimentos envolvidos
- **Secção 2**: Informações sobre o projeto
- **Secção 3**: Objetivos e benefícios potenciais do projeto
- **Secção 4**: Informações sobre os animais
- **Secção 5**: Informações sobre os procedimentos e o desenho experimental
- **Secção 6:** Resumo não técnico do projeto
- **Secção 7**: Declaração de responsabilidades

Todas as questões têm que ser respondidas, mesmo que a sua resposta seja "Não Aplicável" ou os campos do formulário que não serão utilizados para resposta, são devidamente rasurados.
As respostas têm que ser redigidas com texto bem legível e em português.

SECÇÃO 1: DETALHES ADMINISTRATIVOS SOBRE O PROJETO, PESSOAS E ESTABELECIMENTOS ENVOLVIDOS

REFERÊNCIA DO PROJETO

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Ensaio *in vivo* da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica, utilizando vacinas atualmente disponíveis no mercado para coelho doméstico (medida 7.6 do Projeto +Coelho 2). O conhecimento e a experiência gerados durante este ensaio serão úteis para a concretização da medida 7 -Desenvolvimento da vacina oral para RHDV2- operacionalizada através do Projeto Fight 2 (PTDC/CVT-CVT/29062/2017- PT2020)

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Margarida Duarte (como representante do GT +Coelho)

ENTIDADE E ESTABELECIMENTO/LOCAL

1.3. Entidade. Indicar a entidade que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

GT + Coelho, INIAV

1.4. Este projeto envolve a colaboração com outras entidades? Se sim, forneça o nome das entidades envolvidas e detalhes da colaboração.

1. ICNF (Autoridade Nacional em matéria de Conservação da Natureza, será responsável por garantir o cumprimento da legislação no que toca à captura e ao transporte dos animais e à deteção dos animais para fins científicos).
2. DGAV (Autoridade Nacional em matéria de Saúde Animal, será responsável pela avaliação dos

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

eventuais riscos sanitários do ensaio e pelo cumprimento da legislação no que toca à utilização de substancias farmacológicas e à utilização de animais para fins científicos).
3. OSCs (FENCAÇA; ANPC e CNCP) no apoio na captura e manutenção dos animais durante o ensaio).

1.5. Utilizador. Indicar o nome do utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário)

1.6. Estabelecimento(s) onde os animais serão alojados e onde serão realizados procedimentos:

Clube de Caça Almiara e Infesto, uma Zona de Caça Associativa (Processo nº 798 do ICNF)

1.7. No caso de a realização dos procedimentos se pretender fazer num **local diferente de um estabelecimento de um utilizador,** indique qual e forneça uma **justificação científica** para isso acontecer.

O ensaio em causa é constituído por três etapas que incluem i) a Captura de exemplares no campo na região do Alentejo e Algarve até se conseguirem 48 animais (com duração imprevisível máxima de 3 meses), ii) a Quarentena e Vacinação dos animais (com a duração I de cerca de 1 mês cada), ambas idealmente a realizar em condições ambientais o mais próximo possível das condições do seu habitat natural, e iii) ensaio de Contraprova (com a duração aproximada de 1 mês), em ambiente de contensão laboratorial, conseguida por uma unidade laboratorial móvel, constituída por dois contentores estanques com ambiente controlado (Pressão negativa numa sala, ar filtrado, temperatura controlada).
Dada a natureza selvagem da espécie, e a influência conhecida do *stress* na depressão da resposta imunitária dos animais, há necessidade de se manterem as lebres em condições adequadas de espaço e abrigo, próximas das condições de vida livre, durante as fases 1 e 2 do ensaio (espera por captura do número total dos animais necessários e quarentena e vacinação).
Por outro lado, uma vez que não foram encontradas, em organismos governamentais (INIAV, FMV, IHMT, INSA), condições adequadas ou disponíveis para a realização das várias fases do ensaio, sendo que seria impraticável manter os animais encerrados em gaiolas durante todo o processo, optou-se por se encontrar um espaço adequado para o desenvolvimento das fases 1 e 2, próximo do INIAV para melhor operacionalização do ensaio. Esse espaço foi localizado no Clube de Caça Almiara e Infesto, uma Zona de Caça Associativa (Processo nº 798 do ICNF), e consiste em parques de recria, construídos para perdiz, desativados há alguns anos.
Para a realização da Contraprova, recorrer-se-á a uma unidade móvel com condições de hermeticidade, temperatura e ar controlado, que será localizada na Quinta do Infesto e concluído o ensaio, transportado para um dos polos do INIAV. A capacidade de neutralização destes anticorpos será investigada por ensaio de inoculação contraprova (Challenge) com vírus de campo, isolado a partir de uma lebre infetada, em dose conhecida e idêntica para todos os animais.

Uma vez que a imunidade desenvolvida para algumas famílias de vírus, nomeadamente Poxviridae, não tem como componente principal a imunidade humoral, a avaliação da produção e a determinação dos títulos de anticorpos não é indicativa, de forma isolada, do grau de proteção conferida ao animal (Kerr, 2012). Assim, tendo em vista que a imunidade celular pode ter um papel preponderante nesta proteção, a avaliação desta componente da resposta é de crucial importância (Apostolopoulos and Marincola, 2010).

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

PESSOAS

1.8. Investigador responsável:

Nome:	Maria Margarida N. R. Dias Duarte
Qualificações académicas:	DMV, MSc, PhD
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Investigadora Auxiliar
Entidade/Departamento onde trabalha:	INIAV, UEISPSA,
Morada:	Av da República, Quinta do Marquês, Oeiras
Telefone:	214405300
Telefax:	-
Endereço e-mail:	margarida.duarte@iniav.pt /
Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	-
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

1.9. Pessoa responsável pela realização de procedimentos nos animais:

Nome:	Fábio Abade dos Santos
Qualificações académicas:	MIMV
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Participação nas várias fases do ensaio sob a supervisão da pessoa referida em 1.8. (Margarida Duarte) e 1.10 (Sandra Cavaco).
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	Estudante de Doutoramento pela FMV da Universidade de Lisboa e pela Universidade de Oviedo (Espanha). Trabalhos de doutoramento decorrem no INIAV, FMV e na Universidade de Oviedo.
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	FMV, INIAV, Universidade de Oviedo
Morada:	Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
Telefone:	21 365 2800
Telefax:	21 365 2810
Endereço e-mail:	fabio.santos@iniav.pt
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Não.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

1.10. Outras pessoas envolvidas:

Nome:	Carina Luísa da Costa Carvalho
Qualificações académicas:	DVM, PhD
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Participação nas avaliações clinicas, vacinação dos animais, colheita de amostras biológicas e sacrifício dos animais no final do ensaio.
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	INIAV
Morada:	Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
Telefone:	21 365 2800
Telefax:	21 365 2810
Endereço email:	carina.carvalho@iniav.pt
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	Clinica de pequenos animais.
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Curso FELASA (Ciência de Animais de Laboratório), categoria B.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

Nome:	Sandra Cavaco Gonçalves
Qualificações académicas:	DMV, MSc, PhD
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Investigadora Auxiliar
Entidade/Departamento onde trabalha:	INIAV, UEISPSA,
Morada:	Av da República, Quinta do Marquês, Oeiras
Telefone:	214405300
Telefax:	-
Endereço email:	sandra.cavaco@iniav.pt /

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	VI Curso de Experimentação Animal / Ciência de Animais de Laboratório. (Investigador categoria C, atribuída pela FELASA em Experimentação de Animais de Laboratório). Organização FMV-UTL e Universidade de Utrecht. - 19 a 30 de Março de 2007
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Creditação emitida pela DGV em 11 de outubro de 2007: Creditação como pessoa competente (Investigadora Coordenadora) para a prática de experimentação animal, ao abrigo do ponto iii), alínea e), do nº 3 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro

Nome:	Sebastião Miguel
Qualificações académicas:	Gestor de Caça
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Apoio na captura dos animais, adequação das instalações à espécie, seleção da alimentação e manutenção dos animais.
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	Gestor de Caça Privado
Morada:	
Telefone:	961230714
Telefax:	
Endereço email:	
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	Larga experiência na gestão de zonas de caça para coelho-bravo e lebre-ibérica.
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Não.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Não aplicável

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 2: INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

CONTINUAÇÃO DE PROJETO/UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

2.1. Continuação de projeto/utilização de animais. Se pretende obter uma autorização para continuar o trabalho desenvolvido noutro projeto/utilização de animais previamente autorizado, refira a designação do mesmo(a), a data de autorização e a data de término.

Não aplicável.

DATAS DO PROJETO

2.2. Datas do projeto:

Especifique a duração requerida para a autorização do projeto/utilização de animais[1]:	6 meses +/-2 meses
Data proposta para o início:	Setembro 2019 (Fase de captura de animais)
Data prevista para o término:	Fevereiro 2020

(1) De notar que, de acordo com o nº 3, do artigo º 46º do Decreto-Lei, a duração máxima permitida para a realização de um projeto é de cinco anos.

SUBMISSÃO DO PROJETO AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

2.3. O projeto foi previamente submetido ao Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais vão estar alojados? Se sim, anexe, ao presente pedido de autorização, o parecer não vinculativo emitido pelo ORBEA sobre o projeto em apreço.

Será submetido à ORBEA do INIAV em simultâneo.

FINANCIAMENTO E RECURSOS PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO

2.4. Financiamento e recursos para realização do projeto. Indique se dispõe de financiamento e de recursos adequados (por ex., instalações, equipamento, staff, conhecimento adequado, etc) para realização deste projeto e descreva sumariamente. Se dispõe de financiamento, indique qual a **entidade financiadora**.

Esta medida (7.6 Avaliação da eficácia de vacinas comerciais desenvolvidas para o controlo da mixomatose em coelho doméstico na indução de anticorpos protetores em lebre-ibérica) enquadra-se nos objetivos do Projeto +Coelho 2, financiado pelo Fundo Florestal Permanente (Eixo IV).

O Polo de Oeiras do INIAV detém o Laboratório de Estado com competências na área da saúde animal, proporcionando todas as condições físicas e humanas necessárias para a realização das análises laboratoriais (necrópsias, exames anatomopatológicos, exames virológicos e parasitológicos a serem realizados.
O ensaio será conduzido por uma equipa multidisciplinar, constituída por elementos do INIAV, DGAV e ICNF, assegurando assim competências e complementaridades nos vários domínios que enquadram o ensaio, nomeadamente saúde animal, diagnóstico laboratorial, epidemiologia, boas práticas, prática

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

clínica de pequenos animais e ecologia e gestão de espécies silvestres cinegéticas;

RISCOS DE SAÚDE E/OU SEGURANÇA PARA OUTROS ANIMAIS, PESSOAS OU PARA A COMUNIDADE

2.5. O projeto envolve riscos de saúde e/ou de segurança para outros animais alojados nas instalações, pessoas ou para a comunidade?

Os riscos são os decorrentes da aplicação de vacinas atenuadas, legalmente aceites, e da utilização de uma estirpe de campo para ensaio de Contraprova, em ambiente controlado.

Se sim, indique quais dos seguintes riscos de saúde e/ou de segurança estão envolvidos com o projeto, forneça detalhes e refira que medidas foram tomadas para minimizar esses riscos.

	Gases anestésicos	Não.
	Carcinogénios ou teratogénios	Não.
	Material químico perigoso ou substâncias citotóxicas (não incluindo os gases anestésicos)	Não.
	Organismos ou materiais biologicamente perigosos (por exemplo, vírus, bactérias, fungos, etc). Especifique que grau de risco biológico está associado ao organismo.	-Vacinas comerciais contendo estirpes atenuadas do vírus da Mixomatose, largamente utilizadas em coelhos para controlo da mixomatose na indústria e em explorações cinegéticas. - -Estirpe de campo, utilizada no ensaio de Contraprova, que será realizado no cumprimento de todas as exigências de biossegurança nomeadamente pela realização do ensaio em ambiente fechado, com ambiente controlado. Não haverá contacto com outros animais e será efetuado o controlo de vetores pela aplicação de inseticida.
	Risco de radiação	Não.
	Potenciais zoonoses	Não. O vírus da mixomatose não é zoonótico.
	Outros	-

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 3: OBJECTIVOS E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO PROJETO

3.1. O artigo 5º do Decreto-Lei requer que um programa de trabalho utilizando animais seja realizado para os seguintes **fins**. Para o efeito, deverá selecionar o que se aplicar ao projeto proposto:

	a) Investigação fundamental
	b) Investigação translacional ou aplicada, tendo em vista um dos seguintes fins:
x	i. A prevenção, a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	ii. A avaliação, a deteção, a regulação ou a alteração das condições fisiológicas nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	iii. O bem-estar dos animais e a melhoria das condições de produção dos animais criados para fins agrícolas;
	c) Desenvolvimento, produção ou controlo da qualidade, da eficácia e da segurança de medicamentos, géneros alimentícios, alimentos para animais e outras substâncias ou produtos, para um dos objetivos mencionados na alínea b);
	d) Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais;
x	e) Investigação destinada à conservação das espécies;
	f) Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais;
	g) Inquéritos no domínio da medicina legal.

3.2. Faça uma **descrição do contexto global** do projeto selecionando uma de entre as seguintes hipóteses e respondendo às questões:

x	Para investigação: Qual é a posição atual do projeto na área de trabalho e de que modo o mesmo irá ajudar a acrescentar conhecimento, progresso ou colmatar uma necessidade clínica, por exemplo, relativamente ao estado atualmente existente? Os casos esporádicos de mixomatose em lebre europeia, registados no passado, foram raramente acompanhados de sintomatologia. No entanto, desde julho de 2018 que tem vindo a ocorrer mortalidade alarmante em lebres em Espanha e em Portugal, associada à infeção pelo vírus da mixomatose. Este vírus apresenta contudo diferenças genéticas, quando comparado com o vírus da mixomatose que circula nas populações de coelhos silvestres. O projeto permitirá esclarecer se as vacinas de mixomatose, atualmente disponíveis para coelho doméstico, conferem imunidade protetora quando administradas em lebre-ibérica. Se ocorrer desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, estas vacinas poderão vir a ser utilizadas para garantir a sobrevivência de alguns núcleos populacionais, assegurando-se assim a preservação da espécie em situações de ameaça extrema pelo vírus da mixomatose.
	Para satisfazer requisitos regulamentares: Quais são os requisitos ou as *guidelines* regulamentares relevantes?
	Para fins de produção ou diagnóstico: Quais são os prováveis pedidos que justifiquem a necessidade do produto ou do serviço durante o tempo da autorização do projeto?
	Para ensino: Quais são as necessidades de formação subjacentes ao pedido de utilização de animais?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

3.3. Faça uma **descrição dos objetivos** do projeto. O que é proposto alcançar, descobrir ou produzir com a realização deste projeto? Os objetivos devem ser específicos para o projeto em apreço, realistas e alcançáveis.

OBJETIVO GERAL

Investigar a eficácia das vacinas atualmente disponíveis contra a mixomatose destinadas a coelho doméstico, quando aplicadas na lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), por forma a esclarecer se estas ferramentas poderão vir a ser utilizadas com sucesso no futuro, para controlo da mixomatose em lebres.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DO PROJETO

OE1. Determinar a cinética de produção de anticorpos em lebres imunizadas com vacinas comerciais para a mixomatose;

OE2. Determinar se a imunidade induzida em lebre-ibérica (humoral e celular) é protetora.

3.4. Refira quais são os **benefícios** prováveis deste projeto e a razão por que valerão a pena para contrabalançar o sofrimento e efeitos adversos infligidos aos animais a envolver no projeto?

Esta necessidade surge pela emergência recente de um número preocupante de casos de mixomatose em lebre, afetando o Sul e Centro de Portugal. Esta ameaça afeta também lebres desta espécie em mais de 15 províncias de Espanha. A avaliação da eficácia em lebres das vacinas de mixomatose para coelho doméstico atualmente disponíveis permitirá, caso se verifique o desenvolvimento de imunidade humoral e celular, a sua utilização nas populações de lebres, garantindo a sobrevivência de alguns núcleos populacionais, assegurando-se assim a preservação da espécie em situações de ameaça extrema pelo vírus da mixomatose

3.5. Liste algumas **referências bibliográficas** e/ou ***guidelines* regulamentares** que suportem a necessidade do projeto e/ou os benefícios prováveis indicados para o mesmo, assim como de quaisquer modelos específicos propostos para serem utilizados nos procedimentos a realizar.

Mixomatose: uma ameaça para a lebre-ibérica? Margarida Dias Duarte, Carina Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Mónica V. Cunha, Nuno Canada, Rita Amador, Patrícia Tavares Santos, Yolanda Vaz , Ana Hora, Gonçalo Lopes, Joana Abrantes, Ana Margarida Lopes, Pedro José Esteves, Nuno Santos e Paulo Célio Alves, João Carvalho, António Paula Soares, Fernando Castanheira-Pinto, Jacinto Amaro. Vida Rural, n.º 1845 / março 2019.

Myxoma virus jumps species to the Iberian hare.
Dalton KP, Martín JM, Nicieza I, Podadera A, de Llano D, Casais R, Gimenez S, Badiola I, Agüero M, Duran M, Buitrago D, Romero LJ, García E, Parra F.
Transbound Emerg Dis. 2019 Jul 19. doi: 10.1111/tbed.13296. [Epub ahead of print]

First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (Lepus granatensis).
García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, Dalton KP, Caballero-Gómez J, Agüero M, Zorrilla I, Gómez-Guillamón F.
Transbound Emerg Dis. 2019 Jul 10. doi: 10.1111/tbed.13289. [Epub ahead of print]

Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (Lepus granatensis).
Águeda-Pinto A, Lemos de Matos A, Abrantes M, Kraberger S, Risalde MA, Gortázar C, McFadden G, Varsani A, Esteves PJ.
Viruses. 2019 Jun 7;11(6). pii: E530. doi: 10.3390/v11060530.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain.
Barlow A, Lawrence K, Everest D, Dastjerdi A, Finnegan C, Steinbach F.
Vet Rec. 2014 Jul 19;175(3):75-6. doi: 10.1136/vr.g4621. No abstract available.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 4: INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS

APLICAÇÃO DOS 3Rs

REPLACEMENT (SUBSTITUIÇÃO)

4.1. Explique por que não é possível alcançar os objetivos do projeto através da utilização de métodos alternativos que não utilizem animais e indique que fontes e referências bibliográficas consultou para encontrar possíveis alternativas:

O propósito deste ensaio é esclarecer se a lebre-ibérica vacinada com vacinas desenvolvidas para imunizar coelhos contra a mixomatose, fica protegida contra o novo vírus da mixomatose que emergiu em Portugal em outubro de 2018, sendo portanto a avaliação do desenvolvimento de imunidade por contraprova indispensável, não existindo nenhum sistema celular *in vitro* que permita fazer esta avaliação.
Consultada bibliografia na base de dados Pubmed com as palavras chave: "Lepus granatensis", "Myxomatosis", "immunization", "european rabbit" "vaccination".

4.2. Que alternativas (totais ou parciais) considerou e irão ser utilizadas para alcançar os objetivos do projeto? Indique as fontes consultadas.

REDUCTION (REDUÇÃO)

4.3. Número de animais a serem utilizados.

Previsto um número máximo de 18 animais seronegativos, o que envolverá a captura de 36 espécimes.

4.4. Forneça justificação sobre o número de animais a ser utilizado, especificando os princípios do desenho experimental usados para calcular o número de animais a incluir em cada grupo experimental ou de tratamento, incluindo grupos controlo, de cada um dos procedimentos que farão parte do projeto. Indique quais as fontes de aconselhamento consultadas para esse efeito.

O número de animais foi estabelecido por forma a permitir obter, em cada ensaio realizado, um número de réplicas que permitam a validação dos resultados obtidos. Serão estabelecidos 3 grupos de animais, cada um com o máximo de 6 espécimes (4 fêmeas e 2 machos).
Grupo 1: animais não vacinados; uma administração intradérmica de 0,5 mL de soluto fisiológico, ao dia 30;
Grupo 2: animais vacinados com 0,5 mL de Mixohipra-FSA; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30;
Grupo 3: animais vacinados com 0,5 mL de MIXOHIPRA-H; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30
Uma vez que cada grupo conterá animais dos dois sexos, na eventualidade de haver reprodução, será testada a passagem de imunidade para a descendência.

4.5. Foi considerada alguma colaboração com outro estabelecimento (interno ou externo) para reduzir o número de animais utilizados (utilização conjunta dos animais) (por exemplo, diferentes órgãos do mesmo animal são usados em mais de um laboratório)?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Tanto quanto conhecemos (o Projeto tem como parceiros as Autoridades Nacionais em matéria de Conservação da Natureza e Saúde Animal), não existe em Portugal nenhum grupo de investigação que pretenda levar a cabo este ensaio.

REFINEMENT (REFINAMENTO)

4.6. Forneça informações sobre a escolha da espécie animal, procedimento(s) e limites críticos e explique por que razão são os mais refinados para o objetivo requerido.

A espécie (*Lepus granatensis*) utilizada é a espécie alvo do estudo.

4.7. Para cada procedimento do projeto, forneça detalhes sobre como minimizar o sofrimento dos animais a envolver.

A captura de animais será feita com i) redes e batidas e com ii) caixas armadilha sob monitorização frequente, para reduzir o *stress* aos animais. O transporte será feito em caixas individuais de dimensões adequadas para evitar traumatismos. Os animais serão colocados num dos parques do Clube de Caça Almiara e Infesto. A colheita de sangue será feita sob sedação com Midazolam (1mg/kg) para redução do *stress*.

4.8. Para cada um dos procedimentos em que se preveja infligir uma severidade de grau Moderado ou Severo aos animais, justifique a razão para que a realização dos mesmos seja necessária.

Não se prevê a realização de procedimentos aos animais com um grau de severidade *moderado* ou *severo*.

4.9. Uma vez iniciado o projeto, os animais vivos serão removidos da instalação onde estão alojados? Se sim, explique qual a razão, indique como será feito o transporte, para que local serão levados, por quanto tempo e se retomam para a instalação de origem ou para outra.

Não.

ANIMAIS

4.10. Espécie animal a utilizar no projeto.

Lepus granatensis

4.11. Irão ser utilizadas formas fetais de mamíferos ou formas larvares de alimentação autónoma? Se sim, especifique.

Não.

4.12. Estirpe(s) a utilizar.

Não aplicável uma vez que é uma espécie selvagem

4.13. Estatuto genético dos animais a utilizar:

X	Tipo selvagem
	Geneticamente alterados sem fenótipo nocivo
	Geneticamente alterados com fenótipo nocivo.

4.14. Animais geneticamente alterados. Especifique se o projeto em apreço envolve:

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e sem problemas de bem-estar (sem fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta a ocorrência desses efeitos adversos.
	Não
	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e com problemas de bem-estar (com fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo dos animais e/ou a ocorrência de efeitos adversos.
	Não
	Criação de uma nova linhagem de animais geneticamente alterados. - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto esperado da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo esperado dos animais.
	Não

4.15. Origem dos animais (estabelecimento, país, etc)

Alentejo e Algarve

4.16. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **especificamente criados para serem utilizados para fins científicos**? Se não, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais a utilizar neste projeto não foram especificamente criados para fins científicos.

Trata-se de uma espécie selvagem. Não existe espécie alternativa para o propósito deste teste, já que se pretende testar a resposta específica desta espécie à vacinação.

4.17. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **capturados no meio selvagem**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais precisam de ser capturados no meio selvagem.

Sim. Não existe espécie alternativa para o propósito deste teste nem existem lebres em cativeiro que possam ser utilizadas.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Se sim, tem um parecer favorável emitido pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas para a captura dos animais? Em caso afirmativo, anexe a este pedido de autorização de projeto, cópia desse mesmo parecer.

Captura com redes e passagens armadilhadas com mecanismo de alavanca, mediante autorização do ICNF (anexo).

4.18. Os animais a serem utilizados neste projeto são **errantes ou assilvestrados de alguma espécie animal doméstica**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais um animal errante ou assilvestrado de uma espécie doméstica precisa de ser utilizado neste projeto.

Não.

4.19. Os animais a serem utilizados neste projeto pertencem a alguma **espécie ameaçada de extinção**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais é necessário utilizar uma espécie ameaçada de extinção neste projeto.

Não sendo o seu estatuto de conservação considerado ameaçado, verifica-se uma redução preocupante das populações selvagens. Este ensaio pretende precisamente avaliar a eficácia de vacinas comerciais na proteção contra o vírus da mixomatose, com o objetivo ultimo da preservação da espécie.

CARACTERÍSTICAS DO MANEIO A PRESTAR AOS ANIMAIS

4.20. No caso de ser feito enriquecimento ambiental ao alojamento dos animais, descreva-o.

O alojamento durante a vacinação consiste em parques ao ar livre com características semelhantes ao habitat próprio da espécie, não sendo necessário proceder a enriquecimento ambiental; durante a contraprova os animais serão mantidos em instalações fechadas, cumprindo as normas existentes em termos de área mínima individual de solo, de alimentação e de abeberamento, também localizadas no Viveiro Florestal de Évora

4.21. Os animais a utilizar no projeto necessitam de condições de alojamento especiais? Se sim, especifique que condições e justifique a necessidade das mesmas terem que ser utilizadas.

Sim. Redes altas ou espaços fechados para evitar a fuga dos animais e infraestruturas que facilitem a captura e manipulação dos mesmos. Antiparasitários externos para evitar a picada de insetos.

4.22. Os animais a utilizar no projeto necessitam de dieta alimentar ou de abeberamento especiais? Se sim, especifique.

Não

4.23. Os animais a utilizar no projeto necessitam de prestação de cuidados ou de atenção especiais? Se sim, especifique.

Sim, avaliação clínica e seronegatividade para mixomatose

4.24. Os animais serão alojados individualmente? Se sim, forneça detalhes das circunstâncias, período de tempo e justificação para que se faça o alojamento individual.

Durante a quarentena e vacinação os animais serão mantidos em parques em grupos de 5 a 7; durante a contraprova, serão mantidos em gaiolas individuais. Duração do período de alojamento individual?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

REUTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

4.25. Algum dos animais a utilizar neste projeto foi previamente usado num outro estudo/utilização para fins científicos? Se sim, em que condições? Justifique a necessidade de envolvimento do mesmo neste projeto.
De notar que para um animal poder ser reutilizado, têm que estar satisfeitas as condições referidas nas alíneas a) a d), do ponto 1, do artigo 16º, do Decreto-Lei nº 113/2013. Assim, forneça informações sobre: o título do projeto prévio em que foi utilizado, a severidade efetiva do procedimento a que ficou sujeito, estado geral de saúde e de bem-estar do animal, parecer médico-veterinário sobre o envolvimento do animal num novo procedimento, tendo em conta a duração de vida do animal.

Não.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SESSÃO 5: INFORMAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS E O DESENHO EXPERIMENTAL

SEQUÊNCIA DE ACONTECIMENTOS

5.1. Faça uma descrição completa e exata, acompanhada por uma linha temporal, de todos os eventos e procedimentos (devidamente identificados e numerados) que irão acontecer a cada animal (ou grupo de animais), desde a altura em que são obtidos até à altura em que o projeto é finalizado.
No caso de melhorar a clareza da descrição do plano do projeto, ilustre as diferentes etapas acima mencionadas com um fluxograma ou um esquema.

1. Dia 0;
   Vinte e quatro dos animais de vida livre capturados (n≤35), e negativos para a presença de anticorpos contra o vírus da mixomatose, serão introduzidos em 4 parques do Parque de Recria (6 animais por parque), onde permanecerão em quarentena por um período de 30 dias.
   À chegada, os animais serão submetidos a exame clínico, efetuado pelos médicos veterinários da equipa. Esta avaliação clínica incluirá a determinação do peso, a avaliação da dentição, morfometria (nomeadamente cabeça, orelha, corpo, tarso), avaliação da pelagem, avaliação do estado das mucosas, do estado nutricional geral e da temperatura retal.
   Serão responsáveis pela avaliação clínica Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV) e Carina Carvalho (INIAV).

2. Dia 30;
   Uma vez concluída a quarentena, a vacinação das lebres será efetuada no cumprimento das recomendações do respetivo fabricante no que toca à sua aplicação ao coelho doméstico, nomeadamente no que concerne à dose e local de administração.
   No grupo 1, nenhum animal será vacinado, constituindo a controlo negativo do ensaio. Será utilizado soluto fisiológico na inoculação dos animais.
   No Grupo 2 será efetuada com vacina heteróloga contendo o vírus do Fibroma de Shope (SFV).
   Os animais do grupo 3 serão vacinados com a vacina MIXOHIPRA-H (vírus da mixomatose atenuado).
   Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

3. Dia 60;
   Um mês depois da vacinação será efetuada a contraprova em 50% dos animais de cada grupo, por inoculação de vírus de campo. A administração será efetuada depois da colheita de sangue e de fezes.
   Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

4. Dia 30, dia 37, dia 45, dia 52, dia 60, dia 67;
   Os animais serão submetidos a avaliação clínica seguida de colheita de amostras, com uma periodicidade semanal.
   Caso se verifique o aumento continuado dos títulos de anticorpos para além do dia 60, sem desenvolvimento de sinais clínicos a colheita será mantida por um período adicional que não

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

excederá um total de ensaio de 4 meses.
A colheita de sangue (2 ml/animal) para determinação da curva de produção de anticorpos e para avaliação sanitária, será efetuada sob sedação prévia com Midazolam (1mg/kg). As outras matrizes, nomeadamente urina e fezes, serão colhidas de forma não invasiva por recurso a zaragatoa retal e a compressão do abdómen.
Serão responsáveis por esta atividade Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e Sebastião Miguel (ANPC).

Os dias das colheitas poderão sofrer algum desvio (1 a 3 dias) de acordo com a conveniência doa intervenientes.
As análises laboratoriais (necrópsias, exames anatomopatológicos, exames virológicos e parasitológicos) serão realizadas no INIAV-Pólo de Oeiras.
A pesquisa do vírus da mixomatose em sangue, na urina e nas fezes, por métodos moleculares nos materiais colhidos, será efetuada pelo PCR em tempo real (método desenvolvido por Duarte et al., (2014)).
A pesquisa de anticorpos contra o vírus da mixomatose, será efetuada em soro obtido a partir de sangue, por ELISA comercial (CIVTEST® cuni Mixomatosis, laboratórios Hipra), adaptada se necessário a esta espécie.
Todos estes ensaios serão realizados nos Laboratórios do INIAV.
Serão responsáveis por estas atividades, Margarida Duarte (INIAV), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Carina Carvalho e Teresa Fagulha (INIAV).

5. Dia 67; este número é para 1 semana de vida depois do challenge
Os animais serão sacrificados por injeção de Pentobarbital sódico (100 mg/kg por via intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV)), no final do ensaio (dia 67, ie 7 dias após o Challenge), ou mais cedo, se ocorrer alguma evidência de desenvolvimento de doença ou de sofrimento.

Os exames anatomopatológicos dos animais eutanasiados serão efetuados no INIAV pela equipa de patologia no Laboratório de Patologia do INIAV. Será efetuada histopatologia de fígado, baço, pulmão, duodeno, rim, linfonódulos mesentéricos, coração, traqueia, timo e pulmão.
Serão responsáveis por esta atividade, Fábio Abade dos Santos (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV). Caso se verifique o aumento continuado dos títulos de anticorpos para além do dia 120, a colheita será mantida por um período que não excederá um total de ensaio de 4 meses.
A colheita de sangue (2 ml/animal) para determinação da curva de produção de anticorpos e para avaliação sanitária, será efetuada sob sedação prévia com Midazolam (1mg/kg). As outras matrizes, nomeadamente urina e fezes, serão colhidas de forma não invasiva por recurso a zaragatoa retal e a compressão do abdómen.
Serão responsáveis por esta atividade Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e Sebastião Miguel (ANPC)

6. (dia 0, dia 30, dia 45, dia 60, dia 75, dia 90, dia 105, dia 120). Será efetuada a pesquisa do vírus da mixomatose em sangue, na urina e nas fezes, por metodos moleculares. A pesquisa de vírus da mixomatose será efetuada pelo PCR em tempo real (método desenvolvido por Duarte et al., (2014)).
A pesquisa de anticorpos contra o virus da mixomatose, será efetuada em soro obtido a partir de sangue, por ELISA comercial (Ingenasa), adaptada se necessário a esta espécie.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para o virus da mixomatose será efetuada por ensaio iELISA (metodologias standard). Todos estes ensaios serão realizados nos Laboratórios do INIAV. Serão responsáveis por estas atividades, Margarida Duarte (INIAV), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Teresa Fagulha (INIAV) e Jorge Correia (FMV). 7. Se no final do ensaio houver alguma evidência de desenvolvimento de doença, ou o surgimento de lesão no local da vacinação, os animais vacinados serão sacrificados por injeção de Pentobarbital sódico (100 mg/kg por via intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV)). Nestes casos, os exames anatomopatológicos serão efetuados no INIAV pela equipa de patologia e na FMV no Laboratório de Patologia. Será efetuada histopatologia, sempre que se observarem lesões macroscópicas. Serão responsáveis por esta atividade, Fábio Abade dos Santos (INIAV)

DESENHO EXPERIMENTAL

5.2. <u>Para cada um dos procedimentos</u> que irão ser realizados a cada animal (ou grupo de animais), preencher a tabela em baixo, indicando e descrevendo cada item contido na mesma:

Título do procedimento:	Quarentena
Nº do procedimento:	1
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir que os exemplares capturados estão em boa condição física e livres de doenças infeciosas, nomeadamente mixomatose.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 36
Técnica utilizada:	Manutenção dos animais em parques fechados com alimento e água *ad libitum*
Duração do procedimento:	30 a 40 dias
Frequência do procedimento:	Uma vez, na receção dos animais
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Os associados à permanência e adaptação dos animais aos parques
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeiros
Destino dos animais no final do procedimento:	Terminada a quarentena os animais serão vacinados no mesmo local
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não nesta fase

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

(1) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
(2) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não aplicável.

Título do procedimento:	Exame clínico
Nº do procedimento:	2
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir o bom estado sanitário dos espécimes. Estimar a idade dos animais. Sexagem dos animais. Reunir dados morfométricos da espécie.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 24.
Técnica utilizada:	Manuseamento, pesagem, auscultação
Duração do procedimento:	10 minutos
Frequência do procedimento:	Na chegada, no final da quarentena, nas colheitas de amostras
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Estabelecimento de limites	Não aplicável.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

críticos:	
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	*Stress* inerente à manipulação dos animais.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Vacinação
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável

(3) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(4) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não aplicável.

Título do procedimento:	Vacinação

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Nº do procedimento:	3
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Este procedimento é incontornável na persecução dos objetivos identificados
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 36
Técnica utilizada:	Administração da vacina por via subcutânea.
Duração do procedimento:	5 minutos
Frequência do procedimento:	Uma única vez
Anestesia associada?:	Não. Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Analgesia associada?:	Não. Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Algum *stress* resultante da manipulação dos animais, minimizado se necessário por sedação
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Permanência em parques onde serão objeto de exame clínico e recolha de amostras para avaliação do estado sanitário e da cinética de produção de anticorpos.
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o principio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não nesta fase.

(5) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(6) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infecioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Os produtos a administrar são 2 vacinas atenuadas, comercializadas há muito anos para coelho doméstico e também aplicadas a coelho-bravo quando criado em explorações de produção cinegética. São estirpes vacinais atenuadas de vírus da mixomatose (Grupos 2), estirpe do vírus do Fibroma de Shope (Grupo 3). Os Vírus vacinais serão administrados na dose recomendada pelos fabricantes, por via subcutânea (ou outra recomendada pelo fabricante) uma única vez.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não

Título do procedimento:	Colheita de amostras
Nº do procedimento:	4
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Na receção dos animais, a colheita de amostras e subsequentes exames laboratoriais, permitirá confirmar que os animais não tiveram contacto com o vírus da mixomatose e que não possuem anticorpos circulantes contra este vírus. Os resultados negativos nesta fase, são por isso fundamentais para posteriormente se verificar se a vacinação induz, ou não, a produção de imunidade protetora
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 24
Técnica utilizada:	Colheita de sangue: colheita de sangue na veia jugular externa, após sedação com Midazolam. Colheita de fezes: zaragatoa retal Colheita de urina: compressão do ventre e colheita da urina expelida.
Duração do procedimento:	20 a 30 minutos/animal
Frequência do procedimento:	Dia 0 (receção) dia 30 (final da quarentena), dia 45, dia 60, dia 75, dia 90, dia 105, dia 120
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Estabelecimento de limites críticos:	
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Eutanásia dos animais que adoecerem. Os animais que desenvolverem imunidade, serão testados para garantir a não eliminação do vírus nas fezes e urina, e utilizados para a criação de uma reserva genética em Elvas (Medida 7.9)

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

(7) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(8) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

O procedimento envolve a colheita de amostras de sangue, fezes e urina. A colheita de sangue será efetuada por punção da veia jugular externa sob sedação, a colheita de fezes por zaragatoa retal e a colheita de urina por compressão externa do abdómen. As colheitas serão realizadas quinzenalmente.

Título do procedimento:	Exames laboratoriais
Nº do procedimento:	5
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir que os exemplares estão em boa condição física e sanitária antes da vacinação; Após a vacinação, verificar a produção de anticorpos.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	24
Técnica utilizada:	PCR, ELISA, seroneutralização, etc

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Duração do procedimento:	Ao longo do ensaio
Frequência do procedimento:	8 a 10 vezes cada tipo de teste, ao longo do ensaio
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável.
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não aplicável.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Não aplicável.
Destino dos animais no final do procedimento:	Não aplicável.
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Título do procedimento:	Sacrifício dos animais
Nº do procedimento:	6
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 se houver evidências de doença ou excreção viral.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	24 no máximo
Técnica utilizada:	Injeção IV de Pentobarbital de sódio, após sedação com Midazolan
Duração do procedimento:	5 minutos
Frequência do procedimento:	1x
Anestesia associada?:	Pentobarbital de sódio, 100mg/kg IV Sim
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Ligeiros.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Não recuperação.
Destino dos animais no final do procedimento:	Eutanásia e incineração (animais doentes e/ou a excretar vírus) Reserva genética em Elvas: animais saudáveis, imunizados
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

(9) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(10) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Midazolan, (1mg/kg), IM Pentobarbital de sódio, 100mg/kg IV ou IP

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluido se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 6: RESUMO NÃO TÉCNICO DO PROJETO

De notar que, de acordo com a alínea b), do artigo 43º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, no pedido de autorização de um projeto deverá ser incluído um **resumo não técnico do projeto**, e considerou-se de utilidade que o mesmo faça parte da presente secção.
O resumo deverá ser redigido claramente usando termos não técnicos, sempre que possível, por forma a poder ser facilmente entendido por um leigo. Para além disso, de acordo com o artigo 49º do Decreto-Lei, o projeto deverá ser explicado salvaguardando sempre a propriedade intelectual e as informações confidenciais que identifiquem quer as pessoas envolvidas no projeto quer o estabelecimento onde os animais serão alojados.
O resumo não técnico será posteriormente publicitado no sítio da Internet da DGAV.

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Ensaio *in vivo* da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica utilizando vacinas atualmente disponíveis no mercado para coelho doméstico.		
Duração do projeto	3 a 4 meses		
Palavras-chave (máx. 5)	*Lepus granatensis*, Lebre, Vacina, Mixomatose-ibérica		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) (1)	Investigação fundamental	Sim	
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	
	Uso regulamentar e produção de rotina		Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais		Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;	Sim	
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal		Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados (2)		Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	Eficácia das vacinas desenvolvidas para coelho, quando aplicadas em lebre-ibérica.		
Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?	Proteção de populações selvagens de lebre-ibérica através da vacinação.		

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?	*Lepus granatensis* (lebre-ibérica), num total de 18 animais.		
No contexto do que é proposto fazer-se aos animais, quais são os efeitos adversos esperados e o grau provável/esperado de severidade? O que acontecerá aos animais no final da realização do projeto?	Os animais que apresentarem evidências de doença ou excreção viral serão sacrificados. Os restantes serão libertados em local controlado (reserva genética em Elvas)		
Aplicação dos 3Rs			
1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais	Não existem sistemas *in vitro* que permitam analisar a resposta de um animal, neste caso a lebre-ibérica, à vacinação (neste caso contra a mixomatose).		
2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais	O número de animais a utilizar foi reduzido ao mínimo necessário para obter resultados estatisticamente significativos. Com o número de 6 animais por grupo pretende-se avaliar a variabilidade individual da resposta à vacinação com cada uma das 3 estirpes escolhidas.		
3.Refinement (Refinamento) Explique a escolha da(s) espécie e a razão porque o modelo(s) animal que serão usados são os mais refinados, tendo em conta os objetivos. Explique as medidas gerais que serão tomadas para minimizar os custos de bem-estar (danos) aos animais.	Os animais serão mantidos em instalações adaptadas à espécie e alojados em grupos.		
Para uso oficial			
O projeto será submetido a avaliação retrospetiva?	Sim?		Observações

Notas: (1) Elimine Sim ou Não, conforme apropriado.

(2) Com esta opção deverá ser escolhido, pelo menos, um fim/objetivo adicional.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 7: DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL

1. Li o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".
2. Confirmo que o uso de animais neste projecto estará de acordo com o diploma supracitado e com outras orientações dadas pela entidade competente.
3. Eu aceito a responsabilidade pela condução do projecto tal como delineado nesta aplicação, de acordo com a legislação.
4. Eu declaro que tenho as qualificações e a experiência apropriadas para realizar os procedimentos descritos neste projecto ou para assegurar que eles são feitos corretamente.
5. Eu declaro que cada pessoa envolvida neste projeto foi adequadamente instruída e é competente para levar a cabo os procedimentos por que são responsáveis.
6. Eu declaro que estão disponíveis os meios adequados para levar a cabo este projeto.
7. Confirmo que o Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde irá decorrer o projeto, emitiu um parecer não vinculativo sobre o mesmo, o qual anexo a este pedido.

Nome	Assinatura	Data
Maria Margarida Dias Duarte		4.12.19

DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Data
Fábio Abade Santos		4.12.19

DA PESSOA PERTENCENTE AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS (ORBEA) EM QUEM O RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS DELEGUE COMPETÊNCIA

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Função assumida no ORBEA	Data
Sandra Cavaco Gonçalves			

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Antes da submissão do formulário verifique se:

1. Respondeu a todas as questões (mesmo que a sua resposta seja "Não aplicável" ou que tenha rasurado os campos não aplicáveis);
2. Todas as pessoas envolvidas no projeto foram identificadas na Secção 1;
3. O utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais fica claramente identificado;
4. O estabelecimento(s)/local onde irão ficar alojados os animais e decorrer os procedimentos fica(m) identificado(s);
5. O investigador responsável leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
6. O responsável pelo estabelecimento onde os animais serão alojados (ou o membro do Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA, artigo 34º do Decreto-Lei) a quem este delegue essa competência) leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
7. O resumo não técnico do projeto está redigido em português e de acordo com os requisitos estipulados no artigo 49º do Decreto-Lei;
8. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, o **parecer não vinculativo** emitido pelo **Órgão responsável pelo bem-estar dos animais** do estabelecimento onde os animais irão ser alojados, de acordo com o ponto 2, do artigo 43º do Decreto-Lei;
9. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, se aplicável para o projeto em apreço, o **parecer favorável** emitido pelo **Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas**, no que diz respeito à utilização de animais capturados no meio selvagem, de acordo com o ponto 2, do artigo 9º do Decreto-Lei.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

FORMULÁRIO PARA PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO DE PROJETO DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

Este formulário inclui sete secções:

- **Secção 1**: Detalhes administrativos sobre o projeto, pessoas e estabelecimentos envolvidos
- **Secção 2**: Informações sobre o projeto
- **Secção 3**: Objetivos e benefícios potenciais do projeto
- **Secção 4**: Informações sobre os animais
- **Secção 5**: Informações sobre os procedimentos e o desenho experimental
- **Secção 6:** Resumo não técnico do projeto
- **Secção 7**: Declaração de responsabilidades

Todas as questões têm que ser respondidas, mesmo que a sua resposta seja "Não Aplicável" ou os campos do formulário que não serão utilizados para resposta, são devidamente rasurados.
As respostas têm que ser redigidas com texto bem legível e em português.

SECÇÃO 1: DETALHES ADMINISTRATIVOS SOBRE O PROJETO, PESSOAS E ESTABELECIMENTOS ENVOLVIDOS

REFERÊNCIA DO PROJETO

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Ensaio *in vivo* da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica, utilizando vacinas atualmente disponíveis no mercado para coelho doméstico (medida 7.6 do Projeto +Coelho 2). O conhecimento e a experiência gerados durante este ensaio serão úteis para a concretização da medida 7 -Desenvolvimento da vacina oral para RHDV2- operacionalizada através do Projeto Fight 2 (PTDC/CVT-CVT/29062/2017- PT2020)

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Margarida Duarte (como representante do GT +Coelho)

ENTIDADE E ESTABELECIMENTO/LOCAL

1.3. Entidade. Indicar a entidade que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

GT + Coelho, INIAV

1.4. Este projeto envolve a colaboração com outras entidades? Se sim, forneça o nome das entidades envolvidas e detalhes da colaboração.

1. ICNF (Autoridade Nacional em matéria de Conservação da Natureza, será responsável por garantir o cumprimento da legislação no que toca à captura e ao transporte dos animais e à deteção dos animais para fins científicos).
2. DGAV (Autoridade Nacional em matéria de Saúde Animal, será responsável pela avaliação dos

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

eventuais riscos sanitários do ensaio e pelo cumprimento da legislação no que toca à utilização de substancias farmacológicas e à utilização de animais para fins científicos).
3. OSCs (FENCAÇA; ANPC e CNCP) no apoio na captura e manutenção dos animais durante o ensaio).

1.5. Utilizador. Indicar o nome do utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário)

1.6. Estabelecimento(s) onde os animais serão alojados e onde serão realizados procedimentos:

Clube de Caça Almiara e Infesto, uma Zona de Caça Associativa (Processo nº 798 do ICNF)

1.7. No caso de a realização dos procedimentos se pretender fazer num **local diferente de um estabelecimento de um utilizador,** indique qual e forneça uma **justificação científica** para isso acontecer.

O ensaio em causa é constituído por três etapas que incluem i) a Captura de exemplares no campo na região do Alentejo e Algarve até se conseguirem 48 animais (com duração imprevisível máxima de 3 meses), ii) a Quarentena e Vacinação dos animais (com a duração I de cerca de 1 mês cada), ambas idealmente a realizar em condições ambientais o mais próximo possível das condições do seu habitat natural, e iii) ensaio de Contraprova (com a duração aproximada de 1 mês), em ambiente de contensão laboratorial, conseguida por uma unidade laboratorial móvel, constituída por dois contentores estanques com ambiente controlado (Pressão negativa numa sala, ar filtrado, temperatura controlada).
Dada a natureza selvagem da espécie, e a influência conhecida do *stress* na depressão da resposta imunitária dos animais, há necessidade de se manterem as lebres em condições adequadas de espaço e abrigo, próximas das condições de vida livre, durante as fases 1 e 2 do ensaio (espera por captura do número total dos animais necessários e quarentena e vacinação).
Por outro lado, uma vez que não foram encontradas, em organismos governamentais (INIAV, FMV, IHMT, INSA), condições adequadas ou disponíveis para a realização das várias fases do ensaio, sendo que seria impraticável manter os animais encerrados em gaiolas durante todo o processo, optou-se por se encontrar um espaço adequado para o desenvolvimento das fases 1 e 2, próximo do INIAV para melhor operacionalização do ensaio. Esse espaço foi localizado no Clube de Caça Almiara e Infesto, uma Zona de Caça Associativa (Processo nº 798 do ICNF), e consiste em parques de recria, construídos para perdiz, desativados há alguns anos.
Para a realização da Contraprova, recorrer-se-á a uma unidade móvel com condições de hermeticidade, temperatura e ar controlado, que será localizada na Quinta do Infesto e concluído o ensaio, transportado para um dos polos do INIAV. A capacidade de neutralização destes anticorpos será investigada por ensaio de inoculação contraprova (Challenge) com vírus de campo, isolado a partir de uma lebre infetada, em dose conhecida e idêntica para todos os animais.

Uma vez que a imunidade desenvolvida para algumas famílias de vírus, nomeadamente Poxviridae, não tem como componente principal a imunidade humoral, a avaliação da produção e a determinação dos títulos de anticorpos não é indicativa, de forma isolada, do grau de proteção conferida ao animal (Kerr, 2012). Assim, tendo em vista que a imunidade celular pode ter um papel preponderante nesta proteção, a avaliação desta componente da resposta é de crucial importância (Apostolopoulos and Marincola, 2010).

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

PESSOAS

1.8. Investigador responsável:

Nome:	Maria Margarida N. R. Dias Duarte
Qualificações académicas:	DMV, MSc, PhD
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Investigadora Auxiliar
Entidade/Departamento onde trabalha:	INIAV, UEISPSA,
Morada:	Av da República, Quinta do Marquês, Oeiras
Telefone:	214405300
Telefax:	-
Endereço e-mail:	margarida.duarte@iniav.pt /
Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	-
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

1.9. Pessoa responsável pela realização de procedimentos nos animais:

Nome:	Fábio Abade dos Santos
Qualificações académicas:	MIMV
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Participação nas várias fases do ensaio sob a supervisão da pessoa referida em 1.8. (Margarida Duarte) e 1.10 (Sandra Cavaco).
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	Estudante de Doutoramento pela FMV da Universidade de Lisboa e pela Universidade de Oviedo (Espanha). Trabalhos de doutoramento decorrem no INIAV, FMV e na Universidade de Oviedo.
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	FMV, INIAV, Universidade de Oviedo
Morada:	Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
Telefone:	21 365 2800
Telefax:	21 365 2810
Endereço e-mail:	fabio.santos@iniav.pt
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Não.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

1.10. Outras pessoas envolvidas:

Nome:	Carina Luísa da Costa Carvalho
Qualificações académicas:	DVM, PhD
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Participação nas avaliações clinicas, vacinação dos animais, colheita de amostras biológicas e sacrifício dos animais no final do ensaio.
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	INIAV
Morada:	Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
Telefone:	21 365 2800
Telefax:	21 365 2810
Endereço email:	carina.carvalho@iniav.pt
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	Clinica de pequenos animais.
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Curso FELASA (Ciência de Animais de Laboratório), categoria B.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	-

Nome:	Sandra Cavaco Gonçalves
Qualificações académicas:	DMV, MSc, PhD
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Investigadora Auxiliar
Entidade/Departamento onde trabalha:	INIAV, UEISPSA,
Morada:	Av da República, Quinta do Marquês, Oeiras
Telefone:	214405300
Telefax:	-
Endereço email:	sandra.cavaco@iniav.pt /

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	VI Curso de Experimentação Animal / Ciência de Animais de Laboratório. (Investigador categoria C, atribuída pela FELASA em Experimentação de Animais de Laboratório). Organização FMV-UTL e Universidade de Utrecht. - 19 a 30 de Março de 2007
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Creditação emitida pela DGV em 11 de outubro de 2007: Creditação como pessoa competente (Investigadora Coordenadora) para a prática de experimentação animal, ao abrigo do ponto iii), alínea e), do nº 3 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro

Nome:	Sebastião Miguel
Qualificações académicas:	Gestor de Caça
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Apoio na captura dos animais, adequação das instalações à espécie, seleção da alimentação e manutenção dos animais.
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	Gestor de Caça Privado
Morada:	
Telefone:	961230714
Telefax:	
Endereço email:	
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	Larga experiência na gestão de zonas de caça para coelho-bravo e lebre-ibérica.
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Não.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Não aplicável

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 2: INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

CONTINUAÇÃO DE PROJETO/UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

2.1. Continuação de projeto/utilização de animais. Se pretende obter uma autorização para continuar o trabalho desenvolvido noutro projeto/utilização de animais previamente autorizado, refira a designação do mesmo(a), a data de autorização e a data de término.

Não aplicável.

DATAS DO PROJETO

2.2. Datas do projeto:

Especifique a duração requerida para a autorização do projeto/utilização de animais[1]:	6 meses +/-2 meses
Data proposta para o início:	Setembro 2019 (Fase de captura de animais)
Data prevista para o término:	Fevereiro 2020

(1) De notar que, de acordo com o nº 3, do artigo º 46º do Decreto-Lei, a duração máxima permitida para a realização de um projeto é de cinco anos.

SUBMISSÃO DO PROJETO AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

2.3. O projeto foi previamente submetido ao Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais vão estar alojados? Se sim, anexe, ao presente pedido de autorização, o parecer não vinculativo emitido pelo ORBEA sobre o projeto em apreço.

Será submetido à ORBEA do INIAV em simultâneo.

FINANCIAMENTO E RECURSOS PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO

2.4. Financiamento e recursos para realização do projeto. Indique se dispõe de financiamento e de recursos adequados (por ex., instalações, equipamento, staff, conhecimento adequado, etc) para realização deste projeto e descreva sumariamente. Se dispõe de financiamento, indique qual a **entidade financiadora**.

Esta medida (7.6 Avaliação da eficácia de vacinas comerciais desenvolvidas para o controlo da mixomatose em coelho doméstico na indução de anticorpos protetores em lebre-ibérica) enquadra-se nos objetivos do Projeto +Coelho 2, financiado pelo Fundo Florestal Permanente (Eixo IV).

O Polo de Oeiras do INIAV detém o Laboratório de Estado com competências na área da saúde animal, proporcionando todas as condições físicas e humanas necessárias para a realização das análises laboratoriais (necrópsias, exames anatomopatológicos, exames virológicos e parasitológicos a serem realizados.
O ensaio será conduzido por uma equipa multidisciplinar, constituída por elementos do INIAV, DGAV e ICNF, assegurando assim competências e complementaridades nos vários domínios que enquadram o ensaio, nomeadamente saúde animal, diagnóstico laboratorial, epidemiologia, boas práticas, prática

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

clínica de pequenos animais e ecologia e gestão de espécies silvestres cinegéticas;

RISCOS DE SAÚDE E/OU SEGURANÇA PARA OUTROS ANIMAIS, PESSOAS OU PARA A COMUNIDADE

2.5. O projeto envolve riscos de saúde e/ou de segurança para outros animais alojados nas instalações, pessoas ou para a comunidade?

Os riscos são os decorrentes da aplicação de vacinas atenuadas, legalmente aceites, e da utilização de uma estirpe de campo para ensaio de Contraprova, em ambiente controlado.

Se sim, indique quais dos seguintes riscos de saúde e/ou de segurança estão envolvidos com o projeto, forneça detalhes e refira que medidas foram tomadas para minimizar esses riscos.

	Gases anestésicos	Não.
	Carcinogénios ou teratogénios	Não.
	Material químico perigoso ou substâncias citotóxicas (não incluindo os gases anestésicos)	Não.
	Organismos ou materiais biologicamente perigosos (por exemplo, vírus, bactérias, fungos, etc). Especifique que grau de risco biológico está associado ao organismo.	-Vacinas comerciais contendo estirpes atenuadas do vírus da Mixomatose, largamente utilizadas em coelhos para controlo da mixomatose na indústria e em explorações cinegéticas. - -Estirpe de campo, utilizada no ensaio de Contraprova, que será realizado no cumprimento de todas as exigências de biossegurança nomeadamente pela realização do ensaio em ambiente fechado, com ambiente controlado. Não haverá contacto com outros animais e será efetuado o controlo de vetores pela aplicação de inseticida.
	Risco de radiação	Não.
	Potenciais zoonoses	Não. O vírus da mixomatose não é zoonótico.
	Outros	-

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 3: OBJECTIVOS E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO PROJETO

3.1. O artigo 5º do Decreto-Lei requer que um programa de trabalho utilizando animais seja realizado para os seguintes **fins**. Para o efeito, deverá selecionar o que se aplicar ao projeto proposto:

	a) Investigação fundamental
	b) Investigação translacional ou aplicada, tendo em vista um dos seguintes fins:
x	i. A prevenção, a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	ii. A avaliação, a deteção, a regulação ou a alteração das condições fisiológicas nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	iii. O bem-estar dos animais e a melhoria das condições de produção dos animais criados para fins agrícolas;
	c) Desenvolvimento, produção ou controlo da qualidade, da eficácia e da segurança de medicamentos, géneros alimentícios, alimentos para animais e outras substâncias ou produtos, para um dos objetivos mencionados na alínea b);
	d) Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais;
x	e) Investigação destinada à conservação das espécies;
	f) Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais;
	g) Inquéritos no domínio da medicina legal.

3.2. Faça uma **descrição do contexto global** do projeto selecionando uma de entre as seguintes hipóteses e respondendo às questões:

x	Para investigação: Qual é a posição atual do projeto na área de trabalho e de que modo o mesmo irá ajudar a acrescentar conhecimento, progresso ou colmatar uma necessidade clínica, por exemplo, relativamente ao estado atualmente existente? Os casos esporádicos de mixomatose em lebre europeia, registados no passado, foram raramente acompanhados de sintomatologia. No entanto, desde julho de 2018 que tem vindo a ocorrer mortalidade alarmante em lebres em Espanha e em Portugal, associada à infeção pelo vírus da mixomatose. Este vírus apresenta contudo diferenças genéticas, quando comparado com o vírus da mixomatose que circula nas populações de coelhos silvestres. O projeto permitirá esclarecer se as vacinas de mixomatose, atualmente disponíveis para coelho doméstico, conferem imunidade protetora quando administradas em lebre-ibérica. Se ocorrer desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, estas vacinas poderão vir a ser utilizadas para garantir a sobrevivência de alguns núcleos populacionais, assegurando-se assim a preservação da espécie em situações de ameaça extrema pelo vírus da mixomatose.
	Para satisfazer requisitos regulamentares: Quais são os requisitos ou as *guidelines* regulamentares relevantes?
	Para fins de produção ou diagnóstico: Quais são os prováveis pedidos que justifiquem a necessidade do produto ou do serviço durante o tempo da autorização do projeto?
	Para ensino: Quais são as necessidades de formação subjacentes ao pedido de utilização de animais?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

3.3. Faça uma **descrição dos objetivos** do projeto. O que é proposto alcançar, descobrir ou produzir com a realização deste projeto? Os objetivos devem ser específicos para o projeto em apreço, realistas e alcançáveis.

OBJETIVO GERAL

Investigar a eficácia das vacinas atualmente disponíveis contra a mixomatose destinadas a coelho doméstico, quando aplicadas na lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), por forma a esclarecer se estas ferramentas poderão vir a ser utilizadas com sucesso no futuro, para controlo da mixomatose em lebres.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DO PROJETO

OE1. Determinar a cinética de produção de anticorpos em lebres imunizadas com vacinas comerciais para a mixomatose;

OE2. Determinar se a imunidade induzida em lebre-ibérica (humoral e celular) é protetora.

3.4. Refira quais são os **benefícios** prováveis deste projeto e a razão por que valerão a pena para contrabalançar o sofrimento e efeitos adversos infligidos aos animais a envolver no projeto?

Esta necessidade surge pela emergência recente de um número preocupante de casos de mixomatose em lebre, afetando o Sul e Centro de Portugal. Esta ameaça afeta também lebres desta espécie em mais de 15 províncias de Espanha. A avaliação da eficácia em lebres das vacinas de mixomatose para coelho doméstico atualmente disponíveis permitirá, caso se verifique o desenvolvimento de imunidade humoral e celular, a sua utilização nas populações de lebres, garantindo a sobrevivência de alguns núcleos populacionais, assegurando-se assim a preservação da espécie em situações de ameaça extrema pelo vírus da mixomatose

3.5. Liste algumas **referências bibliográficas** e/ou ***guidelines* regulamentares** que suportem a necessidade do projeto e/ou os benefícios prováveis indicados para o mesmo, assim como de quaisquer modelos específicos propostos para serem utilizados nos procedimentos a realizar.

Mixomatose: uma ameaça para a lebre-ibérica? Margarida Dias Duarte, Carina Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Mónica V. Cunha, Nuno Canada, Rita Amador, Patrícia Tavares Santos, Yolanda Vaz , Ana Hora, Gonçalo Lopes, Joana Abrantes, Ana Margarida Lopes, Pedro José Esteves, Nuno Santos e Paulo Célio Alves, João Carvalho, António Paula Soares, Fernando Castanheira-Pinto, Jacinto Amaro. Vida Rural, n.º 1845 / março 2019.

Myxoma virus jumps species to the Iberian hare.
Dalton KP, Martín JM, Nicieza I, Podadera A, de Llano D, Casais R, Gimenez S, Badiola I, Agüero M, Duran M, Buitrago D, Romero LJ, García E, Parra F.
Transbound Emerg Dis. 2019 Jul 19. doi: 10.1111/tbed.13296. [Epub ahead of print]

First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (Lepus granatensis).
García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, Dalton KP, Caballero-Gómez J, Agüero M, Zorrilla I, Gómez-Guillamón F.
Transbound Emerg Dis. 2019 Jul 10. doi: 10.1111/tbed.13289. [Epub ahead of print]

Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (Lepus granatensis).
Águeda-Pinto A, Lemos de Matos A, Abrantes M, Kraberger S, Risalde MA, Gortázar C, McFadden G, Varsani A, Esteves PJ.
Viruses. 2019 Jun 7;11(6). pii: E530. doi: 10.3390/v11060530.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain.
Barlow A, Lawrence K, Everest D, Dastjerdi A, Finnegan C, Steinbach F.
Vet Rec. 2014 Jul 19;175(3):75-6. doi: 10.1136/vr.g4621. No abstract available.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 4: INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS

APLICAÇÃO DOS 3Rs

REPLACEMENT (SUBSTITUIÇÃO)

4.1. Explique por que não é possível alcançar os objetivos do projeto através da utilização de métodos alternativos que não utilizem animais e indique que fontes e referências bibliográficas consultou para encontrar possíveis alternativas:

O propósito deste ensaio é esclarecer se a lebre-ibérica vacinada com vacinas desenvolvidas para imunizar coelhos contra a mixomatose, fica protegida contra o novo vírus da mixomatose que emergiu em Portugal em outubro de 2018, sendo portanto a avaliação do desenvolvimento de imunidade por contraprova indispensável, não existindo nenhum sistema celular *in vitro* que permita fazer esta avaliação.
Consultada bibliografia na base de dados Pubmed com as palavras chave: "Lepus granatensis", "Myxomatosis", "immunization", "european rabbit" "vaccination".

4.2. Que alternativas (totais ou parciais) considerou e irão ser utilizadas para alcançar os objetivos do projeto? Indique as fontes consultadas.

REDUCTION (REDUÇÃO)

4.3. Número de animais a serem utilizados.

Previsto um número máximo de 18 animais seronegativos, o que envolverá a captura de 36 espécimes.

4.4. Forneça justificação sobre o número de animais a ser utilizado, especificando os princípios do desenho experimental usados para calcular o número de animais a incluir em cada grupo experimental ou de tratamento, incluindo grupos controlo, de cada um dos procedimentos que farão parte do projeto. Indique quais as fontes de aconselhamento consultadas para esse efeito.

O número de animais foi estabelecido por forma a permitir obter, em cada ensaio realizado, um número de réplicas que permitam a validação dos resultados obtidos. Serão estabelecidos 3 grupos de animais, cada um com o máximo de 6 espécimes (4 fêmeas e 2 machos).
Grupo 1: animais não vacinados; uma administração intradérmica de 0,5 mL de soluto fisiológico, ao dia 30;
Grupo 2: animais vacinados com 0,5 mL de Mixohipra-FSA; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30;
Grupo 3: animais vacinados com 0,5 mL de MIXOHIPRA-H; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30
Uma vez que cada grupo conterá animais dos dois sexos, na eventualidade de haver reprodução, será testada a passagem de imunidade para a descendência.

4.5. Foi considerada alguma colaboração com outro estabelecimento (interno ou externo) para reduzir o número de animais utilizados (utilização conjunta dos animais) (por exemplo, diferentes órgãos do mesmo animal são usados em mais de um laboratório)?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Tanto quanto conhecemos (o Projeto tem como parceiros as Autoridades Nacionais em matéria de Conservação da Natureza e Saúde Animal), não existe em Portugal nenhum grupo de investigação que pretenda levar a cabo este ensaio.

REFINEMENT (REFINAMENTO)

4.6. Forneça informações sobre a escolha da espécie animal, procedimento(s) e limites críticos e explique por que razão são os mais refinados para o objetivo requerido.

A espécie (*Lepus granatensis*) utilizada é a espécie alvo do estudo.

4.7. Para cada procedimento do projeto, forneça detalhes sobre como minimizar o sofrimento dos animais a envolver.

A captura de animais será feita com i) redes e batidas e com ii) caixas armadilha sob monitorização frequente, para reduzir o *stress* aos animais. O transporte será feito em caixas individuais de dimensões adequadas para evitar traumatismos. Os animais serão colocados num dos parques do Clube de Caça Almiara e Infesto. A colheita de sangue será feita sob sedação com Midazolam (1mg/kg) para redução do *stress*.

4.8. Para cada um dos procedimentos em que se preveja infligir uma severidade de grau Moderado ou Severo aos animais, justifique a razão para que a realização dos mesmos seja necessária.

Não se prevê a realização de procedimentos aos animais com um grau de severidade *moderado* ou *severo*.

4.9. Uma vez iniciado o projeto, os animais vivos serão removidos da instalação onde estão alojados? Se sim, explique qual a razão, indique como será feito o transporte, para que local serão levados, por quanto tempo e se retomam para a instalação de origem ou para outra.

Não.

ANIMAIS

4.10. Espécie animal a utilizar no projeto.

Lepus granatensis

4.11. Irão ser utilizadas formas fetais de mamíferos ou formas larvares de alimentação autónoma? Se sim, especifique.

Não.

4.12. Estirpe(s) a utilizar.

Não aplicável uma vez que é uma espécie selvagem

4.13. Estatuto genético dos animais a utilizar:

X	Tipo selvagem
	Geneticamente alterados sem fenótipo nocivo
	Geneticamente alterados com fenótipo nocivo.

4.14. Animais geneticamente alterados. Especifique se o projeto em apreço envolve:

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e sem problemas de bem-estar (sem fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta a ocorrência desses efeitos adversos.
	Não
	A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e com problemas de bem-estar (com fenótipo nocivo). - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo dos animais e/ou a ocorrência de efeitos adversos.
	Não
	Criação de uma nova linhagem de animais geneticamente alterados. - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto esperado da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de maneio, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo esperado dos animais.
	Não

4.15. Origem dos animais (estabelecimento, país, etc)

Alentejo e Algarve

4.16. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **especificamente criados para serem utilizados para fins científicos**? Se não, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais a utilizar neste projeto não foram especificamente criados para fins científicos.

Trata-se de uma espécie selvagem. Não existe espécie alternativa para o propósito deste teste, já que se pretende testar a resposta específica desta espécie à vacinação.

4.17. Os animais a serem utilizados neste projeto foram **capturados no meio selvagem**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais precisam de ser capturados no meio selvagem.

Sim. Não existe espécie alternativa para o propósito deste teste nem existem lebres em cativeiro que possam ser utilizadas.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Se sim, tem um parecer favorável emitido pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas para a captura dos animais? Em caso afirmativo, anexe a este pedido de autorização de projeto, cópia desse mesmo parecer.

Captura com redes e passagens armadilhadas com mecanismo de alavanca, mediante autorização do ICNF (anexo).

4.18. Os animais a serem utilizados neste projeto são **errantes ou assilvestrados de alguma espécie animal doméstica**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais um animal errante ou assilvestrado de uma espécie doméstica precisa de ser utilizado neste projeto.

Não.

4.19. Os animais a serem utilizados neste projeto pertencem a alguma **espécie ameaçada de extinção**? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais é necessário utilizar uma espécie ameaçada de extinção neste projeto.

Não sendo o seu estatuto de conservação considerado ameaçado, verifica-se uma redução preocupante das populações selvagens. Este ensaio pretende precisamente avaliar a eficácia de vacinas comerciais na proteção contra o vírus da mixomatose, com o objetivo ultimo da preservação da espécie.

CARACTERÍSTICAS DO MANEIO A PRESTAR AOS ANIMAIS

4.20. No caso de ser feito enriquecimento ambiental ao alojamento dos animais, descreva-o.

O alojamento durante a vacinação consiste em parques ao ar livre com características semelhantes ao habitat próprio da espécie, não sendo necessário proceder a enriquecimento ambiental; durante a contraprova os animais serão mantidos em instalações fechadas, cumprindo as normas existentes em termos de área mínima individual de solo, de alimentação e de abeberamento, também localizadas no Viveiro Florestal de Évora

4.21. Os animais a utilizar no projeto necessitam de condições de alojamento especiais? Se sim, especifique que condições e justifique a necessidade das mesmas terem que ser utilizadas.

Sim. Redes altas ou espaços fechados para evitar a fuga dos animais e infraestruturas que facilitem a captura e manipulação dos mesmos. Antiparasitários externos para evitar a picada de insetos.

4.22. Os animais a utilizar no projeto necessitam de dieta alimentar ou de abeberamento especiais? Se sim, especifique.

Não

4.23. Os animais a utilizar no projeto necessitam de prestação de cuidados ou de atenção especiais? Se sim, especifique.

Sim, avaliação clínica e seronegatividade para mixomatose

4.24. Os animais serão alojados individualmente? Se sim, forneça detalhes das circunstâncias, período de tempo e justificação para que se faça o alojamento individual.

Durante a quarentena e vacinação os animais serão mantidos em parques em grupos de 5 a 7; durante a contraprova, serão mantidos em gaiolas individuais. Duração do período de alojamento individual?

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

REUTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

4.25. Algum dos animais a utilizar neste projeto foi previamente usado num outro estudo/utilização para fins científicos? Se sim, em que condições? Justifique a necessidade de envolvimento do mesmo neste projeto.
De notar que para um animal poder ser reutilizado, têm que estar satisfeitas as condições referidas nas alíneas a) a d), do ponto 1, do artigo 16º, do Decreto-Lei nº 113/2013. Assim, forneça informações sobre: o título do projeto prévio em que foi utilizado, a severidade efetiva do procedimento a que ficou sujeito, estado geral de saúde e de bem-estar do animal, parecer médico-veterinário sobre o envolvimento do animal num novo procedimento, tendo em conta a duração de vida do animal.

Não.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SESSÃO 5: INFORMAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS E O DESENHO EXPERIMENTAL

SEQUÊNCIA DE ACONTECIMENTOS

5.1. Faça uma descrição completa e exata, acompanhada por uma linha temporal, de todos os eventos e procedimentos (devidamente identificados e numerados) que irão acontecer a cada animal (ou grupo de animais), desde a altura em que são obtidos até à altura em que o projeto é finalizado.
No caso de melhorar a clareza da descrição do plano do projeto, ilustre as diferentes etapas acima mencionadas com um fluxograma ou um esquema.

1. Dia 0;
   Vinte e quatro dos animais de vida livre capturados (n≤35), e negativos para a presença de anticorpos contra o vírus da mixomatose, serão introduzidos em 4 parques do Parque de Recria (6 animais por parque), onde permanecerão em quarentena por um período de 30 dias.
   À chegada, os animais serão submetidos a exame clínico, efetuado pelos médicos veterinários da equipa. Esta avaliação clínica incluirá a determinação do peso, a avaliação da dentição, morfometria (nomeadamente cabeça, orelha, corpo, tarso), avaliação da pelagem, avaliação do estado das mucosas, do estado nutricional geral e da temperatura retal.
   Serão responsáveis pela avaliação clínica Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV) e Carina Carvalho (INIAV).

2. Dia 30;
   Uma vez concluída a quarentena, a vacinação das lebres será efetuada no cumprimento das recomendações do respetivo fabricante no que toca à sua aplicação ao coelho doméstico, nomeadamente no que concerne à dose e local de administração.
   No grupo 1, nenhum animal será vacinado, constituindo a controlo negativo do ensaio. Será utilizado soluto fisiológico na inoculação dos animais.
   No Grupo 2 será efetuada com vacina heteróloga contendo o vírus do Fibroma de Shope (SFV).
   Os animais do grupo 3 serão vacinados com a vacina MIXOHIPRA-H (vírus da mixomatose atenuado).
   Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

3. Dia 60;
   Um mês depois da vacinação será efetuada a contraprova em 50% dos animais de cada grupo, por inoculação de vírus de campo. A administração será efetuada depois da colheita de sangue e de fezes.
   Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

4. Dia 30, dia 37, dia 45, dia 52, dia 60, dia 67;
   Os animais serão submetidos a avaliação clínica seguida de colheita de amostras, com uma periodicidade semanal.
   Caso se verifique o aumento continuado dos títulos de anticorpos para além do dia 60, sem desenvolvimento de sinais clínicos a colheita será mantida por um período adicional que não

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

excederá um total de ensaio de 4 meses.
A colheita de sangue (2 ml/animal) para determinação da curva de produção de anticorpos e para avaliação sanitária, será efetuada sob sedação prévia com Midazolam (1mg/kg). As outras matrizes, nomeadamente urina e fezes, serão colhidas de forma não invasiva por recurso a zaragatoa retal e a compressão do abdómen.
Serão responsáveis por esta atividade Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e Sebastião Miguel (ANPC).

Os dias das colheitas poderão sofrer algum desvio (1 a 3 dias) de acordo com a conveniência doa intervenientes.
As análises laboratoriais (necrópsias, exames anatomopatológicos, exames virológicos e parasitológicos) serão realizadas no INIAV-Pólo de Oeiras.
A pesquisa do vírus da mixomatose em sangue, na urina e nas fezes, por métodos moleculares nos materiais colhidos, será efetuada pelo PCR em tempo real (método desenvolvido por Duarte et al., (2014)).
A pesquisa de anticorpos contra o vírus da mixomatose, será efetuada em soro obtido a partir de sangue, por ELISA comercial (CIVTEST® cuni Mixomatosis, laboratórios Hipra), adaptada se necessário a esta espécie.
Todos estes ensaios serão realizados nos Laboratórios do INIAV.
Serão responsáveis por estas atividades, Margarida Duarte (INIAV), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Carina Carvalho e Teresa Fagulha (INIAV).

5. Dia 67; este número é para 1 semana de vida depois do challenge
Os animais serão sacrificados por injeção de Pentobarbital sódico (100 mg/kg por via intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV)), no final do ensaio (dia 67, ie 7 dias após o Challenge), ou mais cedo, se ocorrer alguma evidência de desenvolvimento de doença ou de sofrimento.

Os exames anatomopatológicos dos animais eutanasiados serão efetuados no INIAV pela equipa de patologia no Laboratório de Patologia do INIAV. Será efetuada histopatologia de fígado, baço, pulmão, duodeno, rim, linfonódulos mesentéricos, coração, traqueia, timo e pulmão.
Serão responsáveis por esta atividade, Fábio Abade dos Santos (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV). Caso se verifique o aumento continuado dos títulos de anticorpos para além do dia 120, a colheita será mantida por um período que não excederá um total de ensaio de 4 meses.
A colheita de sangue (2 ml/animal) para determinação da curva de produção de anticorpos e para avaliação sanitária, será efetuada sob sedação prévia com Midazolam (1mg/kg). As outras matrizes, nomeadamente urina e fezes, serão colhidas de forma não invasiva por recurso a zaragatoa retal e a compressão do abdómen.
Serão responsáveis por esta atividade Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e Sebastião Miguel (ANPC)

6. (dia 0, dia 30, dia 45, dia 60, dia 75, dia 90, dia 105, dia 120). Será efetuada a pesquisa do vírus da mixomatose em sangue, na urina e nas fezes, por metodos moleculares. A pesquisa de vírus da mixomatose será efetuada pelo PCR em tempo real (método desenvolvido por Duarte et al., (2014)).
A pesquisa de anticorpos contra o virus da mixomatose, será efetuada em soro obtido a partir de sangue, por ELISA comercial (Ingenasa), adaptada se necessário a esta espécie.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para o virus da mixomatose será efetuada por ensaio iELISA (metodologias standard). Todos estes ensaios serão realizados nos Laboratórios do INIAV. Serão responsáveis por estas atividades, Margarida Duarte (INIAV), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Teresa Fagulha (INIAV) e Jorge Correia (FMV). 7. Se no final do ensaio houver alguma evidência de desenvolvimento de doença, ou o surgimento de lesão no local da vacinação, os animais vacinados serão sacrificados por injeção de Pentobarbital sódico (100 mg/kg por via intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV)). Nestes casos, os exames anatomopatológicos serão efetuados no INIAV pela equipa de patologia e na FMV no Laboratório de Patologia. Será efetuada histopatologia, sempre que se observarem lesões macroscópicas. Serão responsáveis por esta atividade, Fábio Abade dos Santos (INIAV)

DESENHO EXPERIMENTAL

5.2. <u>Para cada um dos procedimentos</u> que irão ser realizados a cada animal (ou grupo de animais), preencher a tabela em baixo, indicando e descrevendo cada item contido na mesma:

Título do procedimento:	Quarentena
Nº do procedimento:	1
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir que os exemplares capturados estão em boa condição física e livres de doenças infeciosas, nomeadamente mixomatose.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 36
Técnica utilizada:	Manutenção dos animais em parques fechados com alimento e água *ad libitum*
Duração do procedimento:	30 a 40 dias
Frequência do procedimento:	Uma vez, na receção dos animais
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Os associados à permanência e adaptação dos animais aos parques
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeiros
Destino dos animais no final do procedimento:	Terminada a quarentena os animais serão vacinados no mesmo local
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não nesta fase

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

(1) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
(2) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não aplicável.

Título do procedimento:	Exame clínico
Nº do procedimento:	2
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir o bom estado sanitário dos espécimes. Estimar a idade dos animais. Sexagem dos animais. Reunir dados morfométricos da espécie.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 24.
Técnica utilizada:	Manuseamento, pesagem, auscultação
Duração do procedimento:	10 minutos
Frequência do procedimento:	Na chegada, no final da quarentena, nas colheitas de amostras
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não.
Estabelecimento de limites	Não aplicável.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

críticos:	
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	*Stress* inerente à manipulação dos animais.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Vacinação
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável

(3) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(4) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não aplicável.

Título do procedimento:	Vacinação

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Nº do procedimento:	3
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Este procedimento é incontornável na persecução dos objetivos identificados
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 36
Técnica utilizada:	Administração da vacina por via subcutânea.
Duração do procedimento:	5 minutos
Frequência do procedimento:	Uma única vez
Anestesia associada?:	Não. Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Analgesia associada?:	Não. Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Algum *stress* resultante da manipulação dos animais, minimizado se necessário por sedação
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Permanência em parques onde serão objeto de exame clínico e recolha de amostras para avaliação do estado sanitário e da cinética de produção de anticorpos.
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o principio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não nesta fase.

(5) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(6) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infecioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Os produtos a administrar são 2 vacinas atenuadas, comercializadas há muito anos para coelho doméstico e também aplicadas a coelho-bravo quando criado em explorações de produção cinegética. São estirpes vacinais atenuadas de vírus da mixomatose (Grupos 2), estirpe do vírus do Fibroma de Shope (Grupo 3). Os Vírus vacinais serão administrados na dose recomendada pelos fabricantes, por via subcutânea (ou outra recomendada pelo fabricante) uma única vez.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Não

Título do procedimento:	Colheita de amostras
Nº do procedimento:	4
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Na receção dos animais, a colheita de amostras e subsequentes exames laboratoriais, permitirá confirmar que os animais não tiveram contacto com o vírus da mixomatose e que não possuem anticorpos circulantes contra este vírus. Os resultados negativos nesta fase, são por isso fundamentais para posteriormente se verificar se a vacinação induz, ou não, a produção de imunidade protetora
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	Máximo de 24
Técnica utilizada:	Colheita de sangue: colheita de sangue na veia jugular externa, após sedação com Midazolam. Colheita de fezes: zaragatoa retal Colheita de urina: compressão do ventre e colheita da urina expelida.
Duração do procedimento:	20 a 30 minutos/animal
Frequência do procedimento:	Dia 0 (receção) dia 30 (final da quarentena), dia 45, dia 60, dia 75, dia 90, dia 105, dia 120
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência?
Estabelecimento de limites críticos:	
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeira
Destino dos animais no final do procedimento:	Eutanásia dos animais que adoecerem. Os animais que desenvolverem imunidade, serão testados para garantir a não eliminação do vírus nas fezes e urina, e utilizados para a criação de uma reserva genética em Elvas (Medida 7.9)

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

(7) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(8) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluído se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

O procedimento envolve a colheita de amostras de sangue, fezes e urina. A colheita de sangue será efetuada por punção da veia jugular externa sob sedação, a colheita de fezes por zaragatoa retal e a colheita de urina por compressão externa do abdómen. As colheitas serão realizadas quinzenalmente.

Título do procedimento:	Exames laboratoriais
Nº do procedimento:	5
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Garantir que os exemplares estão em boa condição física e sanitária antes da vacinação; Após a vacinação, verificar a produção de anticorpos.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	24
Técnica utilizada:	PCR, ELISA, seroneutralização, etc

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Duração do procedimento:	Ao longo do ensaio
Frequência do procedimento:	8 a 10 vezes cada tipo de teste, ao longo do ensaio
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável.
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não aplicável.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Não aplicável.
Destino dos animais no final do procedimento:	Não aplicável.
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Título do procedimento:	Sacrifício dos animais
Nº do procedimento:	6
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 se houver evidências de doença ou excreção viral.
Espécie animal:	*Lepus granatensis*
Nº de animais a utilizar:	24 no máximo
Técnica utilizada:	Injeção IV de Pentobarbital de sódio, após sedação com Midazolan
Duração do procedimento:	5 minutos
Frequência do procedimento:	1x
Anestesia associada?:	Pentobarbital de sódio, 100mg/kg IV Sim
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não
Estabelecimento de limites críticos:	Não aplicável.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Ligeiros.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Não recuperação.
Destino dos animais no final do procedimento:	Eutanásia e incineração (animais doentes e/ou a excretar vírus) Reserva genética em Elvas: animais saudáveis, imunizados
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo:

(9) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(10) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

Não aplicável

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Quando o **procedimento for a administração de uma substância**, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Midazolan, (1mg/kg), IM Pentobarbital de sódio, 100mg/kg IV ou IP

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluido se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 6: RESUMO NÃO TÉCNICO DO PROJETO

De notar que, de acordo com a alínea b), do artigo 43º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, no pedido de autorização de um projeto deverá ser incluído um **resumo não técnico do projeto**, e considerou-se de utilidade que o mesmo faça parte da presente secção.
O resumo deverá ser redigido claramente usando termos não técnicos, sempre que possível, por forma a poder ser facilmente entendido por um leigo. Para além disso, de acordo com o artigo 49º do Decreto-Lei, o projeto deverá ser explicado salvaguardando sempre a propriedade intelectual e as informações confidenciais que identifiquem quer as pessoas envolvidas no projeto quer o estabelecimento onde os animais serão alojados.
O resumo não técnico será posteriormente publicitado no sítio da Internet da DGAV.

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Ensaio *in vivo* da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica utilizando vacinas atualmente disponíveis no mercado para coelho doméstico.		
Duração do projeto	3 a 4 meses		
Palavras-chave (máx. 5)	*Lepus granatensis*, Lebre, Vacina, Mixomatose-ibérica		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) (1)	Investigação fundamental	Sim	
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	
	Uso regulamentar e produção de rotina		Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais		Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;	Sim	
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal		Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados (2)		Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	Eficácia das vacinas desenvolvidas para coelho, quando aplicadas em lebre-ibérica.		
Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?	Proteção de populações selvagens de lebre-ibérica através da vacinação.		

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?	*Lepus granatensis* (lebre-ibérica), num total de 18 animais.		
No contexto do que é proposto fazer-se aos animais, quais são os efeitos adversos esperados e o grau provável/esperado de severidade? O que acontecerá aos animais no final da realização do projeto?	Os animais que apresentarem evidências de doença ou excreção viral serão sacrificados. Os restantes serão libertados em local controlado (reserva genética em Elvas)		
Aplicação dos 3Rs			
1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais	Não existem sistemas *in vitro* que permitam analisar a resposta de um animal, neste caso a lebre-ibérica, à vacinação (neste caso contra a mixomatose).		
2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais	O número de animais a utilizar foi reduzido ao mínimo necessário para obter resultados estatisticamente significativos. Com o número de 6 animais por grupo pretende-se avaliar a variabilidade individual da resposta à vacinação com cada uma das 3 estirpes escolhidas.		
3.Refinement (Refinamento) Explique a escolha da(s) espécie e a razão porque o modelo(s) animal que serão usados são os mais refinados, tendo em conta os objetivos. Explique as medidas gerais que serão tomadas para minimizar os custos de bem-estar (danos) aos animais.	Os animais serão mantidos em instalações adaptadas à espécie e alojados em grupos.		
Para uso oficial			
O projeto será submetido a avaliação retrospetiva?	Sim?		Observações

Notas: (1) Elimine Sim ou Não, conforme apropriado.

(2) Com esta opção deverá ser escolhido, pelo menos, um fim/objetivo adicional.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

SECÇÃO 7: DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL

1. Li o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".
2. Confirmo que o uso de animais neste projecto estará de acordo com o diploma supracitado e com outras orientações dadas pela entidade competente.
3. Eu aceito a responsabilidade pela condução do projecto tal como delineado nesta aplicação, de acordo com a legislação.
4. Eu declaro que tenho as qualificações e a experiência apropriadas para realizar os procedimentos descritos neste projecto ou para assegurar que eles são feitos corretamente.
5. Eu declaro que cada pessoa envolvida neste projeto foi adequadamente instruída e é competente para levar a cabo os procedimentos por que são responsáveis.
6. Eu declaro que estão disponíveis os meios adequados para levar a cabo este projeto.
7. Confirmo que o Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde irá decorrer o projeto, emitiu um parecer não vinculativo sobre o mesmo, o qual anexo a este pedido.

Nome	Assinatura	Data
Maria Margarida Dias Duarte		4.12.19

DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Data
Fábio Abade Santos		4.12.19

DA PESSOA PERTENCENTE AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS (ORBEA) EM QUEM O RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS DELEGUE COMPETÊNCIA

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Função assumida no ORBEA	Data
Sandra Cavaco Gonçalves			

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

Antes da submissão do formulário verifique se:

1. Respondeu a todas as questões (mesmo que a sua resposta seja "Não aplicável" ou que tenha rasurado os campos não aplicáveis);
2. Todas as pessoas envolvidas no projeto foram identificadas na Secção 1;
3. O utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais fica claramente identificado;
4. O estabelecimento(s)/local onde irão ficar alojados os animais e decorrer os procedimentos fica(m) identificado(s);
5. O investigador responsável leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
6. O responsável pelo estabelecimento onde os animais serão alojados (ou o membro do Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA, artigo 34º do Decreto-Lei) a quem este delegue essa competência) leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
7. O resumo não técnico do projeto está redigido em português e de acordo com os requisitos estipulados no artigo 49º do Decreto-Lei;
8. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, o **parecer não vinculativo** emitido pelo **Órgão responsável pelo bem-estar dos animais** do estabelecimento onde os animais irão ser alojados, de acordo com o ponto 2, do artigo 43º do Decreto-Lei;
9. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, se aplicável para o projeto em apreço, o **parecer favorável** emitido pelo **Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas**, no que diz respeito à utilização de animais capturados no meio selvagem, de acordo com o ponto 2, do artigo 9º do Decreto-Lei.

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TLF. 21 323 95 00 FAX 21 323 95 65

REQUERIMENTO
PARA AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE VACINAÇÃO EM LEBRE-IBÉRICA NO CONTEXTO DO PROJETO +COELHO 2

Exmo. Senhor Diretor-Geral da Alimentação e Veterinária
Professor Doutor Fernando d' Almeida Bernardo

No âmbito dos *Ensaios Clínicos* previstos no artigo 97º do Capitulo VIII do Decreto-Lei nº 209/09 de 28 de outubro, nomeadamente na sua alínea b) (*estabelecer a eficácia de uma substância ou medicamento veterinário experimental a realizar em animais saudáveis para uma indicação profilática)*, e nos moldes especificados nas alíneas *a)* a *h)* do n.º 2 do artigo 99º do decreto-lei n.º 148/2008 de 29 de julho, venho solicitar a V. Exa, autorização para a realização de um **ensaio de vacinação em exemplares capturados de lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) para avaliação da eficácia de vacinas para mixomatose nesta espécie**, assim como a **isenção do pagamento da taxa de quinhentos euros (500€) prevista na Portaria nº27/2011 de 10 de janeiro**.

Este ensaio enquadra-se nas medidas previstas no Projeto +Coelho2, intitulado "*Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal*", que põe em prática, no seu segundo ano, o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, deliberado pelo Despacho 4557/2017 de 31 de maio do MAFDR. O financiamento dos Projetos +Coelho1 (agosto de 2017 a outubro de 2018) e +coelho2 (iniciado a novembro de 2018) tem sido assegurado pelo Fundo Florestal Permanente (FFP), através do seu IV Eixo de Intervenção - Funções ecológicas, sociais e culturais da floresta.

a) É **requerente** deste pedido de autorização, o **Grupo de Trabalho +Coelho, representado por Margarida Duarte, Investigadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.),** com sede no Polo de Oeiras, sito na Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras. O Grupo de Trabalho +Coelho é constituído por nove instituições nomeadamente, pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.), pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), pela Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), pela Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP), Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC), pelo Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO)), pelo Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET) e pela Ordem dos Médicos Veterinários (OMV).

b) **Justificação científica para a metodologia do ensaio;**

Os casos esporádicos de mixomatose em lebre europeia, registados no passado, foram raramente acompanhados de sintomatologia. No entanto, desde julho de 2018, em Espanha e em Portugal (OIE, 2018), tem vindo a ocorrer mortalidade inesperada e alarmante em lebres, associada à infeção

pelo vírus da mixomatose. Este vírus apresenta, contudo, diferenças genéticas, quando comparado com o vírus da mixomatose que circula nas populações silvestres de coelhos. Esta diferença no genoma consiste mais concretamente na inserção de uma região adicional de 2,8kb localizada na zona codificante das proteínas não-estruturais (Dalton et al., 2019). Por esta razão, é expectável que os anticorpos desenvolvidos contra as proteínas estruturais do MYXV de coelho, que estão também presentes sejam neutralizantes do vírus mutante encontrado na lebre.

Este ensaio piloto que transpõe para outra espécie - a lebre-ibérica, uma prática profilática, segura e de aplicação rotineira, utilizada no controlo da mixomatose em coelhos domésticos, nomeadamente a vacinação com vacinas comerciais que constam na Lista de Medicamentos Veterinários autorizados pela DGAV.

Serão utilizados 3 grupos de animais:
Grupo 1: animais não vacinados; uma administração intradermica de 0,5 mL de soluto fisiológico, ao dia 30;
Grupo 2: animais vacinados com 0,5 mL de Mixohipra-FSA; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30;
Grupo 3: animais vacinados com 0,5 mL de MIXOHIPRA-H; uma única administração via intradérmica, no lado interno do pavilhão auricular ao dia 30

As vacinas comerciais utilizadas nos grupos 2 e 3, estão disponíveis há muitos anos no mercado ibérico e europeu e constam da lista de medicamentos veterinários autorizados pela DGAV.

A resposta humoral das lebres à vacinação com as vacinas comerciais (Grupos 2 e 3), será avaliada e comparada com o grupo controlo negativo (grupo 1, animais não serão vacinados), através da construção da cinética de produção de anticorpos específicos para o vírus da mixomatose ao longo de 60 dias, utilizando-se, para esse efeito, um kit iELISA comercial para deteção de anticorpos anti-MYXV (CEVITEST).

A capacidade de neutralização destes anticorpos será investigada por **ensaio de inoculação contraprova (*Challenge*) com vírus de campo**, isolado a partir de uma lebre infetada, em dose conhecida e quantificada (TCID 50) e idêntica para todos os animais.

Uma vez que a imunidade desenvolvida para algumas famílias de vírus, nomeadamente *Poxviridae*, não tem como componente principal a imunidade humoral, a avaliação da produção e a determinação dos títulos de anticorpos não é indicativa, de forma isolada, do grau de proteção conferida ao animal (Kerr, 2012). Assim, tendo em vista que a imunidade celular pode ter um papel preponderante nesta proteção, a avaliação desta componente da resposta é de crucial importância (Apostolopoulos and Marincola, 2010).

Assim, por forma a obtermos uma avaliação realista da resposta humoral e celular, proceder-se-á a uma prova experimental *in vivo*, com inoculação dos diferentes grupos de animais com vírus isolado e multiplicado de um cadáver de lebre infetado com vírus. Embora os títulos de anticorpos desenvolvidos possam ser indicativos de uma proteção contra infeção pelo vírus da mixomatose,

pelas razões expostas, a contraprova não poderá ser substituída por ensaios de seroneutralização *in vitro*.

A contraprova dos animais vacinados e do grupo controlo, será realizada através da administração, por via subcutânea, de uma dose conhecida e idêntica para todos os animais, de uma preparação contendo vírus da mixomatose (estirpe de campo isolada a partir de lebres infetadas). A ausência de desenvolvimento de sinais clínicos de doença, ausência de virémia e de excreção viral pelas fezes e urina, permitirá esclarecer se a imunidade conferida pela vacinação impede eficazmente a progressão da infeção por este vírus, geneticamente distinto, nas lebres.

É expectável que os animais do grupo Controlo Negativo (Grupo 1, não vacinados), não desenvolvam doença após a contraprova, sendo eutanasiados assim que se produzam os primeiros sinais de doença e se confirme a infeção por testes laboratoriais.

O ensaio de vacinação pretende precisamente esclarecer se as diferentes vacinas comerciais existentes, destinadas a coelho Europeu, induzem, ou não, proteção imunitária contra a infeção pelo vírus da mixomatose que emergiu recentemente em lebre. Este vírus é geneticamente distinto do vírus da mixomatose que circulou, e circula em coelhos, na medida em que um gene da região do genoma viral que codifica as proteínas não-estruturais está interrompido pela adição de uma região suplementar (Dalton et al, 2019).

A espécie alvo do ensaio (a lebre-ibérica) é distinta daquela para a qual as referidas vacinas foram produzidas (o coelho doméstico-*Oryctolagus cuniculus*). **A utilização de exemplares de *L. granatensis* é por isso incontornável** para se alcançar o objetivo final deste ensaio, uma vez que se pretende investigar a dinâmica da resposta imunitária da lebre e o nível de proteção conferida por vacinação.

c) **O objetivo** deste ensaio clínico é **esclarecer se as vacinas comerciais atualmente disponíveis para o controlo da mixomatose em coelho doméstico, poderão vir ser utilizadas no futuro com sucesso** em reservas genéticas ou em cercados de reprodução que venham a ser criados para garantia da preservação desta espécie.
A medida 7.6 (*Avaliação da eficácia de vacinas comerciais contra mixomatose em lebre-ibérica*) do Projeto +Coelho 2, devidamente contextualizada na respetiva Memória Descritiva, prevê a realização deste ensaio clínico.

d) **São Promotor, Monitor e Investigador do referido ensaio os seguintes médicos veterinários;**
Promotor: Grupo de Trabalho +Coelho
Monitor: Grupo de Trabalho +Coelho
Investigador: Grupo de Trabalho +Coelho

e) **O médico veterinário que assegurará o cumprimento das condições de saúde e bem-estar animal, assim como a salvaguarda da Saúde Pública veterinária;**
Fábio Abade dos Santos, médico veterinário CP 7365, membro da equipa do INIAV

f) **Serão adotadas as seguintes condições, no domínio da proteção dos animais utilizados no ensaio, nos termos do artigo anterior;**

Neste ensaio procura-se seguir a política dos 3 R: Replacement, Reducing e Refinement. Nesse sentido, será utilizado o menor número possível de animais (n=6 por grupo), mas que, ao mesmo tempo, garanta a validade e robustez do ensaio. Por outro lado, a substituição destes animais por outra espécie, ou por um sistema de avaliação *in vitro*, não é possível. A necessidade de realização deste ensaio é suportada pela elevada mortalidade registada nas populações silvestres desta espécie, o que justifica a utilização deste pequeno grupo de animais por forma a fornecer dados importantes para a construção de soluções face a esta ameaça às populações selvagens. Por último, o ensaio está a ser conduzido por uma equipa alargada e multidisciplinar, que inclui virologistas, patologistas, ambientalistas e gestores, que garantirá que todas as metodologias serão aplicadas da melhor forma com vista a reduzir o *stress*, sofrimento e dor causados aos animais. Um exemplo da forma como se está a lidar com estas preocupações é o facto de estarem a ser construídas instalações para alojamento dos animais em condições similares às do campo para realização da fase de quarentena e vacinação, em detrimento do alojamento dos animais em gaiolas durante todo o processo, que conduziria inevitavelmente a um *stress* bastante superior ou mesmo a morbilidade/mortalidade nos animais visto que são capturados no meio selvagem e não estão adaptados a cativeiro.

A comida (feno de luzerna suplementada com alimento pelletizado com 14% de proteína bruta) será disponibilizada *ad libitum*, com água fresca, substituída de dois em dois dias.

Para evitar o desenvolvimento de patologia intestinal, frequente nos leporídeos por alteração brusca da dieta, estes *pellets* serão introduzidos de forma muito gradual, ao longo da primeira semana de quarentena, sendo as fezes avaliadas diariamente neste período para precessão da capacidade de adaptação dos animais à dieta.

A colheita de sangue dos animais será realizada sob sedação de acordo com o protocolo desenvolvido e aceite para publicação (Abade dos Santos F.A. et al, 2019). Será utilizada uma agulha de calibre reduzido (26 G) por forma a minimizar o sofrimento e sempre que se justifique creme anestésico de lidocaína no local de inoculação da vacina e de colheita de sangue.

Caso se verifique reprodução, os juvenis serão utilizados para o esclarecimento da transmissão de imunidade passiva, ei através do colostro.

g1) **Informação relativa ao(s) local(ais) para realização do ensaio**

O ensaio será realizado no Clube de Caça Almiara e Infesto, uma Zona de Caça Associativa (Processo nº 798 do ICNF).

Este espaço, outrora dedicado à criação de perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*), é um espaço totalmente vedado, com 266 hectares de extensão e com um único acesso.

Dispõe de 8 parques que serão utilizados para acomodar os animais durante a quarentena e a vacinação. Foram efetuadas visitas ao local, por membros das equipas do INIAV e DGAV, e identificadas as intervenções necessárias para adequar as instalações à realização do referido ensaio.

A contraprova será realizada em unidade adaptada para o efeito colocada nas instalações do INIAV em Dois Portos.

g2) **Informação relativa ao pessoal**

O ensaio será conduzido por uma equipa multidisciplinar, constituída por elementos do INIAV, DGAV, ICNF e por pessoas contratadas para a manutenção dos animais, assegurando assim competências e complementaridades nos vários domínios que enquadram o ensaio, nomeadamente saúde animal, diagnóstico laboratorial, epidemiologia, boas práticas, prática clínica de pequenos animais e ecologia e gestão de espécies silvestres cinegéticas;

Margarida Duarte (DVM, Médica Veterinária do INIAV)
Sandra Cavaco (DVM, Médica Veterinária do INIAV)
Carina Carvalho (DVM, Médica Veterinária do INIAV)
Fábio Abade Santos (DVM, Médico Veterinário do INIAV/FMV Lisboa)
Patrícia Tavares (DVM, Médica Veterinária da DGAV)
Pedro Melo (DVM, Médico Veterinário da DGAV)
Gonçalo Lopes (Engº Florestal do ICNF)
Ana Hora (Engª Florestal do ICNF)
Sebastião Miguel (Gestor Cinegético)

g3) **Informação relativa às instalações**

As instalações necessárias para a realização do ensaio compreendem duas áreas distintas:

1) *Pavilhão de Recria*:

Durante o período de quarentena e vacinação, os animais serão acomodados em 4 dos 8 parques existentes, no Pavilhão de Recria. Estes parques são paralelos e independentes. Será mantido um parque vazio entre cada dois grupos de animais, para maior distanciamento e separação dos mesmos.

O grupo 1 (controlo negativo, animais não vacinados), será colocado num extremo do pavilhão. Será reservada uma área, foram do alcance visual de todos os animais, para realização dos procedimentos médicos (avaliação clínica e colheita de material).

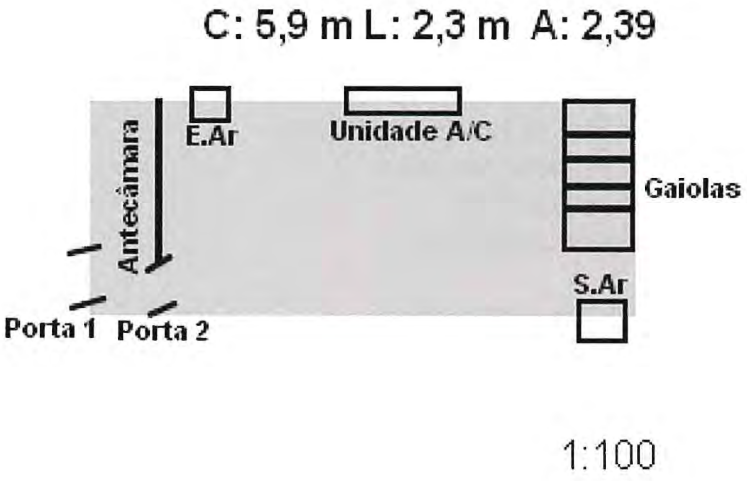
Cada um dos 8 parques é constituído por uma zona exterior, com cerca de 3m x 9m, de pavimento cimentado. Esta zona está rodeada de rede metálica vertical com cerca de 2,0m de altura e coberta por rede de fibra, protetora de predadores. Neste espaço exterior, os animais têm acesso a luz natural e a radiação solar direta.

Os animais podem aceder a uma zona interior, através de porta, proporcionando-lhes uma área abrigada, fresca e escura, com cerca de 3x3 m, também com pavimento em cimento, e paredes laváveis.

2) *Unidade de inoculação*: Esta fase do ensaio será realizada numa unidade hermética e isotérmica, construída em fibra de vidro, contendo uma antecâmara (sala 1), para mudança de roupa do pessoal, e uma sala para processamentos e instalação dos animais (sala 2), equipada com cabide, banco de apoio e mesa de trabalho. Nesta unidade será realizado também o alojamento dos animais em jaulas. A separação da zona dos animais da zona de trabalho é possível através de estrutura amovível em fibra de vidro que impede a visualização dos procedimentos realizados num determinado animal por parte dos restantes animais alojados.

As características da unidade, permitirá dispor de:

- ar estanque nas duas unidades;
- diferencial de pressões entre a sala 2 (-15 Pa) e o exterior;
- entrada de ar forçado e saída de ar filtrado por filtro HEPA H14 na sala 2;
- limpeza com água pressurizada de todas as superfícies das duas unidades;
- iluminação natural da sala 2 por janela de 1 x 1m, construída em vidro temperado;
- temperatura controlada por ar condicionado com termostato, colocado na sala 2, para garantia do bem-estar animal.



A sala 2 será equipada com uma mesa para manipulação dos animais e realização dos procedimentos previstos (manipulação dos animais; colheita de amostras, inoculação), e de contentores apropriados para despejo de material biológico infetado.

Os animais (50% de todos os grupos, i.e. 12 animais) serão mantidos em gaiolas individuais, colocadas em prateleiras. Os dejetos de cada gaiola serão recolhidos diretamente para sacos de plástico, contendo areia comercial para absorção de urina e cheios. As luvas, protetores de calçado e máscara serão descartadas para um contentor, colocado na Sala 2.

Estes sacos serão recolhidos periodicamente e eliminados diretamente para contentor adequado de cor verde.

Todos os testes serológicos e virológicos, assim como as necrópsias, serão efetuados no laboratório Nacional de Referência para as doenças dos animais, localizado no INIAV em Oeiras.

O transporte dos contentores será assegurado pela empresa Ambimed. Os cadáveres serão colocados em dois sacos de plástico e transportados em malas térmicas com acumuladores de frio, e transportados pelos médicos veterinários da equipa de acompanhamento, acompanhados de Folha de Requisição de Análises Oficial do INIAV (Modelo IMP-4.4-01.04/2) ou pela empresa Ambimed.

g4) **Informação relativa ao equipamento**

Discriminam-se de seguida os equipamentos, materiais e reagentes necessários para a realização do ensaio.

Equipamentos:

12 gaiolas para 12 animais (3 animais de cada grupo serão contraprovados);
2 eletrocutores de moscas e mosquitos;
1 ar-condicionado para aclimatização da sala dos animais;
1 frigorífico;
1 centrífuga da bancada;
1 contentor para cortantes;
1 contentor para material infetado;
1 mesa de inox para avaliação dos animais, colheita de amostras e vacinação;
1 termómetro;
1 estetoscópio;
Folhas de registo de dados;
SOPs (standard operation procedures);
Caneta de acetato;
Lápis;
Cronómetro;
Balança;
Régua;

Materiais:

Batas descartáveis;
Toucas descartáveis;
Botas descartáveis;
Luvas descartáveis;
Tubos para colheita de sangue (seco e com EDTA) e fezes;
Seringas de plástico;
Agulhas;
Zaragatoas;
Alimento composto para leporídeos;
Água estéril;
Rolo de papel absorvente;

Reagentes:

Mixohipra-H, LABORATORIOS HIPRA, S.A
Mixohipra-FSA, LABORATORIOS HIPRA, S.A.
Kit ELISA Ac MYXV (Civtest® cuni mixomatosis (laboratórios HIPRA))
Desparasitante externo (Cipermetrina)
Pentobarbital de sódio para eutanásia dos animais doentes no local;
Midazolam e Ketamina para sedação;

Outros:

Desinfetante de mãos;
Desinfetante de superfícies;
Desinfetante de chão (balde e esfregona);

Sacos de plástico;

Serviços de Transporte:

Transporte de cadáveres para o INIAV, será efetuado pela equipa de acompanhamento, sendo para cada cadáver acompanhado de uma ficha e requisição de análises do INIAV (Modelo IMP-4.4-01.04/2), onde serão realizadas as necrópsias;

Transporte dos contentores pela AMBIED.

g5) **Informação relativa ao(s) animais envolvidos no ensaio**

Total de 25 a 35 lebres (número dependente do sucesso das capturas).

Os 18 animais selecionados serão distribuídos por 3 grupos, cada um constituído por 6 lebres;

As capturas dos animais serão efetuadas em colaboração com as Organizações do Setor da Caça, por batida e uso de redes, mediante autorização do ICNF.

Os animais serão transportados em caixas de madeira construídas para o efeito.

Grupos de animais;

Grupo 1, controlo negativo (animais não vacinados);

Grupo 2, animais vacinados com vacinas MIXOHIPRA-SFV

Grupo 3, animais vacinados com vacina MIXOHIPRA-H

g6) **Calendarização do ensaio**

Dia 0;

Vinte e quatro dos animais de vida livre capturados (n≤35), e negativos para a presença de anticorpos contra o vírus da mixomatose, serão introduzidos em 4 parques do Parque de Recria (6 animais por parque), onde permanecerão em quarentena por um período de 30 dias. À chegada, os animais serão submetidos a exame clínico, efetuado pelos médicos veterinários da equipa. Esta avaliação clínica incluirá a determinação do peso, a avaliação da dentição, morfometria (nomeadamente cabeça, orelha, corpo, tarso), avaliação da pelagem, avaliação do estado das mucosas, do estado nutricional geral e da temperatura retal.

Serão responsáveis pela avaliação clínica Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV) e Carina Carvalho (INIAV).

Dia 30;

Uma vez concluída a quarentena, a vacinação das lebres será efetuada no cumprimento das recomendações do respetivo fabricante no que toca à sua aplicação ao coelho doméstico, nomeadamente no que concerne à dose e local de administração.

No grupo 1, nenhum animal será vacinado, constituindo a controlo negativo do ensaio. Será utilizado soluto fisiológico na inoculação dos animais.

No Grupo 2 será efetuada com vacina heteróloga contendo o vírus do Fibroma de Shope (SFV).

Os animais do grupo 3 serão vacinados com a vacina MIXOHIPRA-H (vírus da mixomatose atenuado).

Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

Dia 60;
Um mês depois da vacinação será efetuada **a contraprova** em 50% dos animais de cada grupo, por inoculação de vírus de campo. A administração será efetuada depois da colheita de sangue e de fezes.
Serão responsáveis por esta tarefa Fábio Abade dos Santos (INIAV/FMV), Carina Carvalho (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV).

Dia 30, dia 37, dia 45, dia 52, dia 60, dia 67;
Os animais serão submetidos a avaliação clínica seguida de colheita de amostras, com uma periodicidade semanal.
Caso se verifique o aumento continuado dos títulos de anticorpos para além do dia 60, sem desenvolvimento de sinais clínicos a colheita será mantida por um período adicional que não excederá um total de ensaio de 4 meses.
A colheita de sangue (2 ml/animal) para determinação da curva de produção de anticorpos e para avaliação sanitária, será efetuada sob sedação prévia com Midazolam (1mg/kg). As outras matrizes, nomeadamente urina e fezes, serão colhidas de forma não invasiva por recurso a zaragatoa retal e a compressão do abdómen.
Serão responsáveis por esta atividade Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e Sebastião Miguel (ANPC).

Os dias das colheitas poderão sofrer algum desvio (1 a 3 dias) de acordo com a conveniência doa intervenientes.
As análises laboratoriais (necrópsias, exames anatomopatológicos, exames virológicos e parasitológicos) serão realizadas no INIAV-Pólo de Oeiras.
A pesquisa do vírus da mixomatose em sangue, na urina e nas fezes, por métodos moleculares nos materiais colhidos, será efetuada pelo PCR em tempo real (método desenvolvido por Duarte *et al.*, (2014)).
A pesquisa de anticorpos contra o vírus da mixomatose, será efetuada em soro obtido a partir de sangue, por ELISA comercial (CIVTEST® cuni Mixomatosis, laboratórios Hipra), adaptada se necessário a esta espécie.
Todos estes ensaios serão realizados nos Laboratórios do INIAV.
Serão responsáveis por estas atividades, Margarida Duarte (INIAV), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Carina Carvalho e Teresa Fagulha (INIAV).

Dia 67; este número é para 1 semana de vida depois do challenge
Os animais serão sacrificados por injeção de Pentobarbital sódico (100 mg/kg por via intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV)), no final do ensaio (dia 67, ie 7 dias após o Challenge), ou mais cedo, se ocorrer alguma evidência de desenvolvimento de doença ou de sofrimento.

Os exames anatomopatológicos dos animais eutanasiados serão efetuados no INIAV pela equipa de patologia no Laboratório de Patologia do INIAV. Será efetuada histopatologia de fígado, baço, pulmão, duodeno, rim, linfonodos mesentéricos, coração, traqueia, timo e pulmão.
Serão responsáveis por esta atividade, Fábio Abade dos Santos (INIAV) e Margarida Duarte (INIAV)

g7) **Métodos estatísticos a serem aplicados;**

Será utilizado a modelo estatístico - Mixed model for repeat measures- MMRM, através do pacote PROC MIXED (multilevel GLMM linear regression model) do SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) com o enquadramento de um estudo de medidas repetidas, análise de variância e covariância. Neste tipo de modelo, são contempladas variáveis fixas e aleatórias. Para mais detalhes consultar o documento em anexo.

h)

Foi selecionada uma vacina contendo uma estirpe atenuada de vírus da mixomatose (MIXOHIPRA-H) e outra contendo uma estirpe atenuada de vírus do Fibroma de Shope (Mixohipra-FSA). Escolheram-se as vacinas que induzem proteções mais duradouras, de acordo com a informação disponibilizada nas bulas. Estas vacinas são utilizadas para o controlo da mixomatose em coelho doméstico. A sua via de administração é parenteral.

As vacinas comerciais selecionadas são vacinas produzidas em Laboratórios de Espanha (Univete e Hipra), **e que constam na Lista de Medicamentes Veterinários Autorizados pela introdução no Mercado (AIM) pela DGAV** (datada de 17 de novembro de 2015).

As características destas vacinas disponíveis estão sumarizadas na tabela seguinte:

Vacina	Laboratório	AIM	Estirpe	Dose vacinal	Idade de vacinação	Imunização em dias pós vacinação	Duração da proteção (meses)
Mixohipra-H	LABORATORIOS HIPRA, S.A.	N 704/02 DGV	Sanarelli VMI30	≥ 10^3 $DICT_{50}$*	2 meses	7d	6
Mixohipra-FSA	LABORATORIOS HIPRA, S.A.	267/89	(vírus atenuado) Fibroma de Shope	≥ 10^3,5 $DICC_{50}$*	1 mês	6d	7
Dervaximyxo SG33	LABORATÓRIO MÉRIAL	505/93 DGV	Myxoma vírus SG33	10^2,7$DICC_{50}$	4s		4
Lyomyxovax	MERIAL PORTUGUESA-SAUDE ANIMAL,LDA.	051/87	SFV	10^2,7DI_{50}	28-35d		6

As vacinas Dercunimix e Nobivac foram excluídas por induzirem também proteção para RHDV.

Ainda de acordo com o solicitado ponto 3 do Artigo 99º, anexam-se a este pedido os seguintes documentos:

- Formulário de licenciamento de Projetos de investigação/experimentação animal (ao abrigo do disposto na Portaria n.º 1005/92 de 23 de outubro), devidamente preenchido;
- 16 Procedimentos Operativos (*Standard Operation Procedures, SOP*) detalhados;
- Formulários para recolha e registo de dados;
- Avaliação dos riscos envolvidos no ensaio, e sua mitigação;

Até 1 mês após o final da conclusão do ensaio, será apresentado um relatório final conclusivo à DGAV.

Aguarda deferimento,
Com os melhores cumprimentos,

(Margarida Duarte, Investigadora Auxiliar do INIAV e representante do Grupo de Trabalho +Coelho)

Oeiras, 4 de dezembro de 2019

SOP_01_+COELHO2: CAPTURA DE LEBRES PARA O ENSAIO

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução da captura de exemplares de lebre-ibérica.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO:

Dada a inexistência de centros de reprodução de lebre-ibérica em Portugal, o que impossibilita a aquisição de exemplares, haverá necessidade de se preceder à sua captura no campo, mediante uso de redes de tresmalho, colocadas verticalmente pelo auxilio de estacas espaçadas de alguns metros, para onde os animais serão direcionados por batida do terreno.
Os locais e dias de captura serão comunicados antecipadamente à Divisão de Recursos Cinegéticos e Aquícolas - ICNF, para emissão de licença de captura e de guias de transporte;

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

1. redes de tresmalho
2. estacas metálicas para sustentação das redes
3. caixas de transporte

PROCEDIMENTO:

1. Avaliação das características orográficas do terreno e densidade prevista de lebre-ibérica;
2. Colocação das redes perpendicularmente ao terreno com a ajuda de estacas metálicas enterradas no solo;
3. Batida do terreno;
4. Captura de exemplares aprisionados nas redes;
5. Colocação dos animais em caixas de transporte

LEGISLAÇÃO:

Autorização do ICNF para a captura de lebres

SOP_02_+COELHO2: QUARENTENA ANIMAL, ESTABILIZAÇÃO E CONSTITUIÇÃO DE GRUPOS ALEATÓRIOS

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução da quarentena.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO: A quarentena dos animais permite avaliar o seu estado hígiossanitário e evitar a introdução inadvertida de doenças que poderiam complicar ou comprometer os protocolos de estudo. A estabilização dos animais permite adequá-los às condições de semi-cativeiro e à alteração alimentar de forma gradual.
A constituição de grupos aleatórios permite a validação científica do resultado experimental.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

1. Parques de Recria
2. Comedouros e alimento
3. Bebedouros e água potável
4. Feno para pavimento
5. Brincos plásticos
6. Alicate para brinco

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1 – identificação dos animais e alocação a grupos.

PROCEDIMENTO:

1. Todos os animais são inspecionados na chegada, e identificados na orelha com brinco plástico;
2. Os animais são recebidos e avaliados numa sala separada, especificamente designada para o efeito, localizada num extremo do corredor do Parque de Recria.
3. Uma vez que este animais não são "livres de agentes patogénicos específicos" (SPF) serão submetidos a um período de quarentena e condicionamento por 30 dias;
4. São realizados exames físicos (SOP_03 - morfológicos e clínicos) e preenchidos registros médicos (Ficha 1). As lebres são também avaliadas quanto a infestações por ectoparasitas ou endoparasitas, sintomas de infeção respiratória ou intestinal e quaisquer outras anomalias.
5. São colhidos materiais biológicos (sangue, fezes e urina se possível) para exames serológicos e virológicos;
6. Os animais clinicamente doentes são separados dos outros enquanto são submetidos a tratamento ou eutanasiados.
7. Os animais são aleatoriamente distribuídos por grupos, com recurso a sorteio do número de brinco, mantendo-se a proporção de 4 fêmeas para 2 machos.

SOP_03_+COELHO2: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E CLÍNICA DAS LEBRES

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para orientação na obtenção das medições morfológicas e avaliação clínica de lebre-ibérica. Constitui uma referência e orientação aos investigadores na execução da avaliação morfológica e clínica.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. O exame físico nos pequenos mamíferos exóticos é realizado da mesma forma que que nos animais de companhia, no entanto estes espécimes podem facilmente ficar sob stress. Nesse sentido, a abordagem nestes animais deve ser feita de forma tranquila e suave. Todos os itens necessários para a realização do exame físico devem ser previamente reunidos de forma a reduzir ao mínimo o tempo de manipulação do animal.
2. Em alguns casos, poderá haver necessidade de sedar ou anestesiar o animal para que o exame físico possa ser realizado.
3. O exame físico deve iniciar-se na região da cabeça (com a exceção do exame da cavidade oral) e deve prosseguir em direção à cauda, de forma a garantir que o animal é observado na totalidade.

3. A avaliação dos animais ajudará a perceber se os espécimes selecionados para o ensaio se encontram saudáveis.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de material

1. toalha/ manta de tamanho grande para contenção dos animais
2. Midazolam (em caso de necessidade de sedação do animal – opcional)
3. seringas de insulina de 1ml (em caso de necessidade de sedação do animal – opcional)
4. agulhas de 23 G (em caso de necessidade de sedação do animal – opcional)
5. termómetro
6. vaselina estéril
7. balança
8. estetoscópio
5. régua

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Realizar um exame visual que permitirá avaliar a aparência e disposição/estado mental do animal
2. Avaliação da condição corporal (classificação em boa, média e fraca)
3. Avaliar a temperatura corporal com recurso a um termómetro
4. Pesar o animal
5. Auscultação para avaliação da função respiratória e cardíaca
6. Medição da frequência respiratória (deve ser obtida logo que o animal sai da caixa)

7. Medição da frequência cardíaca (deve ser obtida logo que o animal sai da caixa)
8. Palpar e auscultar o abdómen
9. Palpar os nódulos linfáticos periféricos
10. Realizar o exame oral para despistar situações de mal oclusão, crescimento dentário excessivo, dentes fraturados ou presença de espículas na superfície lingual ou bucal dos pré-molares e molares
11. Avaliar o estado do pelo e da pele despistando lesões de pele, perda de pelo, e presença de parasitas externos (que devem ser removidos)
12. Palpar os membros e as articulações e examinar as mãos e os pés
13. Examinar os órgãos genitais, a região perineal, o prepúcio e as glândulas mamárias, no caso dos machos e das fêmeas, respetivamente
14. Avaliar o estado de hidratação do animal através da avaliação das membranas mucosas (que devem apresentar-se húmidas e rosadas) e do tempo de repleção capilar (que deve ser entre 1 e 2 segundos) e do tempo de repleção da prega cutânea
15. Determinação dos parâmetros morfométricos: medição do comprimento do pavilhão auricular externo, do comprimento do tarso e do tamanho da cabeça

LEGISLAÇÃO: Projeto de Lei n.º 525/XIII – Define o ato médico-veterinário

REFERÊNCIAS:

https://lafeber.com/vet/physical-examination-of-small-exotic-mammals/

SOP_04_+COELHO 2: COLHEITA DE SANGUE DA VEIA MARGINAL DA ORELHA EM LEBRE

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2. Descreve-se a colheita de sangue através da veia marginal da orelha em lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na colheita de sangue da veia marginal da orelha.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. A colheita de sangue na veia marginal da orelha é um dos métodos mais comuns e menos invasivos de colheita de sangue em coelho, também aplicável à lebre. A artéria auricular também pode ser utilizada para colheita de maiores quantidades de sangue, mas há um risco maior de hematoma ou hematomas.
2. Este procedimento é facilmente realizado sem anestesia geral, desde que utilizado com restrição adequada do animal e anestesia tópica ou sedação.
3. O uso de um cateter de borboleta para colheita reduz a pressão negativa no vaso, facilitando a colheita;
4. Deve ser determinado o volume sanguíneo a colher tendo em conta que por cada Kg de peso do animal se estimam 56 ml de sangue circulante, e que por dia e por semana, não deve ser excedido respetivamente 1% e 7,5% do Volume de sangue circulante.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

<u>Equipamento de Proteção Individual (EPI) e Higiene</u>

Certifique-se de que o EPI apropriado seja usado para proteger o técnico contra exposição acidental ao sangue e outros fluidos corporais, tais como:

1. Luvas
2. Protetor ocular
3. Máscara

As mãos devem ser lavadas e / ou as luvas trocadas entre a manipulação dos animais.

Os materiais cortantes usados serão prontamente descartados no recipiente à prova de vazamentos, resistente a perfurações, fornecido.

<u>Lista de materiais</u>

1. equipamento para contenção e restrição dos animais (caixa ou sacos de tecido)
2. seringas
3. tubos seco para sangue, tubos com EDTA e tubos com Heparina
4. agulhas (calibre 23 a 27G)
5. máquinas de tosquia
6. anestésico tópico
7. vasodilatador tópico (Xilol -opcional)
8. sedação (midazolam) opcional
9. gaze

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

Considerações:

-Serão colhidas amostras semanais seriadas deslocando-se o ponto de punção progressivamente para a base da orelha na mesma veia, ou alternando as orelhas.

-Não é obrigatória sedação/anestesia, mas é necessária uma contenção adequada.

-O creme anestésico tópico (lidocaína) pode ser aplicado na superfície da orelha por aproximadamente 10 minutos antes da punção venosa;

-Acepromazina administrada a 1mg / kg de peso corporal (intramuscular) 20 minutos antes da punção venosa fornece sedação, bem como vasodilatação.

Procedimento:

1. Contenção da lebre com segurança com recurso a apoio mecânico para coelhos, ao método de envolvimento de toalhas ou os sacos disponíveis comercialmente.
2. Tricotomia da área de punção sobre a veia marginal da orelha
3. Antissepsia da área de punção. Aplicação de creme com anestésico local e durante 10 minutos, no mínimo.
4. Vasodilatação da veia marginal da orelha por aplicação local de uma compressa morna, ou alternativamente, de massajem na orelha 30 a 60 segundos.
5. Aplicação de garrote por pressão da veia marginal da orelha próximo ao local de punção.
6. Segurando a aba da orelha na mão não-dominante, inserir a agulha, biselada, na veia. Aspirar lentamente o sangue para evitar o colapso do vaso.
7. Retirar a agulha e aplicar uma pressão firme com gaze durante um minuto para garantir a hemóstase.
8. Descartar a agulha em um recipiente aprovado para objetos perfuro-cortantes.

REFERÊNCIAS:

- American Association of Laboratory Animal Science. *Laboratory Animal Technician Training Manual.* (Memphis, TN: Drumwright and Co, 2007)
- Charles River Insourcing Solutions. *Biomethodology of the Laboratory Rabbit*
- Echols MS, Pollock C. *Blood Collection in Rabbits*. (LafeberVet Web site. April 6, 2013) http://www.lafebervet.com/blood-collection-in-rabbits/ Flecknell, P. *Digital Material for Trainers (ver 2.0)*.(University of Newcastle upon Tyne 2003)

LEGISLAÇÃO: Projeto de Lei n.º 525/XIII – Define o acto médico-veterinário

SOP_05_+COELHO2: COLHEITA DE SANGUE DA VEIA JUGULAR EXTERNA EM LEBRE

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na colheita de sangue da veia jugular externa.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO:

A colheita de sangue da VJE permite colher maiores quantidades de sangue de forma segura se praticado por médicos veterinários experientes.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

1. Agulhas de 27G
2. seringas de 1ml
3. elásticos
4. tubo para colheita de sangue
5. esguicho com álcool a 70%
6. luvas

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Identificar o tubo com a ID do animal;
2. Colocar as luvas;
3. Posicionar o animal para a colheita de sangue (pelo ajudante);
4. Molhar o pelo na região do pescoço
5. Aplicar o garrote no lado da VJE selecionada
6. Perfurar a pele e da VJE, em ângulo quase paralelo à pele.
7. Aspirar o sangue
8. Remover a agulha
9. Aplicar a pressão sobre o local da punção

LEGISLAÇÃO: Projeto de Lei n.º 525/XIII – Define o ato médico-veterinário

REFERÊNCIAS:

-Abade dos Santos et al, 2019. Blood collection from the external jugular vein of Oryctolagus cuniculus algirus sedated with midazolam: live sampling of a subspecies at risk.

SOP_06_+COELHO2: COLHEITA DE FEZES E URINA

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na colheita de fezes e urina.

Versão: 1
Date: 28/08/19

FUNDAMENTAÇÃO:

O vírus da mixomatose tem sido detetado na urina de coelhos-bravos (O. cuniculus) afetados (Duarte et al., 2018), pelo método desenvolvido por Duarte et al., 2014. É importante avaliar a excreção de vírus vacinal e durante o *challenge* nesta matriz.

1. Garantir que os animais selecionados para o ensaio não excretam RHDV2 e/ou vírus da mixomatose nas fezes e urina.
2. Após a vacinação, avaliar se há excreção de vírus vacinal.
3. Após o *Challenge*, determinar se há excreção de vírus de campo.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de material:

1.Toalha/ manta de tamanho grande para contenção dos animais
2. Luvas
3. Tubos de 8 ml
4. Etiquetas
5. Caneta
6. Seringas de 2ml
7. Agulhas de 23G
8. Zaragatoas de algodão

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Identificar os tubos com a ID do animal;
2. Pressionar a bexiga (região abdominal baixa) enquanto um segundo operador recolhe a urina eventualmente eliminada para tubo. Em alternativa colher por cistocentese;
3. Se durante este processo houver emissão de fezes, recolhê-las para outro tubo;
4. Caso não haja libertação de fezes, introduzir a zaragatoa no ânus do animal e rodá-la para a sujar; retirar e zaragatoa e conservá-la em tubo de plástico.

LEGISLAÇÃO:

REFERÊNCIAS:

Duarte M, Carvalho CL, Santos F A, Gomes J, Alves PC, Esteves PJ, Abrantes J, Lopes AM, Monterroso P, Serronha A, Santos N, Santos PT, Vaz Y, Carvalho J, Pinto FC, Amaro J, Cunha MV. “+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral”. Relatório de atividades na época venatória

2017-2018. 2018. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF

Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, Fagulha MT, Ramos F, Luís T, Fevereiro M. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. J. Virol. Methods. 2014. 196, 219–224. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.014.

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RHD.pdf

SOP_07_+COELHO2: PESQUISA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA MIXOMATOSE

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução da pesquisa de anticorpos contra o vírus da mixomatose.

Versão: 1
Date: 28/08//19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. A avaliação serológica é necessária para se determinar se um individuo é seropositivo para a presença um anticorpo específico e quantificar os títulos ou concentrações desse anticorpo. Ao nível da população, a avaliação serológica permite determinar que percentagem de uma certa população se encontra protegida para um determinado agente patogénico, o que determinará a ocorrência e intensidades de surtos (Metcalf et al., 2016).
2. No âmbito deste estudo, numa primeira fase, a avaliação serológica permitirá determinar se os espécimes de lebre-ibérica capturados para o ensaio de vacinação apresentam anticorpos para o vírus da mixomatose. Na ausência de vacinação prévia, a seropositividade pode estar relacionada com a presença de anticorpos maternais (Marchandeau et al., 2014) ou com infeção. A presença desses anticorpos inviabilizará a utilização dos animais no ensaio de vacinação, e determinará a sua substituição por animais seronegativos.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:

1. Estufa
2. Espectrofotómetro (Tecan sunrise) para leitura de densidades óticas
3. Equipamento de lavagem das placas (MRW®)

Lista de Material:

1. Kit CIVTEST® cuni MIXOMATOSIS (laboratórios HIPRA), para pesquisa e quantificação de anticorpos específicos para o vírus da mixomatose por ELISA indirecto
2. Pipetas para vários volumes
3. Pontas descartáveis com filtro (10µ, 200µ e 1000µ tipo ART® Thermo scientific ou Sarstedt®)
4. Placas de ELISA de 96 poços Maxisorp Loose Nunc-Immuno Module (Thermo Scientific)

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Preparação dos reagentes:

- Equilibrar os reagentes à temperatura ambiente antes de começar o ensaio
- Preparação da solução de lavagem que será diluída 10x em água destilada ou desionizada
- Os controlos positivos e negativos encontram-se prontos para utilização e não requerem diluição; devem sempre aplicar-se em duplicado na placa

2. Preparação das amostras

- Diluição das amostras a 1/40 em solução diluente de amostras (fornecida)

3. Desenvolvimento do ensaio
- Aplicar 100µl dos controlos e das amostras nos respetivos poços das placas
- Cobrir a placa com filme adesivo e incubar 20 min a +37ºC
- Remover o filme adesivo e efetuar 3 lavagens de cada poço com 300µl de solução de lavagem diluída e no final inverter a placa e abaná-la fortemente sobre papel absorvente
- Aplicar a cada poço 100µl de solução de conjugado
- Cobrir a placa com filme adesivo e incubar 20 min a +37ºC
- Remover o filme adesivo e efetuar 3 lavagens de cada poço com 300µl de solução de lavagem diluída e no final inverter a placa e abaná-la fortemente sobre papel absorvente
- Aplicar a cada poço 100µl de solução de substrato e agitar suavemente a placa durante 2 segundos.
- Selar a placa com uma cobertura adesiva e incubar à temperatura ambiente (+20 a +25ºC), no escuro durante 10 minutos
- Remover a cobertura adesiva e aplicar a cada poço 100µl de solução stop. Agitar abanando ligeiramente a lateral da placa
- Limpar a superfície inferior da placa com um papel absorvente
- Ler a placa utilizando um equipamento leitor de ELISA equipado com um filtro de 450 nm. Realizar previamente um branco com ar.
-Registar os resultados

REFERÊNCIAS:

Marchandeau S1, Pontier D, Guitton JS, Letty J, Fouchet D, Aubineau J, Berger F, Léonard Y, Roobrouck A, Gelfi J, Peralta B, Bertagnoli S. Early infections by myxoma virus of young rabbits (Oryctolagus cuniculus) protected by maternal antibodies activate their immune system and enhance herd immunity in wild populations. Vet Res. 2014 Mar 4;45:26. doi: 10.1186/1297-9716-45-26.

Metcalf CJ, Farrar J, Cutts FT, Basta NE, Graham AL, Lessler J, Ferguson NM, Burke DS, Grenfell BT. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016 Aug 13;388(10045):728-30. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30164-7. Epub 2016 Apr 5.

SOP_08_+COELHO2: PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-RHDV/RHDV2

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:
SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo de pesquisa de anticorpos contra o RHDV2.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. A avaliação serológica permite avaliar se um determinado individuo é positivo para a presença um anticorpo específico e quantificar os títulos ou concentrações desse anticorpo (Metcalf et al., 2016).
2. No âmbito deste estudo, a avaliação serológica permitirá avaliar se os espécimes de lebre-ibérica capturados para o ensaio de vacinação tiveram contato com o vírus da doença hemorrágica de tipo 2, RHDV2, e apresentam anticorpos para este vírus.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:

1. Estufa
2. Espectrofotómetro (Tecan sunrise) para leitura de densidades óticas
3. Equipamento de lavagem das placas (MRW®)

Lista de Material:

1. Pipetas
2. Pontas descartáveis com filtro (10µl, 200µl e 1000µl tipo ART® Thermo scientific ou Sarstedt®)
3. Placas de ELISA de 96 poços Maxisorp Loose Nunc-Immuno Module (Thermo Scientific)
4. Reagentes específicos da técnica de ELISA

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO: Próprio de uma técnica de ELISA indireta

1. Revestimento da placas de ELISA com partículas virais desprovidas de material genético (vírus like particles, VLPs) do vírus da doença hemorrágica viral , durante a noite a 4ºC.
2. Incubação do soro sanguíneo de lebre, 1h a 37ºC.
3. Lavagem da placa para remoção dos anticorpos livres
4. Incubação com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com HRP (horseradish peroxidase),
5. Lavagem da placa para remoção do conjugado livres
6. Adição de substrato (TMB)
7. Paragem da reação com solução ácida
8. Leitura da densidade otica (450 nm)
9. Interpretação dos resultados: Para uma amostra ser considerada positiva, o valor de densidade ótica obtido deve ser igual ou superior a 0.2 unidades acima do controlo negativo [Barcena et al, 2015].

REFERENCIAS:

Bárcena J, Guerra B, Angulo I, González J, Valcárcel F, et al.: Vet. Res. 2015, 46:106.

Metcalf CJ, Farrar J, Cutts FT, Basta NE, Graham AL, Lessler J, Ferguson NM, Burke DS, Grenfell BT. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016 Aug 13;388(10045):728-30. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30164-7. Epub 2016 Apr 5.

SOP_09_+COELHO2: PESQUISA DE VÍRUS DA MIXOMATOSE POR qPCR

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. O vírus da mixomatose tem sido detetado desde meados de 2018, em lebre-ibérica em Espanha (García-Bocanegra et al., 2019) e em Portugal (Projeto + Coelho2, em curso);
2. Antes de se dar inicio ao ensaio de vacinação, as lebres deverão ser testadas para garantir que não têm imunidade para o vírus da mixomatose.. No seguimento da contraprova (*challenge*), e de forma a avaliar a eficácia da vacinação, os animais sacrificados, pertencentes aos cinco grupos (3 grupos vacinados e 1 grupos controlo), serão submetidos a necrópsia e a colheita de material biológico para pesquisa do vírus da mixomatose por qPCR e para exame anatomopatológico.
3. A metodologia de PCR em tempo real é um método muito sensível e específico para deteção de DNA viral;
4. O método de PCR em tempo real direcionado para a deteção específica do vírus da mixomatose utilizado no Laboratório de Referência para a Saúde Animal do INIAV. I.P., foi desenvolvido e validado no INIAV e consta no manual da OIE como método recomendado (Duarte et al., 2014);
5. O sistema usa uma sonda de hidrólise TaqMan e primers específicos para amplificação de um fragmento com 125 pb, localizado no gene M000.5L/R (Duarte et al., 2014)
6. O método tem-se revelado eficaz na deteção do vírus da mixomatose, tanto em coelho e como em lebre-ibérica, em várias matrizes biológicas (e.g. fígado, baço, sangue e urina) em contexto da rotina e de investigação (Duarte et al., 2018; Projeto +Coelho2).

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:

1. Pipetador automático
2. Equipamento homogeneizador de amostras tipo Ribolyser Fastprep FP120 (Bio 101 Savant)
3. Extrator automático de ácidos nucleicos Biosprint 96 Qiagen
4. Equipamento de PCR em tempo real Biorad CFX96™ Real-Time System

Lista de Material

1. Luvas descartáveis
2. Lâminas de Bisturi (Romed®)
3. Caixas de Petri descartáveis para processamento de tecidos
4. Pinças descartáveis
5. Tubos BeadBug™ (Sigma) de 2ml com esferas de vidro lavadas em ácido, esferas de zicórnio triplamente puras ou esferas de ácido inoxidável, adequadas para biologia molecular
6. Kit de extração de ácidos nucleicos tipo MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen®) para Biosprint 96 Qiagen®

7. Kit de RT-PCR tipo QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen®) ou
8. Primers (00.5R/L-Forward e 000.5R/L-Reverse) e sonda (MYXV-probe, Forward) específicos
9. Pipetas graduadas descartáveis (Sarstedt)
10. Pipetas
11. Pontas com filtro descartáveis (10µl, 200µl e 1000µl tipo ART® Thermo scientific ou Sarstedt®)
12. Placa de PCR de 96 poços "non-skirted" (sem saia), com bordos marcados (VWR®)
13. Filme selante adesivos MicroSeal® "B" Seal, Biorad®, específicos para cobertura das placas de PCR de 96 poços

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Preparação dos homogenados

- As amostras de fígado, baço, pulmão e pele (mixomas) são homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS) com recurso ao equipamento tipo Ribolyser Fastprep FP120 (Bio 101 Savant), e clarificadas a 3000g durante 5 min.

2. Extração dos ácidos nucleicos

- A extração dos ácidos nucleicos DNA e RNA será efetuada com recurso Extrator automático de ácidos nucleicos Biosprint 96 (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante, e a eluição será feita em 100µl de água RNase-free.

3. Avaliação da presença de DNA do vírus da mixomatose

- Utilizar o método de qPCR desenvolvido por Duarte et al., (2014), num equipamento CFX96^{TM} Real-Time System (Biorad®)
- Realizar as reações amplificação em placas de PCR de 96 poços, num volume final de 25µl, de acordo com as especificações do kit de PCR selecionado, usando concentrações finais de cada primer e da sonda de 1µM e 0,2 µM, respetivamente, e 10µl do eluado (?).
- As condições de amplificação serão definidas em função do kit de PCR selecionado

REFERENCIAS:

- García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, Dalton KP, Caballero-Gómez J, Agüero M, Zorrilla I, Gómez-Guillamón F. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (Lepus granatensis). Transbound Emerg Dis. 2019 Jul 10. doi: 10.1111/tbed.13289. [Epub ahead of print]
- Duarte M, Carvalho CL, Santos F A, Gomes J, Alves PC, Esteves PJ, Abrantes J, Lopes AM, Monterroso P, Serronha A, Santos N, Santos PT, Vaz Y, Carvalho J, Pinto FC, Amaro J, Cunha MV. "+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral". Relatório de atividades na época venatória 2017-2018. 2018. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF
- Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, Fagulha MT, Ramos F, Luís T, Fevereiro M. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. J. Virol. Methods. 2014. 196, 219–224. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.014.

SOP_10_+COELHO2: PESQUISA DE VÍRUS RHDV2 POR RT-qPCR

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na deteção de RNA de RHDV2 por RT-qPCR.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. O vírus da doença hemorrágica de tipo 2, RHDV2, tem sido detetado em várias espécies de lebre, desde a sua emergência em 2010, nomeadamente na lebre do cabo da Sardenha (Lepus capensis) (Camarda et al., 2014), na lebre italiana (L. corsicanus) (Puggioni et al., 2013), na lebre-europeia (L. europaeus) (Hall et al., 2017) (Le Gal-Reculé et al., 2017) e na lebre-variável (L. timidus) (Neimanis et al., 2018).
2. As lebres serão testadas antes do ensaio para confirmação de que não se encontram em virémia ou a excretar vírus pelas fezes e urina.
3. A metodologia de RT-PCR em tempo real é um método muito sensível e específico para deteção de RNA
4. O método de RT-qPCR direcionado para a deteção específica do vírus do vírus da doença hemorrágica de tipo 2 (RHDV2) utlizado no Laboratório de Referência para a Saúde Animal do INIAV. I.P., foi desenvolvido e validado neste laboratório e consta no manual da OIE como método recomendado (Duarte et al., 2015).
5. O sistema usa uma sonda TaqMan e primers específicos para deteção de um fragmento com 120 pares de bases do gene vp60, que codifica para a proteína da cápside viral (Duarte et al., 2015)
6. O método é eficaz na deteção de RHDV2 em coelho Europeu em várias matrizes (e.g. fígado, baço, sangue e urina) em contexto da rotina e de investigação (Duarte et al., 2018).

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:

1. Pipetador automático
2. Extrator automático de ácidos nucleicos Biosprint 96 Qiagen®
3. Equipamento de PCR em tempo real Biorad® CFX96™ Real-Time System

Lista de Material

1. Luvas descartáveis
2. Lâminas de Bisturi (Romed®)
3. Caixas de Petri descartáveis para processamento de tecidos
4. Pinças descartáveis
5. Tubos BeadBug™ (Sigma) de 2ml com esferas de vidro lavadas em ácido, esferas de zicórnio triplamente puras ou esferas de ácido inoxidável, adequadas para biologia molecular
6. Kit de extração de ácidos nucleicos tipo MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen®) para Biosprint 96 Qiagen®
7. Kit de RT-PCR tipo QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen®) ou
8. Primers (RHDV2-Forward e RHDV2-Reverse) e sonda (RHDV2-probe, Forward) específicos

9. Pipetas graduadas descartáveis (Sarstedt)
10. Pipetas
11. Pontas com filtro descartáveis (10µ, 200µ e 1000µ tipo ART® Thermo scientific ou Sarstedt®)
12. Placa de PCR de 96 poços "non-skirted" (sem saia), com bordos marcados (VWR®)
13. Filmes selantes adesivos MicroSeal® "B" Seal, Biorad®, específicos para cobertura das placas de PCR de 96 poços

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Preparação dos homogenados

- As amostras de fígado, baço e pulmão são homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS), com recurso ao equipamento tipo Ribolyser Fastprep FP120 (Bio 101 Savant), e clarificadas a 3000g durante 5 min.

2. Extração dos ácidos nucleicos

- A extração dos ácidos nucleicos RNA e DNA será efetuada com recurso Extrator automático de ácidos nucleicos Biosprint 96 (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante, e eluição em 100µl de água RNase-free.

3. Avaliação da presença de RNA de RHDV2

- Utilizar o método de RT-qPCR desenvolvido por Duarte et al., 2015, num equipamento CFX96^{TM} Real-Time System (Biorad®);
- Realizar as reações amplificação em placas de PCR de 96 poços, num volume final de 25µl, de acordo com as especificações do kit de RT-PCR selecionado, usando concentrações finais de cada primer e da sonda de 1µM e 0,2 µM, respetivamente, e 10µl do eluado;
- As condições de amplificação serão função do kit de RT-PCR selecionado.

REFERÊNCIAS:

- Camarda, A., Pugliese, N., Cavadini, P., Circella, E., Capucci, L., Caroli, A., Legretto, M., Mallia, E., Lavazza, A., 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (Oryctolagus cuniculus) and Italian hare (Lepus corsicanus). Res. Vet. Sci. 97, 642–5.doi:10.1016/j.rvsc.2014.10.008.
- Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luís T, Duarte EL, Fevereiro M. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). J. Virol. Methods. 2015. 219, 90–95. doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.017.
- Duarte M, Carvalho CL, Santos F A, Gomes J, Alves PC, Esteves PJ, Abrantes J, Lopes AM, Monterroso P, Serronha A, Santos N, Santos PT, Vaz Y, Carvalho J, Pinto FC, Amaro J, Cunha MV. "+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral". Relatório de atividades na época venatória 2017-2018. 2018. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF
- Hall RN, Peacock DE, Kovaliski J, Mahar JE, Mourant R, Piper M, Strive T. Detection of RHDV2 in European brown hares (Lepus europaeus) in Australia. Vet Rec. 2017 Feb 4;180(5):121. doi: 10.1136/vr.104034. Epub 2016 Oct 19.
- Le Gall-Reculé G, Lemaitre E, Bertagnoli S, Hubert C, Top S, Decors A, Marchandeau S, Guitton JS. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares

(*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Res. 2017 Oct 28;48(1):70. doi: 10.1186/s13567-017-0473-y.

- Neimanis AS, Ahola H, Larsson Pettersson U, Lopes AM, Abrantes J, Zohari S, Esteves PJ, Gavier-Widén D. Overcoming species barriers: an outbreak of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (Lepus timidus). BMC Vet Res. 2018 Nov 26;14(1):367. doi: 10.1186/s12917-018-1694-7.
- Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrale, C., Scivoli, R., Botti, G., Ligios, C., Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A.,Capucci, L., 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). Vet. Res. 44, 96. doi:10.1186/1297-9716-44-96

SOP_11_+COELHO2: MANUTENÇÃO, DESINFEÇÃO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE A VACINAÇÃO (PARQUE DE RECRIA)

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:
SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

Durante este período os animais serão mantidos em parques em grupos de 5-7 animais. A cada grupo de cada parque será alocado um único tratamento, ficando um parque vazio de intervalo entre grupos.

Os parques têm um segmento interior em chapa zincada de lavagem e desinfeção fácil e pavimento em cimento liso. No parque exterior a divisão é feita com rede anti predadores incluindo na superfície superior. Os animais serão mantidos sob vigilância de câmaras com detetor de movimento de forma a monitorizar a presença de predadores e de outras espécies, nomeadamente roedores e insetos.

Existe um corredor paralelo à entrada dos parques também com pavimento de cimento bem como uma zona à entrada para troca de vestuário e calçado. Os animais serão monitorizados diariamente e a limpeza das fezes e urina será realizada a cada 3-4 dias com uma limpeza geral a cada 30 dias. A cada 30 dias será removido o material de cama (palha) que será eliminado de forma adequada. Em seguida proceder-se-á à remoção de matéria orgânica com recurso a vassoura húmida e desinfeção do pavimento com Hipoclorito de sódio.

A cada 14 dias os comedouros e bebedouros serão limpos, sendo as sobras eliminadas, e desinfetados com hipoclorito de sódio.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:
Vassoura e Pá
Palha de trigo
Coberturas para sapatos descartáveis

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

SOP_12_+COELHO2: VACINAÇÃO DOS GRUPOS 2, 3 e 4

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

O objetivo deste SOP é o de averiguar se as vacinas comerciais disponíveis para imunização dos coelhos contra a mixomatose são eficazes em lebre-ibérica. Serão investigadas 2 vacinas comerciais, nomeadamente:

1. A vacina **Mixohipra-FSA** (laboratórios Hipra) é usada na prevenção da mixomatose dos coelhos, a partir dos 30 dias de vida. É uma vacina heteróloga que contém o vírus vivo atenuado do Fibroma de Shope (SFV). O vírus do Fibroma de Shope estimula a imunidade ativa cruzada contra a mixomatose. A imunidade inicia-se 6 dias após a vacinação e mantém-se durante 7 meses (http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/463).
2. A vacina **MIXOHIPRA-H** (LABORATORIOS HIPRA, S.A) é utilizada para a imunização ativa coelhos láparos e adultos na prevenção da mixomatose, tanto na sua forma clássica como na forma amoximatósica. É uma vacina homóloga que contém o vírus vivo atenuado da mixomatose, estirpe Sanarelli VMI30. O estabelecimento da imunidade ocorre 7 dias depois da administração da vacina e tem a duração de 6 meses (http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/2951)

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:
- Jaula de transporte de animais
- Manta para contenção dos animais
- Bancada de procedimentos

Lista de Material:
- Luvas
-Seringas estéreis de 2ml
- Agulhas estéreis de 23G
- Álcool a 70%
- Vacina MIXOHIPRA-H (LABORATORIOS HIPRA, S.A), liofilizado e dissolvente para suspensão injetável
- Vacina Mixohipra-H (Laboratório Hipra), suspensão injetável após reconstituição da pastilha liofilizada no componente líquido
- Vacina Mixohipra-FSA (laboratórios Hipra), suspensão após reconstituição do liofilizado

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. **Administração da vacina MIXOHIPRA-H (Laboratórios Hipra)**
   - Vacinar apenas animais sãos;
   - Usar material estéril para a sua administração;
   - A primo-vacinação pode ser feita a partir das 8 semanas de idade;

   1.1. Administração por via subcutânea
   - Juntar parte do diluente ao frasco que contem o liofilizado e agitar suavemente até à reconstituição do mesmo; de seguida, recolher com a seringa todo o produto reconstituído e trespassá-lo para o frasco que contem o resto do diluente
   - Administrar a dose de 0,5 ml na região do pescoço ou da espádua

   1.2. Administração por via intra-dérmica
   - Dissolver o liofilizado numa quinta parte (1/5) do diluente. Juntar ao frasco que contem o liofilizado, com seringa e agulha estéreis, a parte do diluente correspondente (1 ml para o formato de 10 doses e 2,5 ml para o formato de 25 doses). Homogeneizar mediante agitação adequada, até obter uma suspensão homogénea. Ao ser uma vacina embalada em frascos multidoses é conveniente utilizar toda a vacina uma vez utilizado o frasco.
   - Administrar a dose de 0,1 ml na parte média do pavilhão auricular mediante o sistema Dermojet®
   - Administrar a vacina quando está a uma temperatura entre +15º C a +25º C

2. **Administração da vacina Mixohipra-H (laboratórios Hipra)**
   - Vacinar apenas animais sãos
   - Usar material estéril para a sua administração
   - Esta vacina não deve ser utilizada como primo-vacinação nem em coelhos imunodeprimidos
   - A eficácia desta vacina é menos nos meses de calor, uma vez que a suscetibilidade do coelho diminui

   2.1. Administração por via subcutânea
   - Reconstituir o liofilizado com o diluente.
   - Administrar uma dose de 0,5 ml ($\geq 10^3$ DICT $_{50}$) no dorso ou no pescoço

   2.2. Administração por via intra-dérmica
   - Dissolver o liofilizado numa quinta parte (1/5) do diluente. Homogeneizar mediante agitação adequada, até obter uma suspensão homogénea.
   - Administrar a dose de 0,1 ml ($\geq 10^3$ DICT $_{50}$) na parte média do pavilhão auricular mediante o sistema Dermojet®

3. **Administração da vacina autóloga**
   - Vacinar apenas animais sãos
   - Usar material estéril para a sua administração
   - Na industria do coelho, no caso de existir mixomatose na exploração, e a vacinação for feita por via subcutânea, deverá ser utilizada uma agulha diferente para cada coelho.

   3.1. Administração por via subcutânea
   - Administrar uma dose de 0,5 ml ($>10^{3.5}$ DICC50) por lebre, no dorso ou pescoço.

3.2. Administração por via intra-dérmica

- Administrar uma dose de 0,1 ml (>$10^{3.5}$ DICC50) por lebre mediante o sistema Dermojet na parte média do pavilhão auricular.

REFERÊNCIAS:

Links:

1. (http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/2951)
2. http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/2327.
3. http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/463.

SOP_13_+COELHO2: MANUTENÇÃO, DESINFEÇÃO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE O CHALLENGE

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho 2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

Os animais serão mantidos em jaulas individuais sendo negado o contacto direto entre animais através de distância entre gaiolas e através de placa de acrílico entre cada jaula. Cada jaula terá na sua superfície inferior, um mecanismo de colheita de fezes e urina (em separado) e do alimento não aproveitado pelos animais. Desta forma minimizar-se-á ao máximo a disseminação de vírus que poderá ocorrer pelas fezes e urina e também o contacto entre mucosas dos animais que poderia representar uma fonte de disseminação de vírus.
As fezes e urina serão encaminhados de forma automática para contentores estanques alocados a cada animal, colocados por baixo de cada gaiola. Estes mesmos contentores serão recolhidos a cada 3-4 dias consoante se avalie necessário ao longo do ensaio. A superfície inferior das jaulas e todas as superfícies contaminadas pelos animais serão pulverizadas com Virkon S em períodos não superiores a 1 semana após remoção da matéria orgânica.

A alimentação e abeberamento dos animais será feita com recurso a equipamentos que deverão ter autonomia para uma semana. Nunca será realizada troca entre equipamentos de jaulas diferentes. Sempre que necessário algum procedimento de limpeza nas jaulas será realizado com recurso a material descartável entre cada jaula.

A limpeza do pavimento será realizada com recurso a hipoclorito de sódio, desinfetante bastante eficaz na presença e ausência de matéria orgânica e capaz de inativar o vírus em questão.
- Sem sangue ou outros fluídos respingado ou derramado - usar 1g/litro de cloro livre que corresponde a 1.000ppm;
- Com sangue ou outros fluídos derramado ou respingado ou presença de grande quantidade de matéria orgânica - usar 5g/litro de cloro livre que corresponde a 5.000ppm;
-A maioria das soluções de hipoclorito de sódio no comércio contêm 50g/1L de cloro livre (50.000ppm); portanto é necessário uma diluição 1:50 ou 1:10 quando se pretende obter a concentração de 1.000ppm ou 5.000ppm respetivamente;
-Produtos comercializados em supermercados também estão a uma concentração de 50g/L, necessitando da mesma forma de uma diluição.

No fim do ensaio toda a água e alimento restantes dos comedouros e bebedouros bem como as sobras originais dos mesmos serão eliminados nos contentores reservados a risco biológico, desde que tenham entrado na Unidade 2.
No fim do ensaio as jaulas e todos os equipamentos da Unidade 2 serão limpos com detergente de forma a remover a matéria orgânica (que será encaminhada como material biológico) e em seguida

pulverizados com hipoclorito de sódio e mantidos pelo menos 2 semanas dentro da Unidade Fechada.

PROCEDIMENTOS GERAIS PARA MINIMIZAÇÃO DE AEROSSOIS DURANTE MANIPULAÇÃO DE VÍRUS VIVO

Os aerossóis dizem respeito gotículas líquidas ou partículas sólidas dispersas no ar. Muitos aerossóis são pequenos demais para serem vistos a olho nu e permanecem suspensos por um longo período. A produção de aerossóis durante a manipulação de agentes infecciosos é responsável pela maior fonte de infecções adquiridas em laboratório.

A geração destes aerossóis pode ser causada pelo uso de centrífugas, vortex, seringas e agulhas, tubos de cultura, entre outros equipamentos. Assim, serão tomadas uma de duas medidas: colocação de câmara de fluxo laminar com filtro HEPA para manipulação e inoculação do vírus nos animais ou preparação das unidades a inocular no INIAV e deslocação das mesmas em seringas transportadas em contentor estanque a 4ºC. A inoculação dos animais será realizada na unidade 2 de forma a minimizar o stress de visualização por parte dos outros animais alojados. Todas as superfícies serão em seguinda desinfetadas com Virkon S.

OUTRAS RECOMENDAÇÕES GERAIS

Utilização de avental/bata de mangas longas dentro da Unidade 2. Não é permitido manter pertences pessoais, alimentos.
Não é permitido o o uso de vassouras neste ambiente pelo risco de aerossois, é necessário o uso de vassourão húmido para a remoção da sujidade, em seguida à limpeza com produtos químicos.
Uso de luvas grossas de borracha/nitrilo são obrigatórias.
Será certificado que nenhum lixo biológico é desprezado na rede de esgoto comum e sim em contentores apropriados com tampa e controlo com pedal.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Pulverizador com etanol a 70%
Pulverizador com Virkon S
Hipoclorito de sódio
Esfregona e Balde (a inutilizar no fim do ensaio)

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

REFERENCIAS:

https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/rabbit-haemorrhagic-disease

SOP_14_+COELHO2: AVALIAÇÃO DA CONTRAPROVA (*CHALLENGE*) COM VÍRUS DE CAMPO

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para Lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução do protocolo de inoculação dos animais para avaliação da proteção imunológica.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. A vacinação é crucial no controlo de muitas doenças que afetam o Homem e os animais. As vacinas induzem uma resposta imunitária humoral, mensurável através do título de anticorpos e celular, cuja avaliação é mais complexa. Caso esta resposta esteja correlacionada com a proteção contra uma determinada infeção, através da produção de anticorpos neutralizantes, pode ser usada para avaliar a eficácia da vacinação. Correlações de proteção são muito usadas para avaliar vacinas humanas e veterinárias (Knight-Jones et al., 2014).

2. Estudos de contraprova com estirpes de campo do agente patogénico alvo, em condições controladas, e estudos de seroconversão são muito usados no que toca à avaliação da eficácia das vacinas (Knight-Jones et al., 2014). No que toca ao desenvolvimento de novas vacinas e ensaio da sua eficácia, a Agência Europeia para a Avaliação de produtos Médicos (European Agency for the Evaluation of Medical Products – EMEA) preconiza que, sempre que possível, os ensaios de campo devem incluir a contraprova (challenge) dos animais vacinados e controlo por exposição a infeção natural. Os animais vacinados e controlo devem ser expostos ao mesmo nível de infeção e no mesmo momento. A observação de sinais clínicos, por si só, não fornece evidência suficiente da exposição dos animais ao agente, mas deve ser suportada por testes laboratoriais. No caso das vacinas vivas, sempre que possível, as estipes de campo devem ser diferenciadas das estirpes vacinais (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-field-trials-veterinary-vaccines_en.pdf)

3. Os anticorpos neutralizantes (AcN) são defesas específicas importantes contra agentes virais. Não só se ligam ao vírus, como se ligam de forma a bloquear a infeção. Os AcNs podem bloquear as interações com um recetor ou podem ligar-se à cápside viral de forma a inibir o “uncoating” do genoma viral. Apenas um pequeno conjunto dos muito anticorpos que se ligam a um vírus, são capazes de neutralização. A produção de AcN eficazes por parte do hospedeiro pode ser demorada mas estes persistem no futuro (https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/neutralizing-antibody) O formato do imunoensaio de AcN deve ser avaliado. Os ensaios baseados em células são difíceis de estabelecer, mas permitem uma leitura funcional e de atividade biológica. Os ensaios não baseados em células que usam ligação competitiva a ligando são mais fáceis de estabelecer, apresentam maior precisão e melhor sensibilidade e permitem o uso de diferentes sistemas, como o de ELISA (Gouty et al., 2017)

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de Material:

- Seringas estéreis de 2ml

- Agulhas estéreis de 23 G

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. A contraprova com o vírus de campo deve ser feita nos 3 grupos do estudo (2 grupos teste e 1 grupos controlo).
2. Os animais vacinados e controlo devem ser expostos ao mesmo nível de infeção e no mesmo momento.
3. A dose virulenta apropriada para a contraprova será determinada por qPCR e administrada por via subcutânea.
4. Avaliação diária do desenvolvimento de sinais clínicos de doença. Pesagem.
5. Eutanásia dos animais doentes com recurso a uma dose de 100mg/kg de pentobarbital de sódio após sedação profunda com tiletamina e zolazepam.

REFERÊNCIAS:

- Knight-Jones T. J. D. , Edmond K., Gubbins S., Paton D. J. Veterinary and human vaccine evaluation methods. Proc Biol Sci. 2014 Jun 7; 281(1784): 20132839.doi: 10.1098/rspb.2013.2839
- Links:
  https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-field-trials-veterinary-vaccines_en.pdf
  https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/neutralizing-antibody

SOP_15_+COELHO2: ELIMINAÇÃO DE LIXOS E RESIDUOS

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:
SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO: Todos os lixos resultantes do ensaio serão eliminados de acordo com as regras de tratamento de material biológico e de resíduos hospitalares. A recolha será feita para contentores de classe III (verdes) com saco branco. A recolha de materiais perfurantes será realizada para contentor adequado ao efeito. O tratamento destes resíduos será realizado pela AMBIMED.

LEGISLAÇÃO: Despacho nº 242/96, publicado a 13 de agosto

SOP_16_+COELHO2: EUTANÁSIA DOS ANIMAIS DOENTES

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para LEBRE-IBÉRICA para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO:

1. A eutanásia refere-se ao ato de pôr termo à vida de um animal individual de uma forma que minimize ou elimine a dor e o stress (https://medicine.biu.ac.il/sites/medicine/files/shared/hrdmt_khsd_tqtsyr_qvrs.pdf.).

2. No que se refere a este ensaio, os animais serão eutanasiados no final do estudo ou logo que comecem a manifestar sinais de dor ou ansiedade/ angústia, com o propósito de serem submetidos a exame anatomo-histopatológico e de ser feita a colheita de amostras.

3. Os sinais clínicos que podem indicar desconforto dos animais incluem sinais *respiratórios* (dispneia e cianose), *cardiovasculares* (anemia), *gastrointestinais* (e.g. vómito, diarreia, peritonite), *urogenitais* (aumento das bioquímicas renais ureia indicadores de insuficiência renal), *neurológicos* (depressão, convulsões, parálise de uma ou mais extremidades, dôr não responsiva a analgesia), muscolu-esqueléticos (dano muscular, défices de locomoção), dermatológicos (e.g. feridas que não saram).

4. No que toca aos métodos aceitáveis de eutanásia, estão aprovados métodos específicos e apropriados de eutanásia para cada espécie. A eutanásia das lebres-ibéricas utilizadas neste estudo seguirá as normas e recomendações da AVMA (Guidelines for the Euthanasia of Animals), que estabelecem critérios, os métodos e os fármacos mais apropriados para a eutanásia dos animais. Estas recomendações também reconhecem a importância de aplicar práticas pré-eutanásia (e.g. sedação profunda) e de manipulação animal apropriadas, prestando ainda atenção ao tratamento dos cadáveres dos animais.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:

Lista de equipamento:

1. Bancada de procedimentos

Lista de Material:

1. Manta/ toalha de tamanho grande para contenção dos animais (?)
2. Luvas
3. Seringas estéreis de 2ml
4. Agulhas estéreis de 23G
5. Cateter de teflon tipo borboleta de x G
6. Midazolam
7. Ketamina
8. Solução injetável comercial de pentobarbital de sódio (e.g. Euthasol vet. 400 mg/ml solução injetável.

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha 1

PROCEDIMENTO:

1. Colocar um cateter intravenoso (na veia marginal da orelha?) para garantir a administração IV da solução de pentobarbital de sódio, evitando a sua administração perivascular (http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/3676)
2. Administrar ketamina (15mg/kg) + midazolam (1mg/kg) via intra-muscular com para a sedação profunda do animal de forma a reduzir/evitar o desconforto na eutanásia.

- Administrar solução injetável comercial de pentobarbital sódico, e.g. Euthasol vet. 400 mg/ml, numa dose ≥ 100mg/kg por via intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP). A via de administração intraperitoneal do fármaco pode provocar um início prolongado da ação, com um risco aumentado de excitação durante a indução, apenas podendo ser utilizada após uma sedação adequada

REFERÊNCIAS:

Links:

https://medicine.biu.ac.il/sites/medicine/files/shared/hrdmt_khsd_tqtsyr_qvrs.pdf
http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/3676

SOP_17_+COELHO2: TRANSPORTE DOS ANIMAIS EUTANASIADOS PARA O INIAV

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:
SOP desenvolvido pela equipa do Projeto +Coelho2 para lebre-ibérica para fornecer uma referência e orientação aos investigadores na execução deste protocolo.

Versão: 1
Date: 20/07/19

FUNDAMENTAÇÃO: Os animais eutanasiados serão transportados para os Laboratórios do INIAV em Oeiras, onde as necropsias e as análises laboratoriais serão conduzidas nos Laboratórios de Referencia de Saúde Animal.

EQUIPAMENTO E MATERIAL:
Arca de transporte
Carregadores de frio
Sacos de plástico
Ficha de requisição se análises (Modelo IMP-4.4-01.04/2 ou ficha de Identificação das amostras do Projeto +Coelho (Despacho 4757/17 de 31 de maio).

DOCUMENTO DE SUPORTE: Ficha de identificação

PROCEDIMENTO:
Uma vez eutanasiados, os animais são introduzidos em saco de plástico fechado com um nó, e seguidamente introduzido em outro saco, também este fechado. Os cadáveres são então colocados numa arca, juntamente com carregadores de frio, congelados.

Mensagem nº /Message n.º	Data / Date	Nº de páginas (incl. a capa) /Number of pages (incl. Cover sheet)
13	27-12-2019	1

Nome do destinatário / Name of adressed (tipe)	Contactos
Ex.mo(a) Sr.(ª) Dr.(ª) Margarida Duarte	margarida.duarte@iniav.pt

De / From
Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

Assunto:

Autorização de Ensaio clínico
Ensaio clínico para avaliação da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica com vacinas autorizadas para coelho doméstico (Projeto +coelho)
N.º de autorização: 79/ECVPT/20149

Cumpre-me informar V. Exa. que, nos termos do artigo 99.º Decreto-Lei n.º 148/2008 de 29 de Julho alterado pelo Decreto-lei n.º 314/2009 de 28 de Outubro, é autorizado o seguinte ensaio clínico com o respectivo n.º de autorização:

Ensaio clínico para avaliação da eficácia de vacinação contra a mixomatose em lebre-ibérica com vacinas autorizadas para coelho doméstico (Projeto +coelho)

N.º de autorização de Ensaio clínico
79/ECVPT/2019

Solicita-se o envio de um relatório final conclusivo do ensaio de acordo com os requisitos da VICH GL9, até um mês após a sua conclusão.

Com os melhores cumprimentos,

P/O Diretor Geral

Fernando Bernardo

CAS/

Graça Mariano
Subdiretora-Geral
Por despacho de delegação de competências nº 8140/2018
publicado no DRE, II série nº 159, de agosto de 2018

CAMPO GRANDE, Nº 50 1700-093 LISBOA TELEF. 21 323 95 00 FAX. 21 346 35 18

Anexo V-B

Credencial para Captura de Lebre-ibérica

ICNF
Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

DEPARTAMENTO DE GESTÃO E VALORIZAÇÃO FLORESTAL

DIVISÃO DE RECURSOS CINEGÉTICOS E AQUÍCOLAS

CREDENCIAL N.º 1 – DGVF/DRCA/ 2019

CAPTURA DE LEBRES *(Lepus granatensis)*

Em conformidade com o disposto nos n.ºs 2 e 3 do art.º 4.º do Decreto-Lei n.º 202/2004, de 18 de agosto, na sua atual redação, e por nos ter sido requerido pela Dra. Margarida Dias Duarte, coordenadora do Grupo de Trabalho +Coelho, com sede no INIAV, Oeiras, ficam autorizados a capturar 48 lebres, com o auxílio de redes, as pessoas constantes da listagem anexa, nas zonas de caça igualmente identificadas.

N.º	Local de captura	Responsável captura	Condutor	Viatura
1	ZCM Elvas (proc.º n.º 6723-ICNF) - Elvas	Luís Vilar Mayor	Francisco Pinto	93-GR-77
2	ZCM Campo Maior (proc.º n.º 3543-ICNF) – Campo Maior	Luís Vilar Mayor	Francisco Pinto	93-GR-77
3	ZCT Malhada Velha (proc.º n.º 6324-ICNF) – Ferreira do Alentejo	João Gonçalves	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
4	ZCM Malhada Velha e Outras (proc. N.º 2762-ICNF) – Ferreira do Alentejo	Filipe Cardoso	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
5	ZCA Bate de Água (proc.º n.º 6309-ICNF) – Ferreira do Alentejo	Sérgio Gamito	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
6	Orizonte Lisbon Golf - Benavente	Susete Mestre	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
7	ZCT das Herdades da Maruta, Pardeiro e Outras (proc.º n.º 6894-ICNF) - Almodôvar	António Lourenço	Fábio Santos/ José Lopes Bernardino	93-41-AZ/ 61-48-OU/ 01-87-XU
8	ZCT do Monte Basto (proc.º n.º 2096-ICNF) - Beja	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
9	ZCT da Herdade do Monte da Vinha (proc.º n.º 2405-ICNF) - Almodôvar	Luís Carlos Carvalho	Sebastião Miguel/ Fábio Santos	93-41-AZ/ 61-48-OU
10	ZCA da Herdade dos Mouros e Outras (proc.º n.º 1374-ICNF) - Almodôvar	Francisco Rodrigues	José Lopes Bernardino	01-87-XU
11	ZCA Reguengos de Monsaraz (proc.º n.º 5614-ICNF) – Reguengos de Monsaraz	Mário Monteiro	José Lopes Bernardino/ José da Rosa Clérigo Gonçalves	01-87-XU/ 44-UF-75
12	ZCT das Herdades dos Coelheiros e Outras - Serpa	Francisco dos Santos Sales Valente	José Lopes Bernardino	01-87-XU

Os animais capturados destinam-se a ser transportados para a Quinta do Almiara e Infesto (zona de caça associativa da Quinta do Almiara e Infesto – processo n.º 798-ICNF – Torres Vedras) pelos condutores e nas viaturas acima identificados.

Ficam ainda autorizadas a participar nas capturas, como condutores de cães, batedores, bandeireiros e na colocação e remoção das redes, as pessoas a designar pelo responsável das capturas.

Esta credencial é válida de 31 de agosto a 30 de novembro de 2019.

O Vogal do Conselho Diretivo

Nuno Sequeira

Anexo V-C

Caderno de Encargos

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA, I.P.

CADERNO DE ENCARGOS

FORNECIMENTO DE INSTALAÇÕES PARA LEBRE-IBÉRICA, MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS E ACOMPANHAMENTO DOS ATOS MÉDICOS NO ÂMBITO DO CUMPRIMENTO DA MEDIDA 7.6 CONSTANTE DA MEMÓRIA DESCRITIVA DO PROJETO +COELHO2

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL

Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

PARTE I – CLÁUSULAS JURÍDICAS

Capítulo I

Disposições Gerais

Cláusula 1.ª

Objeto

1. O presente Caderno de Encargos compreende as condições de fornecimento que devem ocorrer no contrato, constantes das cláusulas seguintes, a estabelecer entre o adjudicatário e a entidade adjudicante, na sequência do procedimento pré-contratual que tem por objeto o **fornecimento de instalações no âmbito dos requisitos descritos em seguida e da prestação de serviços de implementação/adaptação de instalações para albergar 24 exemplares de lebre-ibérica durante 8 meses, acompanhamento das mesmas instalações, manutenção dos animais e de apoio aos atos médicos,** decorrentes da execução da medida 7.6 da Memória Descritiva do Projeto +Coelho 2 intitulada "Avaliação da eficácia de vacinas comerciais contra mixomatose em lebre-ibérica".

Cláusula 2.ª

Critério de adjudicação

1. A adjudicação será feita de acordo com o critério do mais baixo preço, não sendo aplicados outros fatores e ponderações.

2. Para efeito da análise das propostas, a entidade adjudicante poderá solicitar aos concorrentes documentos comprovativos das especificações indicadas nas suas propostas.

Cláusula 3.ª

Coordenação

Os serviços objeto deste contrato serão prestados sob coordenação direta do Grupo de Trabalho +Coelho, nomeadamente pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária -INIAV, I.P., cujos membros da equipa de acompanhamento constam da cláusula 4ª.

Cláusula 4.ª

Equipa de acompanhamento

1. Será nomeada a equipa de acompanhamento do serviço constituída pela Doutora Margarida Duarte e Dr. Fábio Abade dos Santos, Médicos Veterinários e membros da equipa do +Coelho.

Cláusula 5.ª

Proposta

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

1. A proposta deve ser submetida com o preço total para a construção ou adaptação de instalações já existentes, e sua manutenção durante um período máximo de 12 meses e não inferior a 8 meses de acordo com todos os pontos, sem exceção, abordados de forma discriminada na Parte II do presente caderno de encargos, respeitante às cláusulas técnicas.

Cláusula 6.ª

Contrato

1. Na execução da prestação dos serviços que constituem o objeto do presente contrato, e de todos os atos que lhe digam respeito, o adjudicatário obriga-se a dar cumprimento ao disposto no clausulado do caderno de encargos. O contrato é composto pelo respetivo clausulado e seus anexos.

2. O contrato integra ainda os seguintes elementos:

a) Os suprimentos dos erros e das omissões do Caderno de Encargos, identificados pelos concorrentes, desde que esses erros e omissões tenham sido expressamente aceites pelo órgão competente para a decisão de contratar;

b) Os esclarecimentos e as retificações relativos ao Caderno de Encargos;

c) O presente Caderno de Encargos e respetivos Anexos;

d) A(s) proposta(s) adjudicada(s);

e) Os esclarecimentos sobre a(s) proposta(s) adjudicada(s) prestados pelo adjudicatário.

3. Em caso de divergência entre os documentos referidos no número anterior, a respetiva prevalência é determinada pela ordem pela qual aí são indicados.

4. Em caso de divergência entre os documentos referidos no n.º 2 e o clausulado do presente caderno de encargos e seus anexos, prevalecem os primeiros, salvo quanto aos ajustamentos propostos de acordo com o disposto no artigo 99.º do Código dos Contratos Públicos e aceites pelo adjudicatário nos termos do disposto no artigo 101.º desse mesmo diploma legal.

Cláusula 7.ª

Interpretação do Contrato

1. Em caso de dúvida sobre a interpretação das regras aplicáveis à execução do contrato, o adjudicatário deve solicitar por escrito um esclarecimento à entidade adjudicante.

2. O adjudicatário obriga-se a ter em conta, na execução dos serviços, as orientações que lhe forem transmitidas por escrito pela entidade adjudicante, na medida em que as mesmas não colidam com as regras aplicáveis à execução do contrato.

Cláusula 8.ª

Alterações do Contrato

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

1. O adjudicatário obriga-se a manter os preços dos serviços objeto de contrato, excetuando-se o caso em que venha a prestar os mesmos serviços, a preços considerados mais vantajosos para o INIAV, I.P. do que os fixados no contrato.

2. Qualquer intenção de alteração ao contrato deve ser comunicada pela parte interessada à outra parte.

3. A comunicação referida no número anterior deve ser feita por carta registada com aviso de receção, com uma antecedência mínima de 60 (sessenta) dias em relação à data em que se pretende ver introduzida a alteração.

4. A alteração não pode conduzir à modificação das prestações principais do objeto do contrato.

Capítulo II
Obrigações Contratuais

Secção I
Obrigações do Adjudicatário

Cláusula 9.ª
Obrigações Principais do Adjudicatário

1. Sem prejuízo de outras obrigações previstas na legislação aplicável, no presente Caderno de Encargos ou nas cláusulas contratuais, da celebração do contrato decorrem para o adjudicatário, em conformidade com a absoluta subordinação aos princípios da ética profissional, isenção, independência, zelo e competência, as seguintes obrigações principais:

a) Apresentar proposta de preços unitários, discriminando e caracterizando os serviços disponibilizados e os valores respetivos, de acordo com a proposta adjudicada;

b) Obrigação de prestação dos serviços identificados na sua proposta e de forma a assegurar à entidade adjudicante a prossecução dos objetivos e a obtenção dos resultados pretendidos;

c) Obrigação de garantia dos serviços;

d) Obrigação de assumir todos os gastos inerentes aos serviços objeto do presente procedimento;

2. A título acessório, o adjudicatário fica ainda obrigado, designadamente, a recorrer a todos os meios humanos e materiais que sejam necessários e adequados ao bom funcionamento dos serviços e à completa execução das tarefas a seu cargo.

Cláusula 10.ª
Obrigação de Sigilo

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

1. O fornecedor deve guardar sigilo sobre toda a informação e documentação, técnica e não técnica, comercial ou outra, relativa ao Representante do INIAV, I.P., de que possa ter conhecimento ao abrigo, ou em relação, com a execução do contrato.

2. A informação e a documentação cobertas pelo dever de sigilo não podem ser transmitidas a terceiros, nem objeto de qualquer uso ou modo de aproveitamento que não o destinado direta e exclusivamente à execução do contrato.

3. Exclui-se do dever de sigilo previsto a informação e a documentação que fossem comprovadamente do domínio público à data da respetiva obtenção pelo fornecedor ou que este seja legalmente obrigado a revelar, por força da lei, de processo judicial ou a pedido de autoridades reguladoras ou outras entidades administrativas competentes.

4. O não cumprimento desta obrigação constitui fundamento suficiente para a rescisão do contrato por parte do INIAV, I.P..

Cláusula 11.ª

Patentes, Licenças e Marcas Registadas

1. São da responsabilidade do adjudicatário quaisquer encargos decorrentes da utilização, no âmbito do contrato, de marcas registadas, patentes registadas ou licenças.

2. Caso a entidade adjudicante venha a ser demandada por alegadamente ter infringido, na execução do contrato, qualquer dos direitos mencionados no número anterior, o adjudicatário indemniza-o de todas as despesas que, em consequência, haja de fazer e de todas as quantias que tenha de pagar seja a que título for.

Secção II

Obrigações do INIAV, I.P.

Cláusula 12.ª

Preço Base

1. A contrapartida, a que o INIAV, I.P. se obriga a pagar ao adjudicatário como pelos serviços prestados, tem o valor máximo de **5.500,00** € (cinco mil e quinhentos euros), a que cresce o IVA à taxa legal em vigor.

Cláusula 13.ª

Condições de Pagamento

1. O pagamento dos encargos que respeitam ao INIAV, I.P. será feito mediante apresentação de fatura, que será enviada ao INIAV IP, acompanhada dos documentos justificativos, se necessário.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL

Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

2. A quantia devida nos termos da cláusula anterior deverá ser paga no prazo máximo de 60 (sessenta) dias após a receção da respetiva fatura.

3. Para os efeitos do número anterior, a obrigação considera-se vencida com a assinatura dos autos de receção respetivos.

4. Em caso de discordância por parte do INIAV, I.P. quanto ao valor indicado na fatura, devem estes comunicar ao adjudicatário, por escrito, o respetivo fundamentos, ficando o este obrigado a prestar os esclarecimentos necessários ou proceder à emissão da respetiva nota de crédito.

5. Nas condições de pagamento a apresentar pelos concorrentes não podem ser propostos adiantamentos por conta dos serviços a prestar.

Capítulo III

Incumprimentos Contratuais, Penalidades e Resolução

Cláusula 14.ª

Incumprimentos Contratuais

1. Caso o INIAV, I.P. constate a falta de bom e pontual cumprimento do contrato por parte do adjudicatário, reserva-se o direito de o rescindir, bastando para o efeito, o envio de uma comunicação devidamente fundamentada.

2. Na determinação da gravidade do incumprimento, o INIAV, I.P., tem de ter em conta, nomeadamente, a duração da infração, a sua eventual reiteração, o grau de culpa do adjudicatário e as consequências do incumprimento.

3. Sem prejuízo da possibilidade de rescisão do presente contrato por parte do INIAV, I.P., tendo por fundamento o incumprimento das obrigações assumidas pelo adjudicatário, poderão ser aplicadas a este último, sanções de natureza pecuniária, cujo valor acumulado não poderá exceder 20% do valor contratual, nos seguintes termos:

a) € 250,00€ (duzentos e cinquenta euros) pelo incumprimento das datas e prazos de entrega/fornecimento dos serviços adjudicados, objeto do presente procedimento, superior a 10 dias sem justa causa ou declaração prévia escrita do adjudicatário a justificar;

b) € 250,00€ (duzentos e cinquenta euros) pelo incumprimento da obrigação e dever de garantir os requisitos legais;

c) € 1.000,00€ (mil euros) pelo incumprimento de algum dever resultante da conformidade com os termos legais.

4. Em caso de não rescisão do contrato por incumprimento imputável ao adjudicatário, o INIAV, I.P. pode aplicar-lhe uma sanção pecuniária até ao limite de 30 % do valor contratual.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

5. Ao valor da sanção pecuniária prevista no número anterior são deduzidas as importâncias pagas pelo adjudicatário ao abrigo da alínea a) do nº 3, relativamente aos serviços objeto do contrato, cujo atraso na entrega tenha determinado a respetiva resolução.

6. O INIAV, I.P. pode compensar os pagamentos devidos ao abrigo do contrato com as sanções pecuniárias devidas nos termos da presente cláusula.

7. O pagamento de sanções de natureza pecuniária previstas na presente cláusula, bem como a perda da caução, se aplicável, não contendem com o pagamento ao INIAV, I.P. de uma indemnização pelos danos em que o mesmo eventualmente venha a incorrer, decorrentes da rescisão do contrato.

Cláusula 15.ª
Casos Fortuitos e Força Maior

1. Nenhuma das partes incorrerá em responsabilidade se, por caso fortuito ou de força maior, for impedido de cumprir as obrigações assumidas no Contrato. Assim, não poderão ser impostas penalidades, nem é havida como incumprimento, a não realização pontual das prestações contratuais a cargo de qualquer das partes que resulte de caso fortuito ou de força maior, entendendo-se como tal as circunstâncias que impossibilitem a respetiva realização, alheias à vontade da parte afetada, que ela não pudesse conhecer ou prever à data da celebração do contrato, cujos efeitos não lhe fosse razoavelmente exigível contornar ou evitar e que não derive de falta ou negligência de qualquer delas.

2. Podem constituir força maior, para efeitos do número anterior, designadamente, tremores de terra, condições meteorológicas, incêndios, epidemias, sabotagens, greves, embargos ou bloqueios internacionais, atos de guerra ou terrorismo, motins e determinações governamentais ou administrativas injuntivas.

3. Não constituem força maior, designadamente:

a) Circunstâncias que não constituam força maior para os subcontratados do adjudicatário, na parte em que intervenham;

b) Greves ou conflitos laborais limitados às sociedades do adjudicatário ou a grupos de sociedades em que este se integre, bem como a sociedades ou grupos de sociedades dos seus subcontratados;

c) Determinações governamentais, administrativas, ou judiciais de natureza sancionatória ou de outra forma resultantes do incumprimento pelo adjudicatário de deveres ou ónus que sobre ele recaiam;

d) Manifestações populares devidas ao incumprimento pelo adjudicatário de normas legais;

e) Incêndios ou inundações com origem nas instalações do adjudicatário cuja causa, propagação ou proporções se devam a culpa ou negligência sua ou ao incumprimento de normas de segurança;

f) Avarias nos sistemas informáticos ou mecânicos do adjudicatário não devidas a sabotagem;

g) Eventos que estejam ou devam estar cobertos por seguros.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

4. A parte que invocar casos fortuitos ou de força maior deverá comunicar e justificar tais situações à outra parte de imediato, bem como informar o prazo previsível para restabelecer a situação.

5. A força maior determina a prorrogação dos prazos de cumprimento das obrigações contratuais afetadas pelo período de tempo comprovadamente correspondente ao impedimento resultante da força maior.

Cláusula 16.ª

Resolução Por Parte do INIAV, I.P.

1. Sem prejuízo de outros fundamentos de resolução do contrato previsto na lei, o INIAV, I.P. pode resolver o contrato, a título sancionatório, no caso de o adjudicatário violar de forma grave ou reiterada qualquer das obrigações que lhe incumbem, designadamente nos seguintes casos:

a) Atraso, total ou parcial, sem justa causa ou declaração escrita do adjudicatário da desconformidade com o estabelecido;

b) Pelo não fornecimento dos serviços, objeto do presente procedimento, nos termos e características previstas no presente Caderno de Encargos;

c) Pelo incumprimento de algum dever resultante da não conformidade com o estabelecido no presente caderno de encargos e proposta adjudicada;

d) Por negligência;

e) Pelo não cumprimento dos termos e normas legais vigentes.

2. O direito de resolução referido no número anterior exerce-se mediante declaração enviada ao adjudicatário e não determina a repetição das prestações já realizadas, a menos que tal seja determinado pelo INIAV, I.P..

3. O direito de resolução exerce-se nos termos legais.

Cláusula 17.ª

Resolução Por Parte do Adjudicatário

1. Sem prejuízo de outros fundamentos de resolução previstos na lei, o adjudicatário pode resolver o contrato quando qualquer montante que lhe seja devido esteja em dívida há mais de 90 (noventa) dias, após o vencimento da fatura.

2. O direito de resolução é exercido por via judicial.

3. Nos casos previstos no n.º 1, o direito de resolução pode ser exercido mediante declaração enviada ao Representante do INIAV, I.P., que produz efeitos 30 (trinta) dias após a receção dessa declaração, salvo se este último cumprir as obrigações em atraso nesse prazo, acrescidas dos juros de mora a que houver lugar.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

4. A resolução do contrato nos termos dos números anteriores não determina a repetição das prestações já realizadas pelo adjudicatário, cessando, porém, todas as obrigações deste ao abrigo do contrato, com exceção daquelas a que se refere o artigo 444.º do Código dos Contratos Públicos.

Capítulo IV

Caução, seguros aspetos técnicos

Cláusula 18.ª

Prestação de Caução

De acordo com o disposto no n.º 2 do artigo 88.º do Código dos Contratos Públicos, sendo o preço contratual inferior a € 200.000,00, não é obrigatória a prestação de caução.

Cláusula 19.ª

Outros Encargos

1. Correm por conta do adjudicatário as obrigações relativas ao pessoal empregado na execução da adjudicação, nomeadamente o pagamento de salários e outras regularizações inerentes aos Contratos de Trabalho respetivos, à sua aptidão profissional, sua disciplina e ao respeito pela confidencialidade da informação a que tenha acesso.

2. O adjudicatário cumprirá, em relação ao pessoal ao seu serviço, todas as obrigações contratuais e legais, não sendo o INIAV, I.P. responsável, em caso algum, pelo incumprimento dessas obrigações.

3. Todo o pessoal ao serviço do adjudicatário deverá estar coberto por seguro de acidentes de trabalho nos termos legais, devendo ainda o adjudicatário ser detentor de seguro de responsabilidade civil para danos corporais e/ou materiais causados a terceiros, que lhe sejam legalmente imputáveis em consequência da exploração da atividade da respetiva empresa.

4. O INIAV I.P., poderá, em qualquer altura, solicitar as apólices de seguros mencionados no número anterior, assim como os recibos comprovativos da validade dos contratos.

5. São ainda da exclusiva responsabilidade do adjudicatário todas e quaisquer despesas, nomeadamente as de deslocação e estadia, em que este haja de incorrer em virtude da execução das obrigações que para aquele emerjam do presente Caderno de Encargos e do contrato.

Cláusula 20.º

Responsabilidade Civil

O adjudicatário é responsável por todos e quaisquer danos causados ao INIAV, I.P. ou a terceiros, resultantes de deficiências do sistema ou seus componentes.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

Cláusula 21.º

Responsabilidade Pelo Risco

1. O adjudicatário responderá, até à data da aceitação definitiva, por todas as perdas e danos pessoais e/ou patrimoniais decorrentes da execução do contrato.

2. A entidade pública adjudicante será responsável pelos danos causados nos bens ou pessoal do adjudicatário ou de terceiros quando aqueles tenham por origem negligência da sua parte.

Capítulo V

Resolução de Litígios

Cláusula 22.ª

Foro competente

Para resolução de todos os litígios decorrentes do contrato fica estipulada a competência do Tribunal Judicial da Comarca de Oeiras, com expressa renúncia a qualquer outro.

Capítulo VI

Disposições Finais

Cláusula 23.ª

Subcontratação e Cessão da Posição Contratual

A subcontratação pelo adjudicatário e a cessão da posição contratual por qualquer das partes depende da autorização da outra, nos termos do Código dos Contratos Públicos.

Cláusula 24.ª

Falsidade de Declarações

A prestação culposa de falsas declarações na proposta ou em quaisquer documentos que a instruam, bem como falsificações de documentos, para além de sujeitar os responsáveis às sanções cominadas para os respetivos crimes, determina, consoante a fase em que se encontrar o processo de concurso, a respetiva rejeição, exclusão do Concorrente ou invalidade da adjudicação e dos atos subsequentes.

Cláusula 25.ª

Comunicações e Notificações

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

1. Sem prejuízo de poderem ser acordadas outras regras quanto às notificações e comunicações entre as partes do contrato, estas devem ser dirigidas, nos termos do Código dos Contratos Públicos, para o domicílio ou sede contratual de cada uma, identificados no contrato.

2. Qualquer alteração das informações de contacto constantes do contrato deve ser comunicada à outra parte.

Cláusula 26.ª

Legislação aplicável

1. Ao presente contrato aplicar-se-á o disposto nos documentos contratuais, o disposto no Código de Contratos Públicos, bem como as demais disposições legais inerentes à natureza do serviço a contratar.

CADERNO DE ENCARGOS
PARTE II – CLÁUSULAS TÉCNICAS
CARACTERÍSTICAS DA PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS

Cláusula 27.ª

Objeto

O objeto do contrato, de acordo com as cláusulas descritas no Caderno de Encargos, consiste no FORNECIMENTO E ACOMPANHAMENTO DE INSTALAÇÕES PARA LEBRE-IBÉRICA,TRATAMENTO DOS ANIMAIS E APOIO AOS ATOS MÉDICOS NO ÂMBITO DO CUMPRIMENTO DA MEDIDA 7.6 DA MEMÓRIA DESCRITIVA DO PROJETO +COELHO 2 , com coordenação do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. e de acordo com o solicitado pela equipa de acompanhamento

Cláusula 28.ª

Local e características das Instalações

1. O local das instalações deverá estar situado no território de Portugal continental sendo dada preferência ao local que abranja o maior número de pontos elencados de seguida, sem qualquer ordem de importância.

a) Menor distância ao polo de Oeiras do INIAV, IP, com vista a possibilitar visitas mais regulares da equipa de acompanhamento ao local;
b) Dispor de pelo menos 4 parques com capacidade para alojar 4 grupos de 5-7 lebres adultas;
c) Dispor de distância lateral entre parques superior a 1 metro ou desejavelmente da possibilidade de existir 1 parque vazio entre cada dois parques ocupados pelos animais;

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

d) Dispor de parques com área exterior e interior, permanentemente acessíveis aos animais, de preferência com pavimento em cimento de superfície regular;
e) Dispor de vedação anti-predadores terrestres e aéreo na área exterior do parque;
f) Dispor de parque interior com superfícies laterais, inferiores e superiores laváveis e com iluminação;
g) Dispor de condições de segurança anti-furto;
h) Estar enquadrado em zona sem populações selvagens de lebre-ibérica;
i) Dispor de condições para instalação, durante 2 meses, de equipamento para *ensaio in vivo*, com área mínima de 10 m^2;
j) Dispor de água potável e eletricidade e possibilidade de colocação de iluminação nos parques interiores;
k) Dispor de local adjacente para mudança de vestuário, a montante da entrada do primeiro parque de animais;
l) A área do parque exterior não deve ser inferior a 10 m^2 e a área do parque interior não deve ser inferior a 5 m^2;
m) Existência de material opaco, lavável, de altura não inferior a 30cm, que impeça a visualização dos animais entre parques;
n) vedações em boas condições nos parques exteriores, incluindo na superfície superior, com malha com um diâmetro inferior a 3 cm;
o) vedações do parque exterior em material metálico resistente e anticorrosivo sem possibilidade de causar lesões aos animais; O material da vedação superior, deverá ser constituído por material sintético, sem obrigação de ser metálico, resistente à passagem de espécies voadoras e outras, nomeadamente pequenas aves, contudo sem possibilidade de induzir lesões nestas;
p) A área envolvente, se térrea deve estar desmatada, para dificultar a aproximação de roedores e outros mamíferos;
q) As referidas intervenções deverão ter em conta o Ponto Nº14 da cláusula 28ª;

Cláusula 29ª

Calendarização dos serviços

1. Possibilidade de instalação dos animais em parque a partir do dia 1 de setembro de 2019 para início da quarentena;
2. Conclusão da implementação das instalações com as condições referidas na cláusula 28 a 1 de outubro;
3. Prestação de serviços de manutenção das instalações durante o ensaio por um período não superior a 12 meses;

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

3. O prestador de serviços deverá remeter para o Gabinete de Apoio aos Projetos, através do endereço de correio eletrónico gap@iniav.pt, a notificação do arranque e conclusão dos trabalhos conducentes à adequação das instalações.
4. Deverá se entregue um relatório de intervenção contendo informação com a identificação dos parques intervencionados com planta anexada e a data e o tipo de operação efetuada (manutenção ou instalação);

Cláusula 30.ª

Acompanhamento das instalações, tratamento dos animais e apoio aos atos médicos

O adjudicatário deverá assegurar o acompanhamento de leporídeos nomeadamente através de:

1. visitas regulares com periodicidade não inferior a 2 vezes por semana, de forma a garantir as condições sanitárias e de bem-estar dos animais albergados;
2. contato direto com os membros da equipa de acompanhamento de forma a ser possível efetuar visitas ao local sempre que necessário;
3. apoio aos atos médicos, nomeadamente na captura e contenção dos animais.

Cláusula 31.ª

CONDIÇÕES DE BEM-ESTAR

1. O adjudicado deverá estar ciente e cumprir escrupulosamente as liberdades de bem-estar animal (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL, 1992):

1.LIBERDADE DE SEDE E FOME

2.LIBERDADE DE DESCONFORTO TÉRMICO

3.LIBERDADE DA DOR, TRAUMATISMOS E DOENÇAS

4.LIBERDADE PARA EXPRESSAR O COMPORTAMENTO NORMAL

5.LIBERDADE DO MEDO E STRESS

2. A água utilizada para abeberamento dos animais deverá ter origem na rede pública ou em alternativa ter sido alvo de análise microbiológica e cumprir os requisitos de água para consumo humano de acordo com a lei nº.179 de 1-8-1998 do Diário da República;

3. O alimento utilizado deverá ter origem em alimento composto comercial especifico para leporídeos e de outros alimentos naturais suplementares após aprovação pela equipa de acompanhamento;

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

4. O material da cama dos animais deverá ter origem em produto vegetal seco, não contendo materiais vegetais ou de outras origens capazes de induzir lesões nos animais;

Cláusula 32.ª

Perfil de Pessoal

O pessoal destacado para Intervenção nas Instalações objeto do contrato deverá possuir as qualificações profissionais inerentes às funções a desempenhar, bem como experiência profissional adequada.

REPÚBLICA PORTUGUESA | AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
Sede: Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras
Tel: 214 403 500 | Fax: 214 403 666 | www.iniav.pt

Anexo V-D

Credenciais de Detenção

DEPARTAMENTO DE GESTÃO E VALORIZAÇÃO FLORESTAL

DIVISÃO DE RECURSOS CINEGÉTICOS E AQUÍCOLAS

Autorização de detenção em cativeiro para fins científicos de lebres *(Lepus granatensis)*

Ao abrigo do ponto 1, do artigo 1.º da Portaria n.º 464/2001 de 8 de maio, autoriza-se a detenção em cativeiro para fins científicos de 24 espécimes de lebre, no período compreendido entre 31 de agosto de 2019 e 31 de dezembro de 2020, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, localizando-se o espaço físico da detenção nas instalações da Quinta do Almiara e Infesto (Zona de Caça Associativa Quinta do Almiara e Infesto Processo n.º 798 – ICNF), situada na freguesia do Turcifal, concelho de Torres Vedras.

O Vogal do Conselho Diretivo

Nuno Sequeira

ICNF
Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Departamento de Gestão e Valorização da Floresta

Divisão dos Recursos Cinegéticos e Aquícolas

Autorização de detenção em cativeiro para fins científicos de lebres (*Lepus granatensis*)

Ao abrigo do ponto 1, do artigo 1º da portaria 464/2001 de 8 de maio, autoriza-se a detenção em cativeiro para fins científicos de 24 espécimes de lebre ibérica (*Lepus granatensis*), bem como do efetivo resultante de reprodução que venha a ocorrer, até 31 de dezembro de 2023, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, localizando-se o espaço físico da detenção nas instalações da Quinta do Almiara e Infesto (Zona de Caça Associativa Quinta do Almiara e Infesto, processo n.º 798 – ICNF) situada na Freguesia do Turcifal, Concelho de Torres Vedras.

Lisboa, 4 de fevereiro de 2021.

O Vogal do Conselho Diretivo,

Versão do Adobe Acrobat Reader: 2020.013.20074

Nuno Sequeira

Anexo VI-A

Credencial de Autorização para a Captura de exemplares de Coelho-bravo

CREDENCIAL N.º 2 / 2020 / Outras - DRCNF-LVT/DECF

CAPTURAS DE COELHO-BRAVO

Em conformidade com o disposto no art.º 113.º do Decreto-Lei n.º 202/2004, de 18 de agosto, com a redação que lhe foi conferida pelo Decreto-Lei n.º 202/2004, de 18 de agosto e posteriores alterações, uma equipa da **ANPC** e **CIBIO-UA**, está autorizada a realizar capturas de coelho-bravo, com recurso à utilização de furões e redes de tresmalho, por forma a evitar prejuízos que aqueles animais causam na cultura e para a recolha de amostras de sangue tendo em vista a realização de análises genética e serológica

DENOMINAÇÃO	ÁREA DE INTERVENÇÃO	FREGUESIA	CONCELHO
Sítio das Camarinhas	Culturas	Alpiarça	Alpiarça

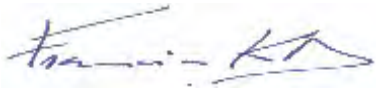
ESTA CREDENCIAL É VÁLIDA ATÉ 31/12/2020 E DEVE SER DEVOLVIDA À DIREÇÃO REGIONAL DE CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E DAS FLORESTAS DE LISBOA E VALE DO TEJO, NO PRAZO DE 30 DIAS APÓS O SEU TERMO (n.º 6, do artigo 113.º, do Decreto-Lei n.º 202/2004 de 18 de agosto, com a redação conferida pelo Decreto-Lei n.º 2/2011 de 6 de Janeiro).

NOME	ALVARÁ DE DETENÇÃO DE FURÕES N.º
Eurico Ferreira	03/DRCNF-LVT/ICNF

Esta credencial é pessoal e intransmissível e deverá ser devolvida, conjuntamente com o relatório das ações realizadas.

Chefe de Divisão de Extensão e Competitividade Florestal de Lisboa e Vale do Tejo

Assinado por : **FRANCISCO BETTENCOURT KEIL AMARAL**
Num. de Identificação: BI062505475
Data: 2020.10.22 09:39:53+01'00'



Anexo VI-B

Ofício de Autorização de Captura de Coelhos-bravos

À
ANPC – Associação Nacional de Proprietários Rurais
Gestão Cinegética e Biodiversidade
Rua Mestre Lima de Freitas, 1 – 5.º
1549-012 LISBOA

jc@anpc.pt

SUA REFERÊNCIA	SUA COMUNICAÇÃO DE	NOSSA REFERÊNCIA
SD 85617		43289/2020/ DRCNF-LVT/DECF 22-10-2020

ASSUNTO **CORREÇÃO DE DENSIDADE CAPTURAS DE COELHO-BRAVO**

Em resposta ao pedido feito por V.Exª., informa-se que nos termos nº.1 e 2 do artº. 113º. do Decreto-Lei nº.202/2004 de 18 de Agosto, na sua atual redação, estão autorizados a realizar **capturas de coelhos**, com recurso à utilização de furões e redes de tresmalho, por forma a evitar prejuízos que aqueles animais causam na cultura e para a recolha de amostras de sangue tendo em vista a realização de análises genética e serológica, nas seguintes datas e locais constantanes na **CREDENCIAL N.º 2 / 2020 / Outras - DRCNF-LVT/DECF CAPTURAS DE COELHO-BRAVO**, em anexo

Nos termos do nº 3 do artigo 85º do mesmo diploma, o transporte e utilização dos furões deve ser acompanhado de Guia de Transporte de modelo da DGRF emitida pela entidade detentora dos mesmos e conforme estabelecido no Despacho (extrato) nº 10599/2008 de 01-02-2008, deve o **duplicado da referida Guia de Transporte** ser remetido aos serviços da Direção Regional de Conservação da Natureza e Florestas (DRCNFLVT), onde os mesmos estão registados, **nos dois dias seguintes à sua emissão**.

Mais se informa que nos termos do nº 6 do mesmo artigo, deverá essa entidade comunicar à DRCNFLVT, no **prazo de 30 dias** contados do termo da ação, o resultado da mesma, preenchendo para o efeito as "**Fichas anexas**" e devolvendo-as, conforme determina o nº 6 do artº. 113º.do Decreto-Lei nº 202/2004, de 18 de agosto com a atual redação.

Com os melhores cumprimentos,

Chefe de Divisão de Extensão e Competitividade Florestal

Assinado por : **FRANCISCO BETTENCOURT KEIL AMARAL**
Num. de Identificação: BI062505475
Data: 2020.10.22 16:50:07+01'00'

Direção Regional da Conservação da Natureza e Florestas de Lisboa e Vale do Tejo
CNEMA – Quinta das Cegonhas, Apartado 59, 2001-901 SANTARÉM, PORTUGAL

TEL +351 243 306 530
E-MAIL drcn.flvt@icnf.pt
www.icnf.pt

Anexo VI-C

Relatório da Caracterização Genética e Deteção de Hibridação em Coelho-bravo

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DETEÇÃO DE HIBRIDAÇÃO EM COELHO-BRAVO

Amostras: No dia 27 de Outubro de 2020 recebemos no CIBIO, Campus de Vairão, 28 amostras provenientes de uma área de terreno não ordenado da Freguesia de Alpiarça, ao abrigo de credencial emitida pelo ICNF (Credencial n.º 2/2020), e destinando-se à translocação de animais para cercados de reprodução, localizados na zona de caça turística de Roubão, Braço de Prata e Outras, processo nº 66, a pedido da Companhia das Lezirias, SA.

Objetivo: Caracterização genética e detecção de hibridação entre coelho-bravo (WILD) e coelho doméstico (DOM), ou entre as subespécies selvagens *Oryctolagus cuniculus algirus* (ALG) e *O. c. cuniculus* (CUN).

Metodologia: A caracterização genética dos indivíduos foi realizada usando um total de 32 marcadores genéticos do tipo SNP (polimorfismos nucleotídicos simples), dos quais 31 representam o genoma nuclear e um representa o genoma mitocondrial[1]. Este painel de marcadores foi optimizado a partir de resultados científicos obtidos ao longo de mais de 25 anos de estudo das populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica[2–8]. Para detetar hibridação entre DOM e WILD, e entre ALG e CUN utilizaram-se três tipos de análises estatísticas: i) o índice de hibridação doméstico (HI_DOM = número de alelos DOM/número de alelos DOM+WILD) foi estimado usando oito SNPs (DW_Chr12_2, DW_Chr18, DW_Chr4, DW_Chr7, DW_Chr12, DW_Chr18_2, DW_ChrX2, DW_ChrX3); ii) o índice de hibridação *O. c. cuniculus e O. c. algirus* (HI_CUN = número de alelos CUN/número de alelos CUN+ALG) foi estimado usando 22 SNPs (AC_Chr11, AC_Chr13, AC_Chr17, AC_Chr18, AC_Chr20_2, AC_Chr3_2, AC_Chr3_3, AC_Chr9, AC_Chr1, AC_Chr14_2, AC_Chr15_2, AC_Chr12, AC_Chr4, AC_Chr4_2, AC_Chr6, AC_Chr7, AC_Chr8, AC_ChrX2, AC_ChrX3, AC_ChrX4, AC_ChrX1, AC_ChrX5); iii) a análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE[9,10], que permite inferir a composição genética da população e estimar a proporção de genes DOM, ALG e CUN em cada indivíduo. Esta análise foi realizada usando os 30 SNPs descritos anteriormente, comparando os coelhos em análise com uma base de dados existente no CIBIO/InBIO com mais de 250 indivíduos de 28 populações de toda a Península Ibérica, bem como de coelhos domésticos. Além disso, incorporou-se a iv) análise filogeográfica do gene citocromo-B (CytB) do DNA

mitocondrial[5] e do gene SRY do cromossoma Y[11], na interpretação final dos resultados. Com base nos valores de referência estimados para as populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica, os indivíduos são classificados em coelhos domésticos, coelho-bravo *O. c. algirus* ou *O. c. cuniculus,* ou híbridos(**Tabela 1**).

Tabela 1: Critérios definidos para a classificação genética dos indivíduos com base nas análises estatísticas realizadas [(i) índice de hibridação doméstico (HI_DOM), (ii) índice de hibridação *O. c. cuniculus* (HI_CUN), (iii) análise Bayesiana e (iv) análise filogeográfica] e valores de referência obtidos para as populações naturais de coelho-bravo e coelho doméstico na Península Ibérica.

i) índice de hibridação doméstico (HI_DOM)	**ii) Índice de hibridação *O. c. cuniculus* (HI_CUN)**	**iii) Análise Bayesiana**		**iv) Análise filogeográfica**		**Interpretação final**
		K2 (ALG/CUN)	**K3** (DOM/CUN/ALG)	**CytB**	**SRY**	
>90%	-	<90% ALG	>90% DOM	B	B	Coelho doméstico
<30%	>80%	<90% ALG	>90% CUN	B	A ou B	Coelho-bravo – *O. c. cuniculus*
<10%	<20%	>90% ALG	>90% ALG	A	A	Coelho-bravo – *O. c. algirus*
>10% (ALG) <90% ou >30% (CUN) <90%	>20% & <80%	<90% ALG	<90% DOM/CUN/ALG	A ou B	A ou B	Híbrido

Resultados: A classificação genética dos 28 indivíduos está representada na **Tabela 2**.

Tabela 2: Classificação genética dos indivíduos analisados.

Código (Reservado aos nossos serviços)	**Identificação da amostra**	**Proveniência**	**Coelho doméstico (DOM)**	**Coelho-bravo**		**Híbrido**
				***O. c. algirus* (ALG)**	***O. c. cuniculus* (CUN)**	
CA20-153	313			X		
CA20-154	314			X		
CA20-155	315			X		
CA20-156	316			X		
CA20-157	317			X		
CA20-158	318			X		
CA20-159	319			X		
CA20-160	320			X		
CA20-161	321			X		
CA20-162	322			X		
CA20-163	323			X		
CA20-164	324			X		
CA20-165	325			X		
CA20-166	326			X		

CA20-167	327			x		
CA20-168	328			x		
CA20-169	329			x		
CA20-170	330			x		
CA20-171	331			x		
CA20-172	332			x		
CA20-173	333			x		
CA20-174	334			x		
CA20-175	335			x		
CA20-176	336			x		
CA20-177	337			x		
CA20-178	339			x		
CA20-179	339B			x		
CA20-180	340			x		

O ICETA não se responsabiliza por nenhum tipo de consequências que os resultados dos testes possam trazer. A colheita e envio das amostras são da exclusiva responsabilidade do cliente que solicita os testes.

Conclusão:

A nível individual

Todas as amostras possuem uma composição genética típica de coelhos-bravos da subespécies *O. c. algirus*.

A nível populacional

As amostras, considerando que pertencem à mesma população, possuem uma composição genética típica de populações selvagens da subespécie *O. c. algirus,* presente na região Sudoeste da Península Ibérica, incluindo Portugal Continental.

Referências:

1. Queirós, J., Carneiro, M., Lopes, S. & Alves, P. Wild or domestic? Algirus or cuniculus? a novel genetic approach to infer the genetic integrity of European rabbit subspecies. no *First Iberian Congress of Applied Science on Game Resources (CICARC)* 52 (2019).
2. Carneiro, M. *et al.* Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science.* **345**, 1074 LP – 1079 (2014).
3. Carneiro, M. *et al.* The Genomic architecture of population divergence between subspecies of the European rabbit. Plos Genetics. **10**, (2014).
4. Carneiro, M. *et al.* The genetic structure of domestic rabbits. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 1801–1816 (2011).
5. Branco, M., Ferrand, N. & Monnerot, M. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity.* **85**, 307–317 (2000).
6. Branco, M. & Ferrand, N. Biochemical and Population Genetics of the Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, Carbonic Anhydrases I and II, from the Iberian Peninsula and France. *Biochem. Genet.* **41**, 391–404 (2003).

7. Geraldes, A., Ferrand, N. & Nachman, M. W. Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics* **173**, 919–933 (2006).
8. Branco, M., Machado, J. C. & Ferrand, N. Extensive genetic polymorphism of peptidases A, B, C, and D, in wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations from the Iberian Peninsula. *Biochem. Genet.* **37**, 237–249 (1999).
9. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959 (2000).
10. Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of population Structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567–1587 (2003).
11. Geraldes, A. *et al.* Reduced introgression of the Y chromosome between subspecies of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* **17**, 4489–4499 (2008).

Vairão, 30 de outubro de 2020

Responsável laboratório	**Responsável técnico**	**Responsável científico**
	Assinado por : **JOÃO LUÍS TEIXEIRA DE QUEIRÓS** Num. de Identificação: BI130071072 Data: 2021.02.03 15:29:03 +0000	
(Susana Lopes)	**(João Queirós)**	**(Paulo Célio Alves)**

CARTÃO DE CIDADÃO

Anexo VI-D

Relatório dos Resultados da Avaliação Sorológica a RHDV2

Anexo I

Relatório sorologia RHDV2 dos coelhos capturados em Alpiarça em 27 de Outubro 2020

Métodos

A amostra de sangue foi obtida por punção da veia safena, recolhida em tubos de coagulação e posteriormente centrifugada, e o soro recolhido.

As amostras foram analisadas laboratorialmente para quantificação por ELISA (*enzyme linked immune serum assay*) dos anticorpos específicos para a nova variante do vírus da Doença Hemorrágica dos Coelhos (RHDV2/*Lagovirus europaeus*/GI.2). O antigénio utilizado consistiu em VLP (*virus-like particles*) de RHDV2. Os controlos positivo e negativo são soros de coelhos bravos com títulos de anticorpos para RHDV2 elevados e nulos, respetivamente. Todas as amostras, controlo negativo e positivo foram testados em duplicado.

O resultado do ELISA é calculado a partir da absorvância média das duas réplicas de cada amostra, através da fórmula:

$$Índice\ de\ ELISA = \left[\frac{Média\ da\ absorvância\ da\ amostra}{2\ \times Média\ da\ absorvância\ do\ Controlo\ Negativo}\right]$$

O limiar de positividade, validado internamente pelo CIBIO, é de Índice de ELISA = 2,0.

Resultados

Os coelhos analisados correspondiam a 17 fêmeas e 11 machos, 27 adultos e 1 juvenil.

A prevalência de anticorpos contra o vírus da Doença hemorrágica viral na amostra foi de 53,6 %.

Identificação individual			Dados individuais					Anticorpos para RHDV2	
Brinco	**Microchip**	**Ficha de captura**	**Sexo**	**Idade**	**Peso (g)**	**Colónia**	**Estado reprodutivo**	**Índice de ELISA**	**Resultado**
Y3326	**620094100222403**	313	F	Adulto	1211	1		2,711	Positivo
Y3327	**620094100222407**	314	F	Adulto	1239	1		4,531	Positivo
Y2354	620094100222405	315	M	Adulto	1138	1		0,429	Negativo
Y3355	**620094100223989**	316	M	Adulto	1278	1		0,318	Negativo
Y3358	**620094100223157**	317	F	Adulto	1224	1		2,360	Positivo
Sem brinco (1)	**620094100223317**	318	M	Adulto	1193	1	Testículos escrotais	6,131	Positivo
Y3362	**620094100223207**	319	F	Adulto	1263	1		2,588	Positivo
Y3364	620094100223131	320	F	Adulto	982	1	Prenha	1,174	Negativo
Y3366	620094100223323	321	M	Adulto	1248	1		1,159	Negativo
Y3367	620094100223173	322	M	Juvenil	786	1		0,878	Negativo
(2)	**620094100223175**	323	F	Adulto	1096	1	Prenha	5,539	Positivo
Y3351	**620094100221413**	324	M	Adulto	1262	1		0,727	Negativo
Y3352	**620094100222401**	325	M	Adulto	1342	1	Testículos escrotais	3,625	Positivo
Y3353	**620094100224016**	326	F	Adulto	1101	1		2,675	Positivo
Y3356	620094100222415	327	F	Adulto	986	3		0,302	Negativo
Y3357	**620094100223149**	328	F	Adulto	1104	1		7,752	Positivo
Y3359	620094100223289	329	F	Adulto	1090	1		0,800	Negativo
Y3361	620094100223167	330	F	Adulto	1213	1		0,354	Negativo
Y3363	**620094100223579**	331	F	Adulto	1190	1	Prenha	3,588	Positivo
Y3365	620094100223191	332	M	Adulto	1082	1		0,248	Negativo
Y3371	**620094100223391**	333	F	Adulto	1123	2	Prenha	2,638	Positivo
Y3373	**620094100223413**	334	M	Adulto	1244	2		0,865	Negativo
Y3375	**620094100223405**	335	F	Adulto	1145	2		2,870	Positivo
Y3368	**620094100223237**	336	F	Adulto	1170	2	Prenha	8,213	Positivo
Y3370	**620094100223171**	337	F	Adulto	1220	2		2,860	Positivo
Y3372	**620094100223421**	339A (3)	M	Adulto	1260	2		2,417	Positivo
Y3374	**620094100223151**	339 (3)	F		1226			0,878	Negativo
Sem brinco (4)	Sem chip (4)	340	M	Adulto	1279	4	Testículos escrotais	0,494	Negativo
Controlo positivo								4,474	
Controlo negativo								0,500	

Anexo VI-E

Ficha de Captura

FICHA DE CAPTURA

ZONA DE CAÇA N.A Procº. Nº._____

1 . CAPTURA COELHO - BRAVO FICHA Nº. 1 DATA 27 / 10 / 2020

LOCAL SÍTIO DAS CAMARINHAS FREGUESIA ALPIANÇA

CONCELHO ALPIANÇA DISTRITO SANTARÉM

1.2. MOTIVOS DA CAPTURA: ☐ Grande densidade (sem perigo de causar prejuízos)

☒ Prevenção de futuros prejuízos

☐ Existência de prejuízos (mencionar culturas prejudicadas e o início de ocorrência de prejuízos em cada uma delas)

_____

☐ Vacinação

☒ RECOLHA DE ANIMAIS PARA CENSO DA REPRODUÇÃO NO ÂMBITO DO PROJETO "MAIS COELHO" E REALIZAÇÃO DE ANÁLISES GENÉTICAS E SEROLÓGICAS.

1.3 No caso de haver culturas não afectadas junto do local de captura, mencione. Indique também se se trata de culturas pelos quais os animais não manifestam apetência ou se as atacam em outras épocas do ano (neste caso indique as épocas):

_____

_____

1.4 CARACTERISTICAS DO HABITAT:

1.4.1 SOLO: ☒ arenoso ☐ argiloso ☐ calcário ☐ Granítico ☐ Xistoso
☐ com afloramentos ☒ com covas ☐ local junto do curso em linha de água

1.5 ANIMAIS CAPTURADOS: 17 fêmeas 5 prenhas

11 machos _____ em aleitamento

_____ de sexo indeterminado

Do número total de animais capturados 1 eram juvenis
Não se fez a determinação do estado das fêmeas ☐

1.6 DADOS COMPLEMENTARES NA CAPTURA PARTICIPARAM A ANPC, CIBIO, INIAV COM O APOIO DE EQUIPA DO ICNF E DE PESSOAL DA COMPANHIA DAS LEZÍRIAS PARA ALÉM DO PROPRIETÁRIO DOS FURÕES E OUTRO PESSOAL AUXILIAR.

PARTICIPARAM NA OPERAÇÃO 3 guardas florestais e 8 outros trabalhadores

constituindo 1 equipas de captura . A captura processou-se com/~~sem~~ a ajuda 10 furões.

O RESPONSÁVEL DA CAPTURA,

_____ (ANPC)

NOTA: A ficha de captura e de largada deverá ser preenchida em duplicado, destinando-se uma cópia aos serviços do DCNFLVT em cuja área de jurisdição foi efectuada a captura e a largada, que deverá ser devolvida no prazo de 30 dias.

FICHA DE LARGADA

1. LARGADA Companhia das Letrinas DATA 30 / 10 /2020

2.1. LOCAL: Companhia das Letrinas FREGUESIA: _____

CONCELHO: Benavente DISTRITO: Santarém

ZONA DE CAÇA Nº. 66 ICNF - ZCT Roubão, Braço de Prata e outras

2.2. CARACTERISTICAS DO HABITAT

SOLO: ☒ arenoso ☐ argiloso ☐ calcário ☐ granítico ☐ xistoso
☐ Com afloramento rochoso ☐ com covas ☐ local junto de curso e linha de água

2.2..2. VEGETAÇÃO CIRCUNDANTE:

Montado de sobro com pinheiro manso disperso

2.3 ANIMAIS LARGADOS: 17 fêmeas; 11 machos; _____ sexo indeterminado

2.4 ANIMAIS VACINADOS: _____ Mixomatose _____ Hemorrágica viral
Os animais foram desparasitados durante quarentena (espera resultados genética)

NOTA:
Os animais foram libertados em cercado de reprodução após tenham sido obtidos os resultados de análise genética e serológica pelo CIBIO.

O RESPONSÁVEL DA LARGADA,

João Camacho (AMPC)

Anexo VII-A

Notícias de Divulgação

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 44
11 de outubro 2018

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em **Evoramonte**, Distrito de Évora, **no dia da Abertura da Caça da Época Venatória 2018/2019**, a 5 outubro de 2018.*

O grupo +Coelho esteve presente na abertura à caça livre da época venatória 2018/2019, no passado dia 5 de outubro, em Evoramonte, concelho de Estremoz, acompanhando os associados da FENCAÇA.







António Feijão, Carlos Pinho e Sousa Rodrigues, associados da Fencaça.

A vigilância sanitária das populações de leporídeos constitui uma das medidas do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio) e dela depende o conhecimento da condição sanitária das populações silvetres e da evolução das doenças que afetam o coelho-bravo e a lebre ibérica no território nacional.

Este ato venatório foi dedicado à caça menor e em particular ao coelho e à perdiz. A equipa do INIAV (Mónica Cunha e Margarida Duarte) acompanhou os caçadores e procedeu à colheita de amostras biológicas de leporideos.

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em **Evoramonte**, Distrito de Évora, **no dia da Abertura da Caça na Época Venatória 2018/2019**, a 5 outubro, de 2018.*

Embora os animais estivessem em excelente condição corporal, os resultados laboratoriais realizados no Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal, no INIAV, confirmaram que alguns coelhos estavam infectados com o vírus da mixomatose.

No local, esteve também presente uma equipa da TVI, que entrevistou alguns dos presentes sobre a caça e sobre o projeto +Coelho.



Jacinto Amaro, Presidente da Fencaça, em Evoramonte a 5 de outubro à converça com Amilcar Matos, jornalista da TVI.



Em cima: Fernando Mello Gomes e Sousa Cintra. Em baixo: Mónica Cunha e Margarida Duarte.

Aproveitamos para retificar a informação veiculada no rodapé desta noticia, uma vez que o Programa de Investigação do Projeto +Coelho não se propõe encontrar uma "cura". Com efeito, a "erradicação" desta doença, à semelhança de muitas outras transmitidas por insetos, é atualmente impossível, desde logo

Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em ***Evoramonte****, Distrito de Évora, no* ***dia da Abertura da Caça na Época Venatória 2018/2019****, a 5 outubro, de 2018.*

por ser uma doença de distribuição mundial cujos reservatórios são desconhecidos. O programa inclui sim um conjunto de ***medidas profiláticas***, entre as quais o desenvolvimento de uma vacina oral.

e

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.*

REPÚBLICA PORTUGUESA

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 45
8 outubro de 2018

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho e dos Resultados de 1 ano de Projeto, e do Centro de Competência para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das espécies cinegeticas e Biodiversiade, na 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova.

A convite do Presidente do Presidente da Camara de Idanha-a-Nova, Jacinto Armindo Moreira Palma Jacinto, o Grupo de Trabalho +Coelho, através das suas representantes Margarida Duarte e Mónica Cunha, participou na 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, que decorreu nas Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova, nos dias 5 a 7 de outubro.

As intervenções foram inseridas num colóquio intitulado "Reflexão sobre o estado da Caça em Portugal", onde foi apresentada a estrutura e o conceito de operacionalidade do Projeto **+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral**, e os **resultados de 1 ano de atividade**.

Este evento foi organizado pela Câmara Municipal de Idanha-a-Nova e a União de Freguesias de Monfortinho e Salvaterra do Extremo.



Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho e dos Resultados de 1 ano de Projeto, e do Centro de Competência para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das espécies cinegeticas e Biodiversiade, na 5ª edição da Feira da Caça & Gastronomia, Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova.



Mesa do Coloquio, a 5 de outubro, nas Termas de Monfortinho, Idanha-a-Nova, constituída por Margarida Duarte e Mónica Cunha (INIAV), Armindo Jacinto (Presidente da Câmara Municipal de Idanha-A-Nova) e André Cid Ferreira (Presidente da Direção da FCPBI). André Cid representou também Fernando Castanheira Pinto (Presidente da CNCP) por não poder estar presente.

A investigadora Mónica Cunha apresentou ainda uma breve descrição do **Centro de Competencia para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das especies cinegeticas e Biodiversiade**, recentemente criado.

A Câmara Municipal de Idanha-a-Nova e a União de Freguesias de Monfortinho e Salvaterra do Extremo prepararam este evento em torno da caça e da gastronomia da carne de caça, que atraiu muitos visitantes portugueses e espanhois ao concelho de Idanha-a-Nova. Este concelho compreende mais de 100 zonas de caça e uma área ordenada de aproximadamente 140 mil hectares.

Na abertura esteve presente o Secretário de Estado das Florestas e do Desenvolvimento Rural, Miguel Freitas, o presidente da Câmara, Armindo Jacinto, que destacou o papel e a relevancia da caça no concelho de Idanha-a Nova, realçando a importancia da sustentabilidade desta atividade, e o presidente da União de Freguesias de Monfortinho e Salvaterra do Extremo, Paulo Lopes, que sublinhou a importancia da Feira da Caça & Gastronomia como veículo de promoção e divulgação da riqueza da região.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 46
14 outubro 2018

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, no **Ciborro**, Distrito de Évora, a 7 de outubro de 2018.*

No âmbito da vigilância sanitária das populações de leporídeos na época venatória 2018/2019, inserida no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, a equipa do INIAV do projeto +COELHO (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio), esteve presente na Herdade da Abrunheira, Paço de Aragão e Outras, localizada no Ciborro, no Concelho de Montemor-o-Novo, no dia 7 de outubro passado. Este ato venatório foi dedicado à caça menor.



Caravana de carros na madrugada de dia 7 de outubro de 2018, na chegada ao Ciborro,

As investigadoras Margarida Duarte e Mónica Cunha realizaram a colheita de material biológico fresco (baço, fígado, intestino e sangue) de coelhos e lebres caçados, para monitorização dos virus da doença hemorrágica e da mixomatose nestas espécies.



Jacinto Amaro, Presidente da FENCAÇA.

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, no **Ciborro**, Distrito de Évora, a 7 de outubro de 2018 .*



António Évora (esquerda) e António Feijão (direita), associados da FENACAÇA.

Todos os animais apresentavam excelente condição corporal e não se verificaram sinais clínicos desta, ou de outra doença, nem evidencias macroscópicas de parasitismo. Os resultados laboratoriais, realizados nos Laboratórios de Referência de Saúde Animal (Polo de Oeiras, INIAV), confirmaram que nenhum dos animais testados se encontrava infetado com os vírus da doença hemorrágica ou da mixomatose.



Paulo Corceiro (esquerda), João Galinha Barreto (direita em cima) e Luís Palma (direita em baixo), associados da FENCAÇA.

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

|Número 47
15 outubro 2018

Informações das atividades do GT +Coelho

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, na **Malarranha** (Monte dos Condes), concelho de Mora, a 13 de outubro de 2018.*

No âmbito da vigilância sanitária das populações de leporídeos do projeto +COELHO, em curso desde setembro de 2017, a equipa do INIAV do projeto +COELHO esteve, passado dia 13 outubro, na Zona de Caça Turística de Malpique e Monte Grande, em Pavia, Concelho de Mora, Distrito de Évora. Este ato venatório foi dedicado à caça de perdiz, lebre e coelho.



Grupo da caçadores da Fencaça, na manhã de 13 de Outubro de 2018. Da esquerda para a direita, Orlando Romano, Manuel Maia, Filipe Capucho, Jacinto Amaro e António Lopes.

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, na **Malarranha** (Monte dos Condes), concelho de Mora, a 13 de outubro de 2018.*



Caçadores no regresso da jornada de caça. Da esquerda para a direita Ascendino Vasconcelos , Manuel Pintalhão e Manuel Maia.



Caçadores confraternizando durante e depois da jornada de caça. Francisco Calado (esquerda) e Carlos Pinho (direita).

Durante a colheita de material foi possível constatar que alguns coelhos-bravos apresentavam parasitismo por ténias.

.



REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 48
19 Outubro
2018

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido



Fotografia de Russel Savory, publicada no Halestead Gazette, a 18 de outubro de 2018.

No passado **dia 1 de agosto** divulgámos o registo de mortalidade, verificada durante o mês de julho 2018 (Notícia 36) em **Lebres**, nas comunidades autónomas da Andaluzia e Castilla-La Mancha, localizadas respetivamente na região no sul e centro de Espanha.
As Lebres (pertencentes à espécie *Lepus granatensis*) encontradas mortas, apresentavam lesões compatíveis com mixomatose mas, na altura, não foi excluído que outras causas, por exemplo tóxicas, pudessem ter coadjuvado na morte desses animais.

Mais recentemente, **a 14 de outubro**, foi publicado, no Jornal ***Independent*** do Reino Unido, um artigo intitulado "*Brown Hares could face extinction after*

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido

mysterious deaths indentified as myxomatosis" (Lebre Castanha em perigo de extinção depois de mortes misteriosas atribuídas a mixomatose).
Esta publicação sucedeu a outras sobre a mesma matéria, publicadas na **BBC News**, no **The Telegraph** e no **East Anglia Daily Times**, reportando avistamentos de lebres doentes ou mortas especialmente na região de Bungay, no distrito de Suffolk, na costa leste de Inglaterra.

Embora as publicações anteriores referissem a mixomatose e a doença hemorrágica dos coelhos como possiveis causas de mortalidade no Reino Unido, acautelavam a necessidade de confirmação laboratórial para um diagnóstico definitivo.

O Jornal *Independent* divulga agora que as lesões macroscópicas, evidenciadas nas fotografias enviadas para a *Universidade of East Anglia*, sugerem que os animais mortos tenham sido vitimizados pelo **vírus da mixomatose**.

A revista Halestead Gazette reportou também, a **18 de outubro**, o primeiro caso de mortalidade de Lebre Castanha Europeia (*Lepus europaeus*) verificada perto da cidade de Halstead (condado de Essex, localizado a sul do condado de Suffolk), atribuído também a mixomatose.
O potencial impacto deste surto nas populações de lebres da costa oriental de Inglaterra é visto com grande apreensão uma vez que estas populações são atualmente residuais, comparativamente às densidades que se verificaram no passado. Qualquer epizootia grave pode, portanto, levar ao desaparecimento rápido da Lebre Europeia naquelas regiões.

A Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos e a Mixomatose são doenças de Declaração Obrigatória para OIE (Organização Mundial para a Saúde Animal). Enquanto se aguardam os resultados laboratoriais oficiais, os dados epidemiológicos preliminares e as lesões macroscópicas observadas pelos operadores no terreno, e registadas em fotografias, apontam para que a mortalidade de Lebres em Inglaterra seja também devida a mixomatose.

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido

A confirmar-se, a ocorrência de mortalidade notória em **Lebre** causada por mixomatose, em dois países geograficamente separados (Espanha e Reino Unido), num intervalo temporal relativamente curto (4 meses), sugerem a que o vírus da mixomatose **possa ter alargado o seu espectro de hospedeiros**, adquirindo a capacidade de infetar duas espécies de Lebre (*Lepus granatensis e Lepus europaeus*) com a facilidade com que infeta o coelho. Estes registos recentes contrastam com a rara observação de mixomatose em Lebres, desde a sua emergência no final do século IXX.

Enquanto as causas de mortalidade de Lebres são definitivamente esclarecidas, reforçamos a importância do cumprimento das recomendações, listadas na Notícia 36.

Entre elas, destacamos a necessidade de **intensificação da vigilância ativa** das Zonas de Caça, através da **prospeção de lebres e coelhos-bravos doentes, moribundos ou já cadáver**, a **recolha** destes animais para que não constituam fontes de infeção para animais saudáveis (sempre no cumprindo os procedimentos de higiene e biossegurança recomendados), e o seu **envio** para os Laboratórios de Referência do INIAV (Oeiras).

Reforçamos o pedido de **alerta imediato ao Grupo de Trabalho +Coelho** (maiscoelho@iniav.pt) sempre que houver evidências de presença de lebres e coelhos doentes ou mortos no campo e agradecemos desde já a todos o esforço acrescido que possam dispensar a este assunto.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 49
23 outubro 2018

Informações das atividades do GT +Coelho

Esclarecimentos sobre o artigo publicado no Correio da Manhã a 22 de outubro, anunciando a criação de coelhos geneticamente modificados, resistentes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

O Grupo +Coelho foi repetidamente contactado para esclarecimentos relativamente ao conteúdo de um artigo publicado ontem (22 de outubro de 2018, diário Correio da Manhã) dando conta que as autoridades sanitárias da ilha de Maiorca (Baleares), em Espanha, divulgaram a libertação e consequente sobrevivência de 200 coelhos-bravos **geneticamente modificados** para serem **resistentes à febre hemorrágica viral dos coelhos (DHV)**.
De acordo com esta notícia, o património genético destes animais teria sido manipulado por investigadores espanhóis, por forma a apresentarem uma elevada taxa de sobrevivência à infeção pelo vírus.

Paulo Célio Alves, investigador do CIBIO-InBIO/Universidade do Porto e Parceiro do Projeto +Coelho, especialista em Ecologia Molecular, Genética e Gestão de Mamíferos, contactou diretamente **Rafael Villafuerte Fernandez**, investigador do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e do Instituto de Estudios Sociales Avanzados (IESA-CSIC), que colabora nos projetos que vêm sendo realizados na recuperação das populações de coelho-bravo em Maiorca (Ilhas Baleares).

O investigador Espanhol esclareceu que a **notícia não corresponde ao que está a ser realizado em Espanha e que terá resultado de uma interpretação errada da informação transmitida.** Desde logo, a notícia sobre as Baleares não foi difundida pelas autoridades sanitárias, uma vez que se trata de um estudo realizado pelo Serviço de Caça de Maiorca. Acresce que não foram “manipulados”, nem “criados”, coelhos geneticamente imunes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos mas, na verdade, **utilizados animais com elevados títulos de anticorpos, provenientes de populações de elevada densidade, resultantes da criação e**

manutenção de núcleos de elevada densiadade, em condições controladas. A proteção imunológica de grande parte da população resultou naturalmente numa maior taxa de sobrevivência à infeção. Esta medida de gestão proposta pelo grupo liderado por este investigador tem sido aplicada em numerosas regiões de Espanha desde 2000.

Esclarecimentos sobre o artigo publicado no Correio da Manhã a 22 de outubro anunciando a criação de coelhos geneticamente modificados, resistentes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

Esclarecemos, portanto, que a notícia publicada no Correio da Manhã não reproduz o que está a ser feito em Espanha.

Os dados obtidos demonstram, porém, a importância de se avaliar os níveis de imunidade das populações naturais de coelho-bravo, bem como a manutenção de núcleos populacionais de elevada densidade, como forma de otimização da gestão.

A noticia refere ainda que, em Portugal, a doença está presente em cerca de 10 a 20% dos coelhos-bravos, nos distritos de Lisboa, Setúbal, Évora e Santarém, segundo o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Esclarecemos que estes **valores de prevalência do vírus da DHV não foram providenciados por investigadores ou técnicos do INIAV,** conforme se lê na notícia. Com efeito, nas suas inúmeras intervenções e na informação disponibilizada no *site* do INIAV, o Grupo de Trabalho +Coelho tem revelado as percentagens de imunidade das populações amostradas ao RHDV2, bem como as percentagens de positividade a RHDV2 e ao vírus da mixomatose **nas amostragens de coelhos caçados e nos cadáveres encontrados no campo**. Ou seja, esta trata-se de uma percentagem de positividade **aparente**, condicionada a uma amostragem oportunística, limitada por vários fatores (tais como mortalidade nas tocas, necrofagia, não deteção dos cadáveres nas prospeções ativas devido à vegetação, recolha e disponibilização limitada dos cadáveres para análise sanitária, etc.), e, por isso, não aleatória. Acresce que, uma vez que **não há informação sobre as densidades populacionais de coelho-bravo na grande maioria dos distritos de Portugal e que a deteção de animais mortos é condicionada por vários fatores, não é possível inferir-se ainda com precisão a percentagem de positividade real (prevalência real)** dos vírus da mixomatose e da DHV na população de leporídeos, quer à escala regional, quer à escala nacional.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto “+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral” financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 50
29 outubro 2018

Participação do CCEGSECB na Conferência "Caça e Alimentação" que decorreu a 27 de outubro de 2018, no âmbito da IX edição da Feira de Caça de Mértola.

Mónica Vieira Cunha, investigadora do INIAV, IP e investigadora co-responsável do projeto +Coelho, representou o *Centro de Competências para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade* (CCEGSECB) na Conferência "Caça e Alimentação", organizada conjuntamente pela Câmara Municipal de Mértola, o Campo Arqueológico de Mértola e a Associação de Empresários de Mértola, que decorreu no dia 27 de outubro de 2018, no âmbito da IX edição da Feira da Caça de Mértola. A Feira de Caça, com muitas atividades na área cinegética e também culturais, decorreu no pavilhão desportivo de Mértola, tendo registado, uma vez mais, uma grande afluência de público.



À esquerda*: vista de um dos pavilhões da feira com exposição de armas e vestuário de caça. Em baixo: Inauguração da IX edição da Feira da Caça de Mértola por Jorge Rosa (Presidente da Câmara Municipal) e Pedro do Carmo (Deputado do PS à Assembleia da República, eleito pelo círculo eleitoral de Beja).*



A conferência "Caça e Alimentação" iniciou-se na manhã de 27 de outubro, com o painel "A Caça na História", no qual interviram Virgílio Lopes (Campo Arqueológico de Mértola), Maria de Fátima Palma, Marta Moreno (Centro de Ciencias Humanas y Sociales) e Carlos Pimenta (da Direção Geral de Património Cultural). Seguiu-se, depois do almoço, o painel "Caça, Alimentação e Economia", no qual foram discutidas as potencialidades turísticas e socioeconómicas da carne de caça e o potencial papel do CCEGSECB na estruturação, dinamização e promoção da respetiva cadeia de valor.

Participação do CCEGSECB na Conferência "Caça e Alimentação" que decorreu a 27 de outubro de 2018, no âmbito da IX edição da Feira de Caça de Mértola.

Do Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade, interviram Mónica Cunha e, ainda, João Carvalho (secretário-geral da ANPC) e Mário Quaresma (Professor Auxiliar da FMV-UL), com comunicações orais dedicadas ao valor ecológico, nutricional e económico da carne de caça, bem como aos constrangimentos organizacionais e sanitários associados. Neste contexto, foi também discutida a missão do Centro de Competências que, entre muitos outros objetivos e áreas de intervenção, visa a promoção da atividade cinegética sustentável, o desenvolvimento rural e a valorização e promoção dos produtos da caça.



João Carvalho, Ricardo Paiva, Mónica Cunha e Mário Quaresma na sessão de abertura do Painel "Caça, Alimentação e Economia".

Estiveram ainda em debate as questões relacionadas com o Turismo Gastronómico da carne de caça e a certificação de espécies cinegéticas, com intervenções de Miguel Sottomayor (Universidade Católica Portuguesa), Paulo Célio (CIBIO Universidade do Porto) e Fernando Completo (Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril). A sessão foi moderada por Ricardo Paiva (INIAV, IP), tendo o encerramento sido realizado por Rosinda Pimenta (Vereadora da Câmara Municipal de Mértola), que teceu diversas considerações sobre a importância deste setor para o desenvolvimento e valorização dos territórios do interior.





REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 51
15 outubro 2018

No âmbito da vigilância sanitária das populações de leporídeos na época venatória 2018/2019, uma das medidas do projeto +COELHO que permite conhecer a prevalência amostral da Doença Hemorragica Viral dos Coelhos e da Mixomatose nas populações silvestres, procedeu-se a mais uma colheita de sangue e orgãos em especimens caçados na Zona de Caça Turística de Alcaria Ruiva, Concelho de Mértola, Distrito de Beja, pelos associados da FENCAÇA.



Helena Gregório (Caçadora) e Imideo Oliveira (Caçador e Gestor de Caça).

*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em **Alcaria Ruiva**, concelho de Mértola, a 27 de outubro de 2018.*

Este ato venatório, que decorreu no passado dia 27 outubro, foi dedicado também à caça de perdiz. Também nesta Zona de Caça foi possível constatar que alguns coelhos-bravos apresentavam parasitismo por ténias.



*Colheita de Material Biológico para a Epidemiovigilância das Populações de Leporídeos, em **Alcaria Ruiva**, concelho de Mértola, a 27 de outubro de 2018.*

As colheitas foram efetuadas pelos Técnicos da FENCAÇA, Eng. Jorge Santos e Engª Ana Perdigão.





Caçadores no final da jornada de caça. Em cima: Paulo Corçeiro (esquerda) e Lourenço Nogueiro (centro) e Agostinho Ribeiro (direita). Em baixo: José Pintalhão, Ascendino Vasconcelos, Arlindo Cunha e Orlando Romano.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 52
5 novembro de 2018

Grupo de Trabalho +Coelho e Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) na Comemoração dos 25 anos da CNCP, inserida na 17ª edição da Feira Internacional do Norte, em Bragança.

O grupo de trabalho +Coelho participou na Sessão Solene de Comemoração dos 25 anos da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP), liderada pelo Eng. Fernando Castanheira Pinto, Presidente da CNCP.

O evento decorreu em Bragança, no dia 02 de novembro de 2018, inserido na 17º Feira Internacional do Norte – Norcaça, Norpesca & Norcastanha, a qual promove, ao longo de quatro dias, o património natural, social e cultural daquela região do norte de Portugal, incluindo os três produtos emblemáticos desta época na região: a caça, a pesca e a castanha.

A Sessão Comemorativa contou com a presença do Secretário de Estado das Florestas e Desenvolvimento Rural, Eng. Miguel Freitas, e do Presidente da Câmara de Bragança, Dr. Hernâni Dias, que interviram nas Cerimónias de Abertura e de Encerramento.



Hernâni Dias, Miguel Freitas e Castanheira Pinto na Sessão de Abertura da Comemoração dos 25 anos da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP).

Grupo de Trabalho +Coelho e Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) na Comemoração dos 25 anos da CNCP, inserida na 17ª edição da Feira Internacional do Norte, em Bragança.

Estiveram também presentes o Presidente do INIAV IP, Doutor Nuno Canada, o Diretor Geral de Alimentação e Veterinária, Prof. Fernando Bernardo, o Presidente do ICNF, Eng. Rogério Rodrigues, que dirigiram ao público discursos alusivos à efeméride, realçando o papel da CNCP e das outras organizações do setor (FENCAÇA e ANPC) ao serviço da caça, incluindo na divulgação da aliança entre caça/gestão cinegética e a proteção da natureza e da biodiversidade.



José Gonçalves – Vice-presidente da Assembleia Geral da CNCP, Jacinto Amaro, Nuno Canada, Rogério Rodrigues, Fernando Bernardo e João Carvalho.



André Cid, da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior (FCPBI), a receber das mãos de Nuno Canada, Presidente do INIAV, o louvor atribuído à FCPBI.

Grupo de Trabalho +Coelho e Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) na Comemoração dos 25 anos da CNCP, inserida na 17ª edição da Feira Internacional do Norte, em Bragança.

Estiveram representadas outras entidades públicas e privadas, a academia, e as federações de caça afiliadas na CNCP. Foram homenageadas várias entidades ligadas ao mundo da investigação (UTAD e CIBIO) e comunicação no setor (Revista Caça e Cães de Caça), bem como entregues louvores a várias individualidades.

A convite da CNCP e em representação do CCEGSECB, a investigadora do INIAV IP, Mónica Vieira Cunha, realizou uma apresentação de 15 minutos sobre o Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) e a sua missão focada na promoção do desenvolvimento da fileira da caça.



Apresentação da missão, objetivos, governança e áreas de intervenção do CCEGSECB por Mónica Vieira Cunha (investigadora do INIAV IP e do Grupo de Trabalho +Coelho).

Este Centro de Competências recentemente constituído pretende estimular estudos, estratégias de intervenção e ações prioritárias específicas dirigidas às espécies cinegéticas do quadro venatório nacional, visando a exploração sustentada dos recursos cinegéticos, o equilíbrio ecológico no território nacional, o desenvolvimento rural e a valorização dos produtos da caça. Foram também amplamente discutidos os desafios que o setor hoje enfrenta e reforçada a necessidade de promover a imagem da atividade da caça e do caçador perante a sociedade-civil e o mundo urbano.

Grupo de Trabalho +Coelho e Centro de Competências para o Estudo, Gestão, e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB) na Comemoração dos 25 anos da CNCP, inserida na 17ª edição da Feira Internacional do Norte, em Bragança.

Esta sessão solene contou com a presença de dezenas de pessoas, entre dirigentes, aficionados da caça e familiares dos homenageados.





Auditório do NERBA, onde decorreu a 17ª Feira Internacional do Norte, durante a Sessão Solene da CNCP.

Associada a este certame, decorreu em simultâneo a semana gastronómica alusiva aos produtos cinegéticos, piscícolas e à castanha, durante a qual os visitantes puderam degustar os pratos típicos da região feitos à base destes produtos.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 53
5 novembro 2018

Súmula dos resultados da pesquisa do Vírus da Mixomatose na amostragem de leporídeos recolhida no 1º ano de Projeto (agosto 2017 - agosto 2018) e disponibilização dos resultados preliminares do 2º ano de Projeto, obtidos nos meses de setembro e outubro de 2018

No âmbito da vigilância sanitária das populações de coelho-bravo e lebre, desenvolvida pelo Grupo de Trabalho +Coelho, foram testados durante a época venatória de 2017/2018, 913 leporídeos silvestres (104 cadáveres de coelho-bravo, 1 cadáver de lebre Ibérica, 707 coelhos-bravos caçados e 79 lebres caçadas) cujas amostras biológicas foram recolhidas pelos técnicos das Organizações do Setor da Caça (FENCAÇA, ANPC e CNCP), por gestores e caçadores, e pontualmente, por privados.

Estas análises laboratoriais, baseadas em testes moleculares extremamente sensíveis e específicos, são realizadas no Laboratório de Virologia do INIAV I.P., em Oeiras, onde se situam os Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal.

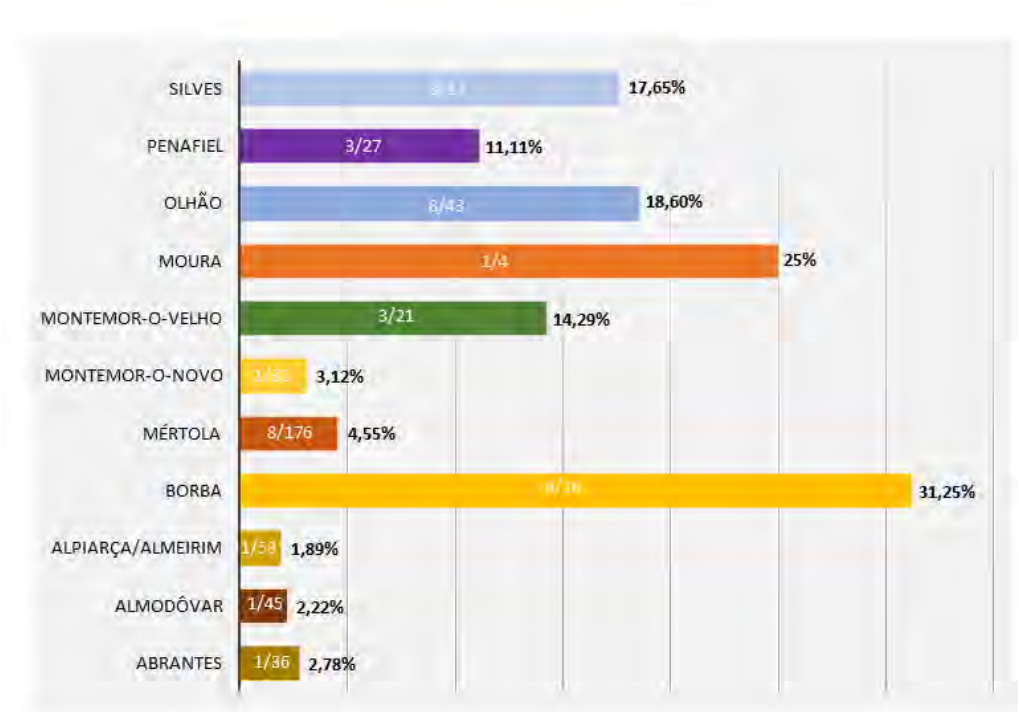


Médicas Veterinárias Carina Carvalho (Bolseira Doutorada) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV e Co-Cordenadora do Projeto +Coelho), no Laboratório de Virologia da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal do INIAV, em Oeiras.

Súmula dos resultados da pesquisa do Vírus da Mixomatose na amostragem de leporídeos recolhida no 1º ano de Projeto (agosto 2017-agosto 2018) e disponibilização dos resultados preliminares do 2º ano de Projeto, obtidos nos meses de setembro e outubro de 2018

As percentagens de positividade a mixomatose nas amostragens obtidas no primeiro ano do Projeto +Coelho foram de 4,95% (35/707) em todos os animais caçados na época venatória de 2017/2018 e de 7,69% (8/104) em todos os cadáveres recolhidos no campo entre 1 agosto de 2017 e 31 de agosto de 2018. Estes animais positivos a mixomatose provieram dos distritos de Beja (concelhos de Almodôvar, Mértola, Moura e Odemira), Coimbra (concelho de Montemor-o-Velho), Évora (concelhos de Alandroal, Borba e Montemor-o-Novo), Faro (concelhos de Alcoutim, Olhão e Silves), Porto (Concelho de Marco de Canaveses e Penafiel) e Santarém (concelhos de Abrantes, Alpiarça, Almeirim e Santarém).

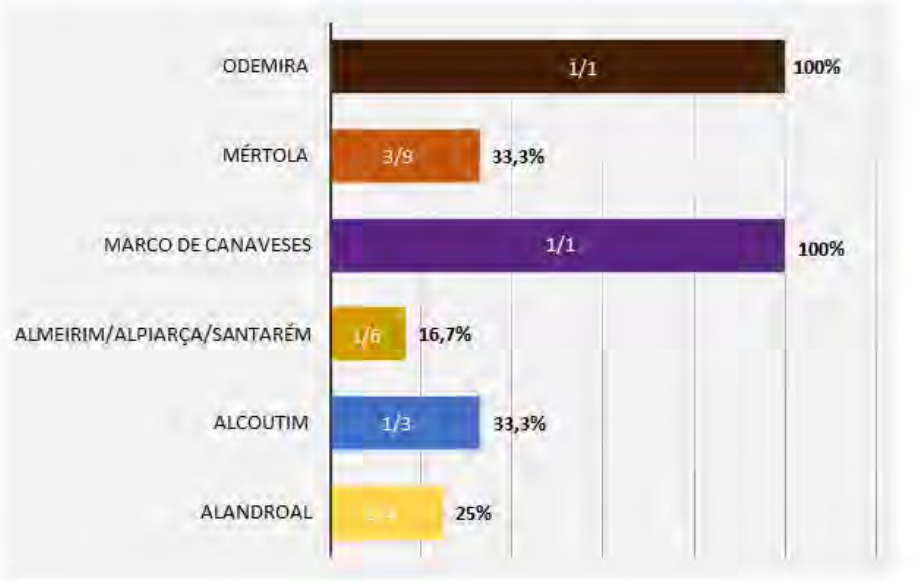
Prevalência amostral a mixomatose em coelho-bravo (*O. cuniculus*) caçado na época venatória 2017/2018, por concelho



Além dos concelhos aqui representados, onde se verificaram casos positivos a mixomatose, foram também amostrados os concelhos de Alcoutim, Amarante, Arcos de Valdevez, Benavente, Castelo Branco, Covilhã, Estremoz, Ferreira do Alentejo, Marco de Canaveses, Mogadouro, Montalegre, Odemira, Pombal, Ponte de Sôr, Póvoa de Varzim, Sabugal, Serpa e Vila Viçosa, onde não foram detetados animais positivos.
As frações sobre as barras representam o número de animais positivos sobre o número de animais testados no concelho respetivo.

Súmula dos resultados da pesquisa do Vírus da Mixomatose na amostragem de leporídeos recolhida no 1º ano de Projeto (agosto 2017-agosto 2018) e disponibilização dos resultados preliminares do 2º ano de Projeto, obtidos nos meses de setembro e outubro de 2018

Prevalência amostral a mixomatose em cadáveres de coelho-bravo (*O. cuniculus*) encontrados no campo, entre 1 de agosto de 2017 e 31 de Agosto de 2018, por concelho



Além dos concelhos representados, foram recebidos cadáveres de coelho-bravo oriundos dos concelhos de Avis, Alcácer do Sal, Alpiarça, Benavente, Borba, Castelo Branco, Chamusca, Estremoz, Évora, Ferreira do Alentejo, Loures, Mação, Montemor-o-Novo, Montemor-o-Velho, Mora, Póvoa de Varzim, Penafiel, Portel, Serpa, Soure, onde não foram detetados animais positivos a mixomatose. As frações sobre as barras representam o número de animais positivos sobre o número de animais testados no concelho respetivo.

No que se refere à **época venatória atual (2018/2019)**, foram testados à data, 65 leporídeos silvestres (61 animais caçados, e três coelhos e uma lebre encontrados mortos), oriundos dos distritos de Castelo Branco (n=1), Santarém (n=1), Beja (n=18) e Évora (n=45).

Até ao momento, 5 dos 61 animais caçados (8,19%) e 2 dos 4 cadáveres testados, foram positivos a mixomatose. **Os 5 coelhos-bravos caçados positivos a este vírus foram oriundos do distrito de Évora, concelho de Estremoz, onde se verificou uma percentagem de positividade de 21,7% (5/21).** É de notar que durante o primeiro ano do Projeto +Coelho não foi detectado qualquer animal positivo a mixomatose neste concelho. Os dois cadáveres positivos foram recolhidos no concelho de Mértola (distrito de Beja) e de Castelo Branco (distrito de Castelo Branco). Neste último, não tinham ainda sido detectados animais positivos.

Súmula dos resultados da pesquisa do Vírus da Mixomatose na amostragem de leporídeos recolhida no 1º ano de Projeto (agosto 2017-agosto 2018) e disponibilização dos resultados preliminares do 2º ano de Projeto, obtidos nos meses de setembro e outubro de 2018

Numa altura em que, em vários países da Europa, tem vindo a ser noticiada a ocorrência de mortalidade em lebre por mixomatose, e face aos testemunhos de gestores de algumas Zonas de Caça sobre o aumento de casos desta doença em coelho-bravo e ao aumento aparente da positividade amostral verificada no âmbito do Projeto +Coelho nesta época venatória, **recomenda-se o reforço da prospeção ativa de animais doentes e de cadáveres, as suas recolhas e subsequente o envio para as instalações do INIAV, em Oeiras**, por forma a minimizar-se as fontes de infeção e, deste modo, reduzir-se a disseminação do vírus a animais saudáveis nas áreas afetadas e nas áreas geográficas vizinhas.

O Grupo + Coelho solicita que, **caso não seja possível o envio destes cadáveres ou animais doentes para o INIAV, seja enviado um e-mail para o maiscoelho@iniav.pt, a fim de se agilizar a sua recolha.**

A mixomatose, doença de origem viral causada por um *Leporipoxvirus*, pode apresentar-se em **duas formas clinicas distintas**, nomeadamente uma **forma cutânea e uma respiratória**, não estando nesta última presentes os característicos mixomas (tumores cutâneos), muito embora se possa observar edema das regiões sem pêlo (pálpebras, vulva, anus), e ocorrer rinite (infeção dos seios nasais) e blefaroconjuntivite (infeção das palpebras e da conjuntiva).



REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliaç ções Naturais de Coelho-Bravo
Visando o Controlo da Doenç financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.*

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 54
8 novembro 2018

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

No âmbito do Projeto +Coelho e do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos foi constituída, no último trimestre de 2017, uma rede de epidemiovigilância e uma rede de recolha de material biológico de coelho e lebre com distribuição nacional.

A **epidemiovigilância ativa e passiva**, que assenta na colheita de amostras de animais caçados e na recolha de animais encontrados mortos no campo para diagnóstico laboratorial, é essencial para se conhecer o **estado sanitário das populações de coelho-bravo e de lebre**, para monitorizar a incidência da nova variante do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) e do vírus da mixomatose, para **mapear a distribuição destes agentes no território nacional**, bem como para estimar a mortalidade de leporídeos associada à infeção por agentes patogénicos virais. Esta vigilância sanitária é essencial para se conhecer e caracterizar a situação no terreno e para que se possam adotar medidas de controlo sanitário, imunoprofiláticas (vacinação, em particular em centros de reprodução) e de biossegurança, adequadas às zonas onde estes vírus circulam.



Colheita de material biológico de coelho após ato venatório

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

Aproveitando a época venatória 2018/2019 para a colheita de material biológico de leporídeos em ato venatório e reforçando a necessidade de se proceder à recolha de cadáveres encontrados no campo, disponibilizamos por esta via (no final desta notícia), uma vez mais, o **protocolo de colheita de material biológico** e o **mapa do território continental com os locais onde podem ser entregues as amostras**. Nos 19 centros de recolha atualmente disponíveis, os espécimes são congelados até à sua entrega nos Laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal, no INIAV.

As **amostras de baço, fígado, sangue e duodeno de coelho e lebre deverão ser recolhidas seguindo os procedimentos de higiene e biossegurança**, de acordo com a metodologia publicada e utilizando-se para o efeito os **kits preparados e disponibilizados pelo INIAV** às Organizações do setor da Caça de 1º nível e as Federações regionais. Os kits de recolha também podem ser solicitados diretamente ao INIAV.



Kits de recolha de material de animal caçado (em cima e em baixo, à esquerda) e de cadáver (em baixo, à direita) distribuídos no âmbito do Projeto +Coelho.

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

No que se refere aos cadáveres encontrados no campo, e caso não existam disponíveis kits de recolha do Projeto +Coelho, deve proteger-se a mão usando uma luva descartável (ou um saco de plástico), e recolher-se o cadáver para o interior de um saco de plástico. Este deverá ser encerrado com um nó e colocado dentro de um outro saco, juntamente com a luva ou com o saco que serviu de luva, e uma ficha de identificação da amostra, descarregada previamente do site do INIAV e devidamente preenchida. Na impossibilidade de descarregar essa ficha, a informação relevante (data e local da recolha, nome e contacto da pessoa) deve ser registada num papel.

A **observação de animais doentes ou cadáveres deve ser reportada de imediato** ao Grupo de Trabalho +Coelho **(maiscoelho@iniav.pt)**. Os cadáveres devem ser sempre recolhidos por forma a não constituírem fonte de infeção para outros animais.

Em Zonas de Caça **onde se verifique mortalidade, é essencial que não se movimentem animais** (quer por capturas, translocações ou repovoamentos), mesmo que aparentemente saudáveis, por forma a evitar-se uma possível propagação do(s) agente(s) responsável(eis) por doença transmissível em coelhos e lebres.

Considerando as notícias recentes de intensificação da circulação destes agentes virais em coelho e, agora, também em lebre, adverte-se para a necessidade efetiva de **intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória**, sobretudo no que diz respeito à **prospeção de animais doentes e de cadáveres** no terreno.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

5 PONTOS DE ENTREGA (dias úteis)



1 – Oeiras - INIAV - Sede - *Campus* Oeiras
Av. da República, Quinta do Marquês | 2780 - 157 OEIRAS
Tel.: 214 403 500
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: maiscoelho@iniav.pt ; margarida.duarte@iniav.pt

2 – Vairão - INIAV- Laboratório Nacional de Referência de Segurança Alimentar
Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena
4485-655 Vairão - VILA DO CONDE | Tel.: 252 660 600
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: zulmira.lopes@iniav.pt; monica.cunha@iniav.pt

3 – Évora - Laboratório de Veterinária de Évora
Quinta do Pomarinho - Estrada das Alcaçovas, Km9
7000-090 ÉVORA | Tel.: 266 752 028
Contacto: patricio.nuncio@iniav.pt

4- Coruche - FENCAÇA
Rua 25 de Abril, Lote 20, Cave B, 2100-126 CORUCHE| Tel.:243675519
Contactos: sede@fencaca.pt; presidente@fencaca.pt

5 - Terras de Bouro –ICNF- Parque Nacional da Peneda Gerês
Centro de Educação Ambiental do Vidoeiro, Lugar do Vidoeiro, 99
4845-081 GERÊS | Tel.: 253 390 110
Horário: preferencialmente entre as 10:00 – 17:00
Contacto: lino.goncalves@icnf.pt

6 - Vila Real – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Norte
Centro de Informação e Interpretação do Parque Natural do Alvão
Largo dos Freitas | 5000-528 VILA REAL | Tel.: 259 302 830
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contactos: albertina.rosa@icnf.pt ; paula.duarte@icnf.pt

7 - Bragança – ICNF-Sede do Parque Natural de Montesinho
Parque Florestal | 5300-000 BRAGANÇA | Tel.: 273 329 135
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: jose.rosa@icnf.pt

8 - Bragança –ICNF- Delegação do Parque Natural do Douro Internacional
Av. Do Sabor, 49-1º | 5200-204 Mogadouro |Tel.: 279 341 596
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: susana.marques@icnf.pt

9- Viseu-ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Quinta do Soqueiro, Rua Cónego António Barreiros | 3500-093 VISEU
Tel.: 232 427 510
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: isabel.rodrigues@icnf.pt

10 - Manteigas –ICNF- Parque Natural da Serra da Estrela
Rua 1.º de Maio, 2 | 6260-101 MANTEIGAS |Tel.: 275 980 060
Fax: 275 980 069
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: antonio.borges@icnf.pt

11 - Sabugal – ICNF-Reserva Natural da Serra da Malcata
Centro de Educação Ambiental da Sra. da Graça,
Bairro da Sra. da Graça | 6320-052 Aldeia de Sto. António – SABUGAL
Tel.: 271 754 425 | Fax: 271 752 825
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: laura.saloio@icnf.pt

12 - Coimbra –ICNF- Mata Nacional do Choupal
3000-611 COIMBRA | Tel.: 239 855 660 | Fax: 239 855 699
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: pedro.ramalheira@icnf.pt

13 - Castelo Branco – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Av. do Empresário, Praça NERCAB | 6000-767 CASTELO BRANCO
Tel.: 272 348 140 | Fax: 272 000 503
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: celia.teixeira@icnf.pt

14 - Santarém – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas de Lisboa e Vale do Tejo
Cnema, Quinta das Cegonhas, Aparatado 59 | 2001-901 Santarém
Tel.: 243 306 530
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: luis.silva@icnf.pt

15- Portalegre- ICNF- Sede do Parque Natural da Serra de São Mamede
Rua Augusto César de Oliveira Tavares, 23-r/c| 7300-126 PORTALEGRE
Tel.: 245 309 189
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: rui.correia@icnf.pt

16 - Vila Nova de Santo André – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Passeio da Fraternidade, Bairro Azul, Coletiva C4, r/c Dto. - Apartado 98 | 7500-100 VILA NOVA DE SANTO ANDRÉ
Tel.: 269 708 400
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contacto: duarte.nuno@icnf.pt

17 – Beja – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
R. de S. Sebastião - Apartado 6121 | 7801-908 BEJA
Tel.: 284 311 500 - Fax: 284 389 544
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: raquel.ventura@icnf.pt

18 - Mértola –ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Parque Natural do Vale do Guadiana, R. D. Sancho II, 15 | 7750-350 MÉRTOLA
Tel.: 286 612 016 | Fax: 286 610 099
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: teresa.silva@icnf.pt

19- Olhão - Quelfes – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Algarve
Centro de Educação Ambiental de Marim – Quelfes | 8700-194 OLHÃO |Tel.: 289 700 210
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: nuno.grade@icnf.pt

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS EM PORTUGAL
(Despacho nº 4757/2017 de 31 de Maio)

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA PARA EXAME VIROLÓGICO E SEROLÓGICO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS LEPORÍDEOS

REMETENTE

Nome:

Contacto (telefone/telemóvel): E-mail:

Caçador: Gestor: Guarda: Outro:

LOCAL

Localidade:

Freguesia: Concelho: Distrito:

Coordenadas GPS: Latitude Longitude

Zona de Caça: Número Nome

Tipo de Zona de Caça: Associativa Municipal Turística Nacional Outro local:

INFORMAÇÃO SOBRE O CADÁVER ENCONTRADO / ANIMAL CAÇADO

Data de recolha da amostra:

Identificação do cadáver (Código da Zona de Caça | Número de cadáver):

Espécie: Coelho-bravo Coelho doméstico Lebre

Género: Macho Fêmea Faixa Etária: Adulto Juvenil

Ocorrência: Encontrado Morto Caçado Atropelado Outra situação:

Material colhido: Cadáver Caçado: Fígado Baço Sangue Duodeno Fezes

Presença de: Sangue nos orifícios naturais Sinais de mixomatose (edema, mixomas)

Presença de Parasitas: Pulgas Carraças Ténias Cisticercos (vesículas na cavidade abdominal)

Nemátodos (lombrigas) Manchas brancas no fígado Manchas brancas na superfície do intestino

Observou a presença de outros cadáveres? Não Sim Quantos?

Outras observações:

Data de preenchimento do formulário:

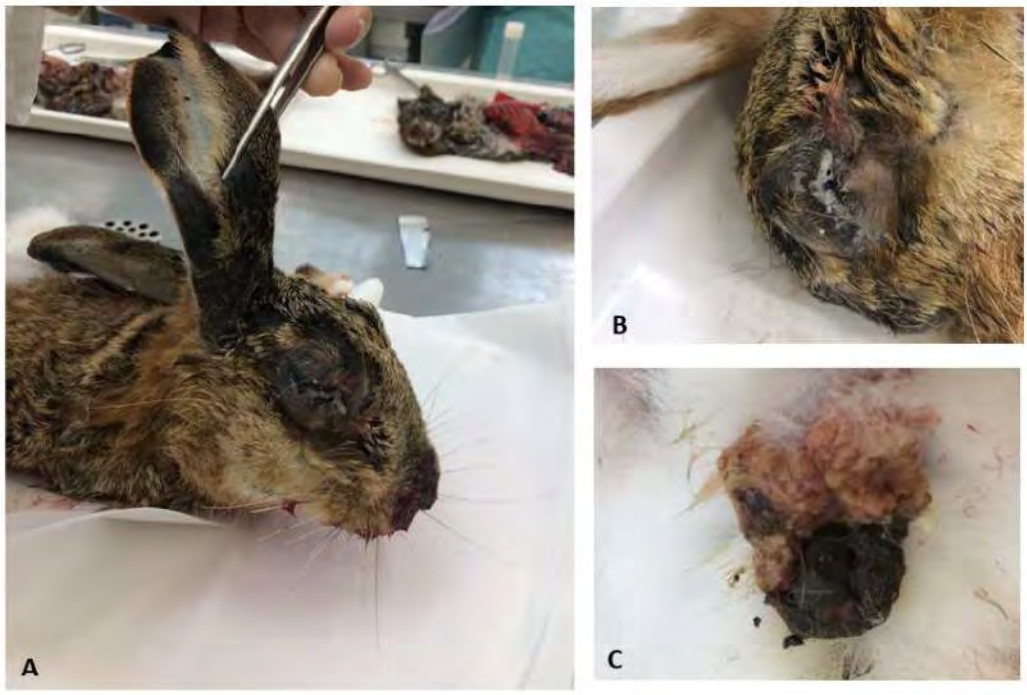
Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 55
8 novembro 2018

Detectado o primeiro caso de Mixomatose em Lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

No âmbito da Vigilancia sanitária do Projeto +Coelho, que decorre desde Agosto de 2017, foi ontem confirmado no Laboratório de Virologia do INIAV I.P., em Oeiras, por testes moleculares, o diagnóstico de mixomatose numa lebre caçada, no dia 28 de Outubro de 2018, em zona de caça do concelho de Évora.

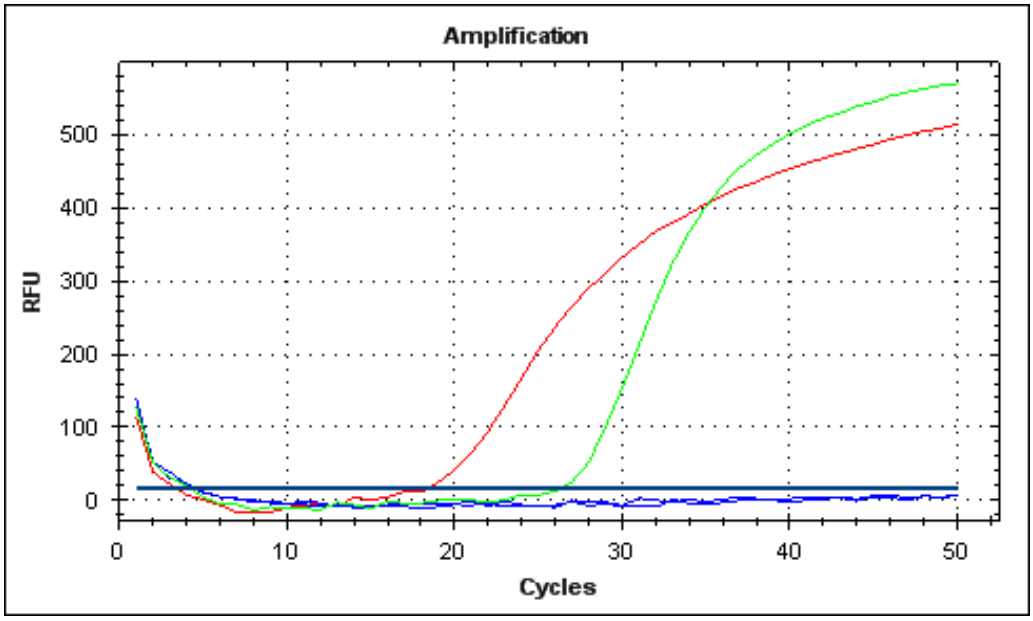
Nessa jornada, foram também caçadas duas lebres aparentemente saudáveis.
O animal em causa, uma fêmea adulta com boa condição corporal, apresentava conjuntivite purulenta, edema das palpebras e da região anal e vulvar.



Necrópsia da Lebre Ibérica recolhida em Évora, na sala de anatomopatologia do INIAV I.P., em Oeiras. **A** e **B** - edema das pálpebras e conjuntivite purulenta bilaterais. **C** - edema da região perineal

Detectado o primeiro caso de Mixomatose em Lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

O diagnótico laboratorial, baseado na amplifcação de um gene localizado em ambos os extremos do genoma viral (M0005R/L), unicamente presente no vírus da mixomatose, permitiu confirmar as suspeitas que as lesões macroscópicas sugeriam.



Traçado do PCR em tempo real do diagnóstico molecular de mixomatose, realizado nos mixomas da lebre ibérica (curva a vermelho). As curvas a verde e a azul correspondem respetivamente ao controlo positivo e aos controlos negativos do ensaio.

Trata-se, pois, do primeiro caso de mixomatose em Lebre Ibérica (*Lepus granatensis*) em Portugal, confirmado em laboratório. A doença já tinha sido amplamente reportada em Lebre Ibérica em Espanha e em Lebre Europeia (*Lepus europaeus*) no Reino Unido.

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, que não tem importância para a saúde pública. A doença foi notificada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), autoridade nacional para as doenças dos animais.

O grupo +Coelho e a DGAV, recomendam e por isso o **reforço das medidas de vigilância, nomedamente da propeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nas Zonas de Caça do concelho de Évora**.

Detectado o primeiro caso de Mixomatose em Lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

Os **cadáveres de lebres devem ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do projeto +Coelho** ou devem **ser eliminados através de enterramento**, após cobertura com **cal viva**, ou encaminhados para **unidade de tratamento de subprodutos** aprovada.

Importa ainda reforçar a adoção de medidas de higiene e de prevenção da transmissão desta doença, nomeadamente a **desinfeção do calçado, dos equipamentos (incluindo bebedouros) e das rodas dos veículos** nas zonas de caça, bem como a evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico para evitar contaminação de solos.

Aconselha-se ainda, sempre que possível, **o controlo de vetores**, sendo neste momento **desaconselhada a suplementação de alimento**, como forma de desfavorecer a proximidade entre animais.

É também **desaconselhada a movimentação** (captura, translocação, repovoamento) de **lebres e de coelho bravo, provenientes da área afetada** (concelho de Évora).

O Grupo +Coelho e a DGAV alertam ainda para a importancia de não se introduzir no território nacinal, coelhos bravos e lebres oriundas de outros Estados Membros sem a respetiva certificação sanitária.



REPÚBLICA PORTUGUESA

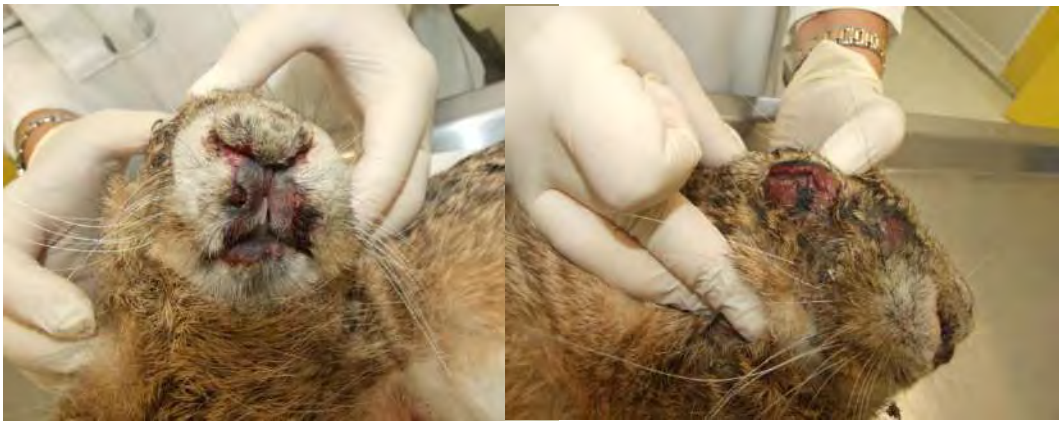
Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 56
14 novembro 2018

Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

Confirmámos recentemente o **diagnóstico positivo a mixomatose numa lebre encontrada morta**, em zona de caça do concelho de Beja, no dia 3 de novembro de 2018.

O macho adulto, com boa condição corporal, apresentava conjuntivite e lesões nodulares nas pálpebras e focinho.



Exame externo de um exemplar da lebre Ibérica recolhido em Beja. **A-** Edema dos lábios e focinho **B** - Edema e inflamação das pálpebras

Este é o segundo caso de mixomatose em lebre Ibérica (*Lepus granatensis*) em Portugal, confirmado no laboratório de Referência para a Saúde Animal (INIAV, I.P.). A doença tinha sido recentemente diagnosticada pela primeira vez numa lebre caçada em zona de caça do concelho de Évora.

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, que não tem importância para a saúde pública. A doença nestas duas lebres foi já notificada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), autoridade nacional para as doenças dos animais.

Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

O Grupo de trabalho +Coelho e a DGAV recomendam, na sequência destes casos, o **reforço das medidas de vigilância, nomedamente a propeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nas zonas de caça do concelho de Évora e de Beja**.

Os **cadáveres de lebres devem ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do projeto +Coelho** ou devem **ser eliminados através de enterramento**, após cobertura com **cal viva**, ou encaminhados para **unidade de tratamento de subprodutos** aprovada.

Importa ainda reforçar a adoção de medidas de higiene e de prevenção da transmissão desta doença, nomeadamente a **desinfeção do calçado, dos equipamentos (incluindo bebedouros) e das rodas dos veículos** nas zonas de caça, bem como a evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico para evitar contaminação de solos.

Aconselha-se ainda, sempre que possível, **o controlo de vetores**, sendo neste momento **desaconselhada a suplementação de alimento**, como forma de desfavorecer a proximidade entre animais.

É também **desaconselhada a movimentação** (largadas, captura, translocação, repovoamento) de **lebres e de coelho-bravo provenientes das áreas afetadas** (concelhos de Évora e Beja).

O Grupo de Trabalho +Coelho e a DGAV relembram que qualquer introdução em **território nacional de coelhos-bravos ou lebres oriundos de outros Estados Membros** deve obrigatoriamente ser **acompanhada da respetiva certificação sanitária**.

REPÚBLICA PORTUGUESA



Projeto "+COELHO: Avaliação -

Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

Número 57
15 novembro 2018

Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados.

A vigilância sanitária de coelho-bravos e lebres, caçados e encontrados mortos, desenvolvida no âmbito do Projeto +Coelho, tem especial enfoque na doença hemorrágica viral (DHV) e na mixomatose, não obstante a realização de análises bacteriológicas e parasitológicas, particularmente dos animais encontrados mortos, para uma compreensão mais alargada do estatuto sanitário das populações.

Durante o primeiro ano do projeto, foi detectado o vírus da mixomatose em coelhos caçados e encontrados mortos, com percentagens de prevalência amostral de 4,95% e 7,69%, respetivamente (Notícia 53).

Nenhuma das 79 lebres caçadas amostradas na época venatória 2017/2018 foi, contudo, positiva a mixomatose ou a DHV.

No entanto, no decorrer da avaliação sanitária efetuada desde o início da época venatória 2018/2019, detectaram-se, à data, duas lebres positivas a mixomatose (um exemplar caçado e outro encontrado morto).

Nas populações domésticas e nas populações selvagens de coelho europeu, a mixomatose pode apresentar-se em duas formas clínicas. A **forma nodular** é reconhecida pela formação de tumores cutâneos, designados mixomas. Neste tumores, o vírus está presente em grandes quantidades, constituindo o material ideal para diagnóstico.

A mixomatose pode, no entanto, apresentar-se numa **forma respiratória** ou amixomatosa, na qual os tumores cutâneos não estão presentes. Para o diagnóstico desta forma respiratória, caracterizada por dificuldade respiratória devido a edema (acumulação de liquidos) do pulmão, mas na qual também se

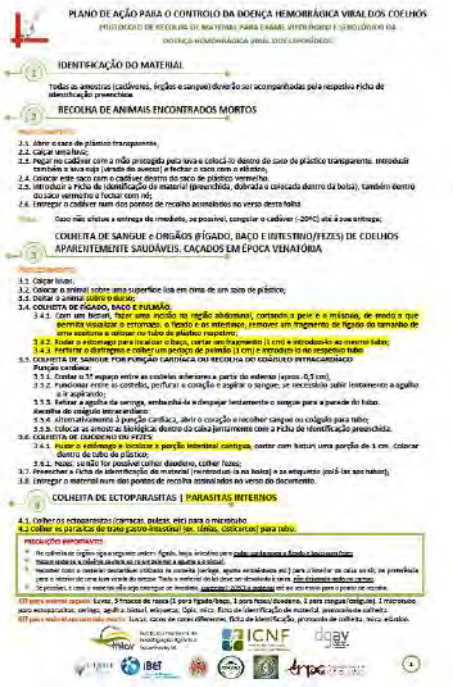
Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados.

pode observar edema das pálpebras, cabeça e orelhas, bem como infeção dos seios nasais (rinite) e da conjuntiva ocular (blefaroconjuntivite), **o pulmão constitui a matriz de eleição para o diagnóstico laboratorial**.

Por esta razão, solicitamos que, **durante a colheita de material biológico de animais caçados, passe também a ser recolhido um fragmento de pulmão, tanto em coelho-bravo, como em lebre, para que a forma respiratória da mixomatose possa vir a ser detectada com maior probabilidade**. Para utilização dos kits que já estão distribuidos nas OSCs, o fragmento de pulmão pode ser recolhido para o tubo destinado a baço e figado, que passa assim a conter fragmentos de 3 orgãos distintos. No futuro, será incluido nos "kits caixa" um tubo adicional para recolha de pulmão.

Aproveitamos para informar que, em função da necessidade de matriz adicional para diagnóstico (pulmão), **o protocolo de colheita foi atualizado** nos pontos assinalados a amarelo:

Comentário [m1]: Fazer link para novo protocolo


PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS

IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

RECOLHA DE ANIMAIS ENCONTRADOS MORTOS

COLHEITA DE SANGUE e ÓRGÃOS (FÍGADO, BAÇO E INTESTINO/FEZES) DE COELHOS APARENTEMENTE SAUDÁVEIS, CAÇADOS EM ÉPOCA VENATÓRIA

COLHEITA DE ECTOPARASITAS | PARASITAS INTERNOS

-

PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 58
23 novembro 2018

Projeto +Coelho e atividade cinegética promovidos, durante a Semana das Ciências, junto dos estudantes da Escola Internacional de Torres Vedras

A convite da Escola Internacional de Torres Vedras (EITV), no passado dia 21 de novembro, Mónica Cunha, Margarida Duarte e Carina Carvalho, investigadoras do INIAV IP e do projeto +Coelho, Fábio Abade dos Santos, estudante de doutoramento da FMV/INIAV, e Sebastião Miguel, gestor cinegético, apresentaram a alunos do 8º ano e alunos do ensino secundário da EITV o projeto +Coelho, o qual visa recuperar as populações naturais de coelho-bravo.







Grupo de trabalho +coelho na EITV durante a nota introdutória e as atividades de demonstração.

Projeto +Coelho e atividade cinegética promovidos, durante a Semana das Ciências, junto dos estudantes da Escola Internacional de Torres

O âmbito multidisciplinar das atividades em curso no seio do projeto +Coelho e a sua abrangência nacional foram enquadrados junto dos estudantes, que se manifestaram interessados na temática e na espécie coelho-bravo. Durante a nota introdutória, foi salientada a importância ecológica do coelho, engenheiro de ecossistemas, nomeadamente nas cadeias tróficas da Península Ibérica, dando-se a conhecer as metodologias e procedimentos usados na vigilância sanitária da espécie, particularmente no que diz respeito às doenças de origem viral, tais como a doença hemorrágica viral e a mixomatose.



Estudantes da EITV a interagir com os exemplares de coelho-bravo e a participar na auscultação e medição da frequência cardíaca dos animais.

Os métodos de captura de coelho-bravo para fins científicos foram explicados e as técnicas de sedação e de colheita de sangue em vida para avaliação sanitária foram exemplificadas ao vivo. Foram também exemplificadas as técnicas de

Projeto +Coelho e atividade cinegética promovidos, durante a Semana das Ciências, junto dos estudantes da Escola Internacional de Torres Vedras

monitorização da frequência cardíaca e da temperatura, ainda com os animais sob efeito de sedação.

Esta atividade, que envolveu a colaboração direta de alguns alunos durante alguns procedimentos, visou promover o contacto dos estudantes com o coelho-bravo e, particularmente com a subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus*, autóctone de Portugal, divulgando-se o seu papel-chave nos ecossistemas mediterrânicos.

O papel central do INIAV, na qualidade de instituto de investigação do Ministério da Agricultura, orientado para a investigação e a inovação nas áreas agroalimentar e florestal e detendo os Laboratórios Nacionais de Referência para a segurança alimentar, a sanidade animal e a sanidade vegetal, foi também divulgado.

Com iniciativas desta natureza, o grupo de trabalho +Coelho pretende sensibilizar a população juvenil e a sociedade-civil, em geral, para a importância da recuperação de uma espécie paradigmática, cuja preservação é da responsabilidade de todos, bem como informar sobre os aspetos sinérgicos que a atividade cinegética praticada com ética exerce na proteção da biodiversidade e da natureza e na dinamização do mundo rural.

.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

||Número 59
9 dezembro 2019

Primeira Reunião Formal do Projeto FIGHT-2, a 7 de janeiro de 2019, no INIAV, em Oeiras

Decorreu no dia 7 de janeiro de 2019, na sede do INIAV em Oeiras, a primeira reunião formal do Projeto **FIGHT 2** intitulado "***Desenvolvimento de vacina edível para o controlo da doença hemorrágica viral (RHDV2) nos coelhos-bravos***", com financiamento aprovado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) no âmbito do concurso com o Aviso Nº 02/SAICT/2017.

Logotipo do Projeto FIGHT 2

O projeto teve início em outubro de 2018, estando a decorrer atualmente o recrutamento e contratação de um doutorado ao abrigo do Decreto Lei nº 57/2016, de 29 de agosto, de acordo com estipulado no concurso.

O Projeto **FIGHT 2**, é coordenado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), e envolve três outras instituições beneficiárias, nomeadamente o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV) e a Universidade de Évora (EU), reunindo assim competências em áreas distintas da Virologia, Imunologia,Patogenia, Biologia Molecular, Filogenética, Epidemiologia Molecular, Experimentação Animal, Biologia, Gestão Cinegética, Biodiversidade, Biotecnologia e Desenvolvimento de Vacinas.

Primeira Reunião Formal do Projecto FIGHT-2, a 7 de janeiro de 2019, no INIAV, em Oeiras



Instituições Beneficiárias e Equipa do Projeto FIGHT-2

O desenvolvimento de uma vacina oral, adequada à imunização das populações de coelho-bravo é uma medida (de longo prazo) prevista no Eixo "Programa de Investigação" do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos" (conhecido pelo acrónimo +Coelho), criado pelo Despacho 4757/17 de 31 de maio do MAFDR.



EIXOS DE INTERVENÇÃO DO PROJETO +COELHO

O financiamento do Projeto FIGHT-2 permitirá pôr em prática as primeiras fases do desenvolvimento da vacina.

A maioria das medidas de curto e médio prazo identificadas nos Eixos "Boas Práticas de Gestão" e "Medidas de Controlo Sanitário" do referido Plano de Ação, têm vindo a ser executadas através do financiamento anual pelo Fundo Florestal Permanente (FFP), estando a decorrer atualmente o segundo ano de atividades.



Primeira Reunião Formal do Projecto FIGHT-2, a 7 de janeiro de 2019, no INIAV, em Oeiras

Nesta primeira reunião do Projeto FIGHT 2, para além das equipas das quatro instituições beneficiárias (INIAV, iBET, FMV e EU, descritas acima no *slide*), estiveram também presentes vários parceiros do Projeto +Coelho, nomeadamente:

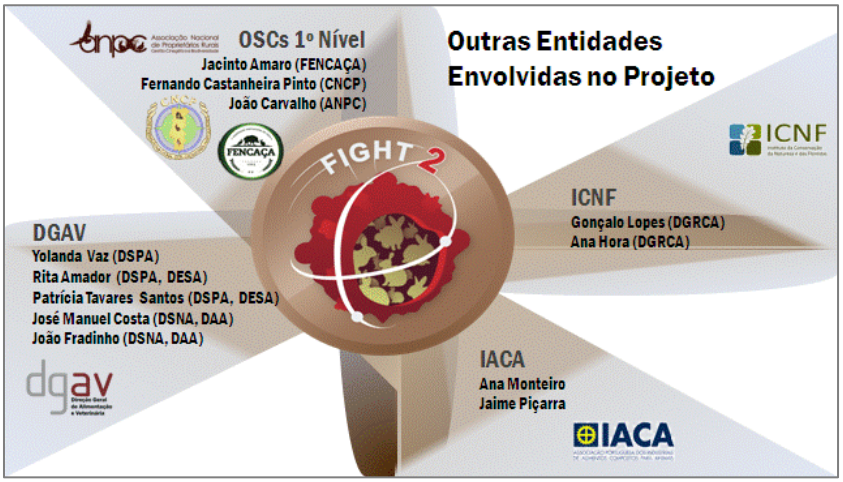
-As Organizações do Setor da Caça de 1º nível, representadas por João Carvalho (Secretário Geral da ANPC) e Jacinto Amaro (Presidente da FENCAÇA);

-A Direção Geral de Alimentação e Veterinária, autoridade nacional de sanidade veterinária e dos medicamentos veterinários (Decreto-Lei n.º 18/2014, 4 de fevereiro, Art.º 9º, nº 1), representada por Patrícia Tavares Santos (Direção de Serviços de Proteção Animal, Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal) e Maria João Fradinho (Direção de Serviços de Nutrição e Alimentação, Divisão de Alimentação Animal).

-O Instituto de Conservação da Natureza e Florestas, autoridade na Gestão dos Recursos Cinegéticos (Decreto-Lei n.º 135/2012, de 29 de junho), representado por Gonçalo Lopes e Ana Hora (Divisão de Gestão de Recursos Cinegéticos e Apícolas).

- A Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), representada por Ana Cristina Monteiro (Assessora Técnica da IACA).

Dadas as particularidades das áreas cientificas do Projeto FIGHT 2, nomeadamente a produção de uma ferramenta de ação profilática dirigida para uma subespécie de natureza silvestre, a ser veiculada numa ração adequada às populações de coelho-bravo, este será desenvolvido em estreita articulação com estas instituições e organizações, consideradas por isso Parceiras.



Primeira Reunião Formal do Projecto FIGHT-2, a 7 de janeiro de 2019, no INIAV, em Oeiras

Durante a reunião, Margarida Duarte (Investigadora responsável pelo Projeto, INIAV, Laboratório de Virologia) contextualizou os desafios subjacentes ao objetivo fundamental do Projeto – a recuperação da subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus* dada a sua dimensão ecológica e sócio-económica em Portugal e na Península Ibérica.

A ser bem-sucedida, esta vacina constituirá uma ferramenta de Gestão das populações de coelho-bravo no âmbito do controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, a ser utilizada apenas em áreas afetadas. Dadas as características da doença e do vírus, nomeadamente a sua fácil disseminação por vetores mecânicos e elevada resistência ambiental, esta doença não é erradicável.

Em conjunto com António Roldão (Investigador co-responsável pelo Projecto, iBET), foram apresentadas e discutidas as oito atividades previstas no Projeto.





António Roldão (Investigador Co-PI, iBET) e Margarida Duarte (Investigadora PI, INIAV)

Primeira Reunião Formal do Projecto FIGHT-2, a 7 de janeiro de 2019, no INIAV, em Oeiras

RESUMO DO PROJETO FIGHT 2

O objetivo estratégico do Projeto FIGHT 2 é o desenvolvimento de uma vacina comestível contra a Doença Hemorrágica Viral (DHV) dos Coelhos causada por RHDV2 (Vírus de tipo 2). O RHDV2 emergiu em 2010 e é responsável por uma febre hemorrágica altamente contagiosa e letal cujo impacto nas populações de coelho-bravo é muito preocupante por afetar adultos e juvenis.

As atuais vacinas contra RHDV2 são inativadas, obtidas de extratos de fígado de animais infetados. A via de administração, geralmente subcutânea, requer o maneio individual dos animais, limitando por isso o seu uso à indústria, à produção de coelho-doméstico para consumo familiar e aos animais de companhia.

O Projeto FIGHT 2 pretende desenvolver uma vacina oral contra RHDV2, segura e inócua, para imunização de coelhos-bravos no campo, ultrapassando assim a necessidade de manipulação dos animais.

Esta vacina, baseada em partículas de tipo viral (VLPs), será produzida em células de Inseto, utilizando um Vetor de Expressão de Baculovirus (IC-BEVS), permitindo a sua atualização em função da evolução do vírus.

Abordando uma questão de saúde animal emergente, este Projeto almeja a recuperação da vulnerável subespécie Oryctolagus cuniculus algirus, pedra basilar dos ecossistemas Mediterrânicos, e a reativação da atividade cinegética, fortemente enraizada na cultura e tradição dos povos da Península Ibérica.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

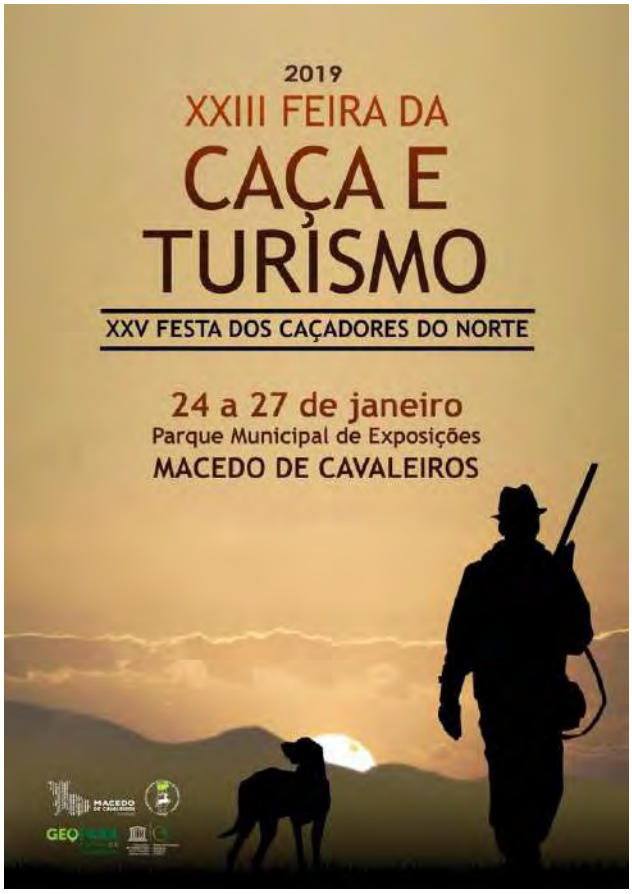
Projeto FIGHT 2: PTDC/CVT-CVT/29062/2017- PT2020

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 59
4 janeiro 2019

Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro

O Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), o Grupo de Trabalho +Coelho e o recentemente fundado Centro de Competências para o Estudo Gestão e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade (CCEGSECB), foram convidados pelo Vereador dos Pelouros da "Caça e Pesca", "Desporto" e "Mercados e Feiras" entre outros, - Rui Serapicos Vilarinho e pelo Presidente da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses, - Fernando Castanheira Pinto, a participar na XXIII Feira de Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros que decorreu em Macedo no final do mês passado, em simultâneo com a XXV Festa dos Caçadores do Norte.



O evento foi organizado pela autarquia de Macedo de Cavaleiros em parceria com a Federação das Associações de Caçadores da 1ª Região Cinegética (FACIRC), e teve como objetivo principal divulgar o património cinegético, natural e paisagístico da região.

Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro

A Feira decorreu no Parque Municipal de Exposições de Macedo, onde artigos de caça e pesca, mostras de gastronomia, oportunidades de turismo, artesanato, animação turística, espetáculos e palestras sobre diferentes temas, foram alvo de atenção de cerca de 40 mil visitantes e 700 caçadores que por ela passaram naqueles 4 dias.



Margarida Duarte (Investigadora), Nuno Canada (Presidente do INIAV) e Mónica Cunha (Investigadora), no Stand do INIAV na XXIII Feira de Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros

O INIAV ocupou um *stand* no Pavilhão das Instituições no contexto global dos 150 expositores presentes, onde apresentou vários *roll-ups* e *posters* alusivos às suas competências e missão enquanto Laboratório de Estado, ao Projeto +Coelho que está em ação desde Agosto de 2017, ao Projeto Fight-2 recentemente iniciado e que visa o desenvolvimento de uma vacina oral para o controlo da doença hemorrágica nas populações de coelho-bravo, e ao CCEGSECB, que estiveram expostos ao público de 24 a 27 de Outubro.

O seminário "Caça em Trás-os-Montes: Oportunidades e Ameaças" (dia 24 de janeiro) contou com a presença de Arlindo Cunha, ex-ministro da Agricultura e vice-presidente da FENCAÇA, Fernando Castanheira-Pinto, Presidente da Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses, e Madalena Vieira Pinto, Médica Veterinária, docente na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), que entre vários temas abordaram questões relacionadas com a fiscalidade da atividade cinegética, saúde animal, segurança alimentar e desafio à

Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro

comercialização da carne de caça em Portugal. A sessão foi moderada pelo Presidente da FACIRC, Artur Cordeiro Rodrigues. Não obstante a hora tardia, a discussão acesa e participativa dos presentes, comprovou a atualidade e interesse dos temas abordados.



No início da tarde de dia 25, decorreu o I Seminário Internacional sobre Turismo do Interior que contou com a presença da Secretária de Estado do Turismo, Ana Mendes Godinho.

Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro de 2019







A Feira foi inaugurada pelos Presidentes da Câmara de Macedo de Cavaleiros, Benjamim Rodrigues, da CNCP, Fernando Castanheira-Pinto, e da FACIRC, Artur Cordeiro Rodrigues.

Oradores da Sessão de Inauguração da XXIII Feira de Caça e Turismo de Macedo de Cavaleiros; Benjamim Rodrigues (em cima), Fernando Castanheira-Pinto (em baixo à esquerda) e Artur Cordeiro Rodrigues (em baixo à direita).

Entre 24 e 27 de janeiro, muitas foram as atividades proporcionadas pela organização relacionadas com atividade cinegética, e de que constaram Montarias, Provas de Cetraria, Provas de Santo Humberto, corridas de Gagos, entre outras.



Luís Figueiredo, depois de concluir uma excelente prova de St Humberto, no dia 26 de janeiro de 2019.

Participação do INIAV e do Grupo de trabalho +Coelho na Feira da Caça e e Turismo de Macedo de Cavaleiros, que se realizou de 24 a 27 de janeiro

Margarida Duarte, co-cordenadora do Projeto +Coelho, visitou a Associação de Caçadores de Grijó e Vilar do Monte, um exemplo de sucesso no estudo, recuperação e repovoamento do corço naquela zona de caça.







Em cima: Raul Fernandes (Presidente da ACGVM), Rui Vilarinho (Vereador do Município), Alberto Rocha (Diretor da FACIRC), António Fernandes, (Vice-presidente da FACIRC), Artur Cordeiro Rodrigues (Presidente da FACIRC) na sede da Associação de Caçadores de Grijó e Vilar do Monte.
Em baixo: Margarida Duarte (INIAV) e Rui Vilarinho (Vereador do Municipio).

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 61
10 abril de 2019

Grupo de Trabalho +Coelho intervém, a convite, nas jornadas Xuntos Pola Caza, que se realizaram a 31 de março em Lobios, Galiza, Espanha.

A convite da Mesa Galega Pola Caza, a investigadora Mónica V. Cunha do grupo de Trabalho +Coelho esteve presente nas jornadas *Xuntos Pola Caza*, que se realizaram a 31 de março em Lobios, Galiza (Espanha), nas quais se discutiram os problemas e preocupações dos caçadores e das sociedades de caça.

As jornadas contaram com várias apresentações, nomeadamente de Juan Perez, médico veterinário, que abordou aspetos técnicos da gestão cinegética, seguindo-se a apresentação do projeto +Coelho, nos seus aspetos estratégicos, científicos e operacionais, tendo sido descritos os resultados das atividades desenvolvidas nos últimos 18 meses pelo Grupo de Trabalho.



Mónica Cunha com Manuel Martinez Casal (à esquerda) e Juan Perez (à direita), membros da Direção da Mesa Galega Pola Caza.

ICNF
Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Seguiram-se outras apresentações por Rafel Canalejo e Michel Coya, que abordaram aspetos práticos relacionados com apólices de seguros de caça e armas de fogo, respetivamente. A Presidente de Câmara de Lobios, María del Carmen Yáñez, e a Diretora Geral da Consellería de Medio Ambiente da Xunta

Grupo de Trabalho +Coelho intervém, a convite, nas jornadas Xuntos Pola Caza, que se realizaram a 31 de março em Lobios, Galiza, Espanha.

de Galicia, Belén María do Campo Piñeiro, interviram no final, abordando a importância socioeconómica da caça na Galiza, e encerrando a sessão. O evento teve grande adesão, tendo estado presentes mais de 200 pessoas, entre caçadores, técnicos, gestores e caçadoras com visibilidade nas redes sociais. O projeto +Coelho suscitou grande interesse junto da audiência, que colocou e debateu diversas questões de ordem prática relativas ao controlo de epizootias, gestão e recuperação das populações de coelho-bravo. Foi também debatida a importância de se abordar a problemática do coelho-bravo numa perspetiva ibérica. No final da sessão, seguiu-se um almoço no Restaurante Lusitano de Lobios, dedicado à degustação de carne de caça, nomeadamente, javali, corço e veado.







Em cima: à esquerda, Michel Coya, perito em armas e influenciador das redes sociais; à direita, Juan Pérez (Mesa Galega Pola Caza), María del Carmen Yáñez (Alcaldesa de Lobios), Belén María do Campo Piñeiro (Diretora Geral da Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia) e Manuel Casal (Mesa Galega Pola Caza).

ICNF
Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 62
07 maio 2019

Intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho na EXPOCAÇA, Santarém, 5 de maio de 2019

A convite do Senhor Presidente da Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Jacinto Amaro, o Grupo +Coelho participou no XXVII Encontro Nacional de Caçadores da FENCAÇA, que decorreu no Centro Nacional de Exposições e Mercados Agrícolas (CNEMA) em Santarém (Portugal), no âmbito da EXPOCAÇA 2019.



A FENCAÇA é entidade participante do GT +Coelho, juntamente com as outras Organizações do Setor da Caça de 1º nível, nomeadamente a ANPC e a CNCP. Estes três Parceiros do Projeto +Coelho, conhecedores de excelência das realidades que atetam as diferentes espécies silvestres do território nacional, entre as quais o coelho-bravo e a lebre-ibérica, colaboram com os Parceiros de Investigação (INIAV, CIBIO e iBET) e com a DGAV e o ICNF no alcance dos propósitos definidos pelas várias linhas de investigação que vêm sendo desenvolvidas no contexto do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos (despacho 7454/17 de 31 de maio). É ainda Parceiro do projeto a Ordem dos Médicos Veterinários (OMV).

Intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho na EXPOCAÇA, Santarém, 5 de maio de 2019

O Colóquio do XXVII Encontro de Caçadores envolveu 5 paineis, moderados por Paula Simões (Assessora Jurídica da FENCAÇA).

O primeiro painel foi dedicado a questões de carácter técnico-científico. Nele foram oradores Mónica Cunha (Investigadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV) que apresentou o recém formado Centro de Competências para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade, Margarida Duarte (Virologista do INIAV) que falou sobre a situação atual da Lebre-ibérica, e Fernando Bernardo (Director Geral de Alimentação e Veterinária, DGAV) que palestrou sobre a ameaça real da Peste Suína Africana.



Margarida Duarte (INIAV), no XXVII Encontro Nacional de Caçadores da FENCAÇA. Na mesa, da direita para a esquerda, Fernando Bernardo (DGAV), Mónica Cunha (INIAV), Arlindo Cunha (FENCAÇA), Jacinto Amaro (FENCAÇA), Paula Simões (FENCAÇA).

Margarida Duarte, como representante do GT +Coelho, fez também um ponto da situação do projeto +Coelho e divulgou os resultados comulativos da vigilância sanitária que vem sendo efetuada em coelho-bravo e em lebre-ibérica desde agosto de 2017, dando ênfase à situação preocupante que esta última espécie atravessa, face à emergência de um novo vírus da mixomatose de elevada patogenicidade, e com capacidade de transmissão entre lebres.

No segundo painel foram oradores um conjunto de deputados e candidatos a eurodeputados que sequencialmente exposeram as suas visões sobre a atividade cinegética e sobre a sua importância na preservação da biodiversidade e na

sustentabilidade do mundo rural. Foram oradores deste painel Patrícia Fonseca, Pedro Carmo e Nuno Serra (Deputados do CDS, PS e PSD no Parlamento Nacional) e Nuno Melo, João Dias e Alvaro Amaro (Deputados do CDS, PCP e autarca do PSD, candidatos ao Parlamento Europeu).

O terceiro painel consistiu num conjunto de intervenções de vários Presidentes, ou seus representantes, das Câmaras Municipais de Reguengos de Monsaraz, Mértola e Moura que usaram da palavra em defesa do mundo rural.

No IV Painel discursaram Jacinto Amaro (Fundador e Presidente da FENCAÇA) e Miguel João de Freitas (Secretário de Estado das Florestas e do Desenvolvimento Rural, em representação do Sr. Ministro da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR)).

O Presidente da FENCAÇA abordou o regime jurídico sobre as armas, a importância da sociedade em geral, dos municípios e dos deputados, na luta, ao lado dos caçadores, pela defesa das atividades tradicionais que combatem a desertificação, o abandono rural e os incêndios, como o são a Caça e a Pesca.



Jacinto Amaro (Presidente da FENCAÇA), discursando na EXPOCAÇA 2019. Na mesa, da esquerda para a direita, Miguel Freitas (Secretário Geral das Florestas e Desenvolvimento Rural), Arlindo Cunha (Vice-Presidente da FENCAÇA), José Manuel Barata Feyo (Jornalista e Caçador) e Paula Simões (Jurista da FENCAÇA).

Intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho na EXPOCAÇA, Santarém, 5 de maio de 2019

A última sessão consistiu numa homenagem ao Dr. Manuel Alegre (Escritor, Poeta, Político e Caçador) pela sua intervenção continuada na defesa da caça e das tradições. A homenagem foi proferida pelo jornalista José Manuel Barata Feyo, que relembrou marcos históricos da vida do homenageado, enquanto poeta, escritor e político ao serviço do nosso país e do nosso povo, e os intercruzou com a atividade da caça.



Manuel Alegre discursando no XXVII Encontro Nacional de Caçadores, EXPOCAÇA 2019. Na mesa da esquerda para a direita, João Carvalho (Secretário Geral da ANPC), Fernando Castanheira Pinto (Presidente da CNCP), Victor Bota Palmilha (Presidente da Federação de Caçadores do Algarve, CNCP), António Paula Soares (Presidente da ANPC), Miguel Freiras (Secretário de Estado das Florestas e do Desenvolvimento Rural), Jacinto Amaro (fundador e Presidente da FENCAÇA), Arlindo Cunha (Vice-Presidente da FENCAÇA), Paula Simões (Assessora Jurídica da FENCAÇA).

A EXPOCAÇA, a maior e mais antiga feira de caça e pesca da Península Ibérica, comemorou assim 31 anos ao serviço da promoção da caça, armas e pesca.

O GT +Coelho agradece vivamente a oportunidade concedida pelo Parceiro FENCAÇA para a divulgação pública das atividades desenvolvidas no âmbito dos Projetos +Coelho, num evento que reuniu este ano mais de 20.000 visitantes.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 63
10 maio 2019

Participação do GT +Coelho nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana, 8 de maio de 2019.

A equipa do Projeto +Coelho esteve presente nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana que decorreram no Salão Cultural Alberto Sánchez, em Toledo (Espanha), no dia 8 de maio.

A EFA Oretana constitui um dos sete centros de formação profissional dual e ensino secundário, localizados em áreas rurais, cuja missão é promover cursos de formação profissional regulamentada, cursos de formação para profissionais e empresas e outros destinatários..



O colóquio que representou estas jornadas, intitulado "***Gestão da Liebre-Ibérica en Castila-La Mancha***", contou com três oradores que palestraram sobre ecologia e história evolutiva desta espécie (Doutor Pelayo Acevedo Lavandera, investigador do IERC), sobre as principais patologias da lebre (Doutor Ignacio Bocanegra, Faculdade de Veterinária da Universidade de Cordoba) e sobre as práticas de reprodução em semi-cativeiro da lebre-ibérica (Doutor Vinuellas de la Fuente, Director do Centro de Investigação Apícola e Agroambiental de Marchamalo).

Participação do GT +Coelho nas XVI Jornadas Cinegéticas da EFA Oretana, 8 de maio de 2019.

Seguiu-se uma mesa redonda onde os presentes viram esclarecidas as suas preocupações e curiosiodades.

GT +Coelho, teve assim oportunidade de se inteirar das práticas adotadas nesta região autónoma de Espanha no que toca à gestão e ao maneio da reprodução de lebre-ibérica em condições de semi-cativeiro. A pertinência da partilha deste conhecimento prende-se com uma das linhas da candidatura ao projeto +Coelho 2, nomeadamente a criação, no nosso país, de núcleos de reprodução de leporideos silvestres em condições de semi-cativeiro, e com o Projecto Fight2 (Desenvolvimento de vacina edível para o controlo da doença hemorrágica viral (RHDV2) nos coelhos-bravos) que envolverá no futuro experimentação em campo. A espécie *Lepus granatensis*, recentemente ameaçada por surtos de mixomatose, é a única espécie presente em Portugal e a que habita a maioria do território continental de Espanha.





Da esquerda para a direita, Carina Carvalho, Margarida Duarte, Sebastião Miguel e Fábio Abade dos Santos, Toledo, 8 de maio.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 64
13 maio 2019

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019



O Município de Alijó realizou, pelo 5º ano consecutivo, a Festa do Caçador – ALICAÇA 2019, nos dias 11 e 12 de maio, tendo como preocupação fundamental a preservação da biodiversidade e a sustentabilidade do setor da caça. Nesta festa, que decorreu durante dois dias e envolveu também a colaboração da Junta de Freguesia de Vila Verde, e onde estiveram presentes caçadores, autarcas, gestores e apreciadores da caça, foram promovidos concursos nacionais na área cinegética, nomeadamente Provas de Santo Humberto, Tiro aos pratos, Provas de trabalho com cão coelheiro, Concurso de beleza de cães de caça, Campeonato regional de galgos, etc) e internacionais (Concurso Europeu de Imitação do Canto de Aves - organização da A.E.C.T, realizado pela primeira vez em Portugal), assim como ações de divulgação e sensibilização para as problemáticas que afetam as espécies cinegéticas.

Neste último contexto, e a convite do Presidente da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP) - Fernando Castanheira Pinto, o Grupo de Trabalho +Coelho participou num Colóquio incluído no programa da ALICAÇA 2019, divulgando os objetivos, as estratégias e os resultados obtidos no âmbito do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019

A apresentação foi feita por Margarida Duarte (Virologista do INIAV e co-cordenadora do Projeto +Coelho), no Salão Nobre da Câmara Municipal de Alijó.



Margarida Duarte durante a apresentação "Dois anos de Projeto +Coelho", na Alicaça, Salão Nobre da Câmara Municipal de Alijó, 11 de maio.

Fernando Castanheira Pinto, enquanto Presidente da CNCP, proferiu uma apresentação intitulada "A problemática da Sanidade Animal na atividade cinegética na região. Projeções a curto/médio prazo".



Fernando Castanheira Pinto na apresentação intitulada "A problemática da Sanidade Animal na atividade cinegética na região. Projeções a curto/médio prazo", Salão Nobre, Alijó, 11 de maio.

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Alicaça 2019 (Alijó), 11 de maio de 2019



Da esquerda para direita, Fernando Castanheira Pinto (Presidente da CNCP), Carina Carvalho (Investigadora do INIAV-Projeto Fight 2), Margarida Duarte (Investigadora do INIAV), António Moreira (na qualidade de Juiz de Provas), Vitor Ferreira (Vice-Presidente da CMA), Vice-Presidente da Junta de Freguesia de Vila Verde e organizadores e participantes, durante a entrega de prémios da Prova de St Humberto, Salão Nobre da Câmara Municipal de Alijó, 11 de maio.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 65
28 maio 2019

Prémio SPPA 2019 será atribuido a trabalho desenvolvido por Fábio Abade dos Santos em Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos nos Laboratórios do INIAV e FMV-UL

A Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (SPPA), distinguiu a Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do Dr. Fábio Abade dos Santos com o galardão de melhor tese de Mestrado de 2019 na área de Patologia Veterinária. Esta distenção foi dada, pela primeira vez, a um aluno da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL).

O prémio será atribuido no dia 15 de junho durante o XXIV Congresso da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal que decorrerá na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

O trabalho em causa, intitulado "***Quadro anatomo-histopatológico e diagnóstico molecular da doença hemorrágica viral em coelho-bravo***", foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária, respetivamente sob orientação de Margarida Duarte e Conceição Peleteiro. A defesa da tese teve lugar a 23 de março de 2018 (Notícia 27) na Faculdade de Medicina Veterinária, tendo sido avaliada com nota máxima.

Prémio SPPA 2019 será atribuido a trabalho desenvolvido por Fábio Abade dos Santos em Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos nos laboratórios do INIAV e FMV-UL

O trabalho envolvido nesta disertação teve como objetivo estabelecer padrões de lesão histopatológica nos principais órgãos afetados durante a infeção por RHDV2, em *Oryctolagus cuniculus algirus* não-vacinados e vacinados, e relacioná-los com os padrões de distribuição viral, medido pelas cargas virais (por sua vez correlacionaveis com os valores de Cq obtidos por RT-qPCR) em sete matrizes diferentes, nomeadamente fígado, baço, duodeno, fezes, rim, pulmão e ventrículo esquerdo.



A amostragem do estudo compreendeu cerca de meia centena de animais vitimizados durante surtos de RHDV2. Dos dados obtidos resultaram ainda algumas recomendações práticas relativamente à escolha das matrizes mais adequadas para o diagnóstico da doença em animais, que embora tenham sido vacinados, não adquiram proteção suficiente para empedir o desenvolvimento de doença.

Algumas das linhas desenvolvidas neste trabalho de Mestrado, nomeadamente no que toca ao rastreio de RHDV2 em espécies simpatricas e em vetores, permitiram assegurar o cumprimento do OE4 do Projecto +Coelho 1 (OE4. Determinar a importância dos vetores na transmissão e disseminação do RHDV2).

O Dr. Fábio Abade dos Santos é também colaborador do Projecto +Coelho 2 no âmbito do seu programa de doutoramento.

Os Projectos +Coelho são financiados pelo Fundo Florestal Permanente.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 66
14 junho 2019

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Assembleia Geral da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior, em ***Pinhel****, 1 de junho de 2019.*

A convite do Presidente da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior (FCPBI), André Cid Ferreira, e do Presidente da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses (CNCP), Fernando Castanheira Pinto, o Grupo de Trabalho +Coelho apresentou, pelo segundo ano, durante a Reunião da **Assembleia Geral da FCPBI de 2019**, os resultados e o modelo de ação do Projeto +Coelho em ação desde agosto de 2017. Implementado por uma parceria de 9 instituições (governamentais e privadas e do sector da caça), nomeadamente, INIAV, DGAV, ICNF, ANPC, CNCP, FENCAÇA, CIBIO, iBET, e OMV, este projeto tem o seu enfoque central no controlo da doença hemorrágica viral dos coelhos e na inversão do declínio das populações de coelho-bravo, embora se debruce sobre outras problemáticas que afetam os leporideos. Dando cumprimento ao 4º eixo (Comunicação e Divulgação), definido no Plano de Ação (Despacho 5747/17 de 31 de maio MAFDR), Margarida Duarte (INIAV) proferiu uma apresentação intitulada "*Dois anos de Projeto +COELHO: Objetivos, Estratégia e (alguns) Resultados*".

O Presidente da CNCP fechou a sessão com uma intervenção, "*Perspetivas Futuras – Ameaças e Oportunidades do Setor*" abordando várias preocupações atuais como a potencial reemergência da Peste Suína Africana no nosso país, a

Apresentação das Atividades do Grupo de Trabalho +Coelho na Assembleia Geral da Federação de Caça e Pesca da Beira Interior, em ***Pinhel****, 1 de junho de 2019.*

necessidade de identificação de meios que permitam a sustentabilidade das Associações de Caça, e a necessidade de exclarecer o papel e a imagem dos caçadores junti à opinião pública.

Seguiu-se um período de debate com a assistência, compreendida maioritariamente por caçadores e gestores mas também por presidentes de algumas das Federações da CNCP, onde os presentes tiveram oportunidade de partilhar informações úteis e ver esclarecidas as suas dúvidas.





Em cima, à esquerda, mesa da Assembleia Geral da FCPBI (Rui Manuel Saraiva Ventura-Presidente da Câmara Municipal de Pinhel, Nuno José Vaz-Presidente da Assembleia Geral da FCPBI e José Cid-Presidente da FCPBI.
Em cima à direita, Margarida Duarte durante a apresentação do Projeto +Coelho.
Em baixo, mesa de encerramento da Assembleia, Margarida Duarte (Investigadora do INIAV), Fernando Castanheira Pinto (Presidente da CNCP) e Nuno José Vaz (Presidente da Assembleia Geral da FCPBI).

REPÚBLICA PORTUGUESA

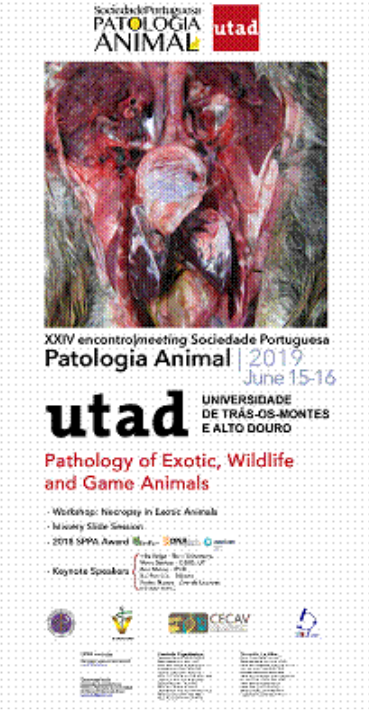
FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 67
17 junho 2019

*Participação do Grupo +Coelho no **XXIV Encontro da SPPA** , realizado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro (UTAD), de 15 a 16 de junho de 2019*



Decorreu nos dias 15 e 16 de junho, o XXIV Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (SPPA), uma associação científica sem fins lucrativos,
fundada em novembro de 1976.

Neste encontro, Fábio Abade dos Santos, membro da equipa do Grupo +Coelho, no âmbito dos trabalhos desenvolvidos com vista ao seu doutoramento, proferiu uma apresentação intitulada "*Mixomatose, considerada uma doença de coelhos, emerge recentemente em lebre-ibérica: o que nos revela a histopatologia nestas duas espécies*?", onde divulgou resultados preliminares de um estudo comparativo dos aspectos histopatologicos observados em coelho-bravo e lebre-ibérica com mixomatose. Este trabalho, desenvolvido no INIAV e na FMV da Universidade de Lisboa, conta ainda com a colaboração do Instituto de Medicina Molecular de Lisboa.



Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 68
22 junho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, Ponte de Lima, 21 a 23 de junho.

A convite da FENCAÇA, organização parceira do Grupo de Tabalho +Coelho, foram apresentadas as atividades desenvolvidas e resultados obtidos no âmbito do Projeto +Coelho, criado na sequência do despacho 4757/17 de 31 de maio e em curso desde agosto de 2017, na XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, que se realizou em Ponte de Lima de 21 a 23 de junho.

Esta ação de divulgação inseriu-se no Colóquio intitulado "Compatibilização da Atividade Cinegética com as atividades Turísticas Emergentes no Mundo Rural" que decorreu no Parque de Exposições da Ponte de Lima, no dia 21 de junho.



Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XI Feira de Caça, Pesca e Lazer, Ponte de Lima, 21 a 23 de junho.

A apresentação foi proferida por Margarida Duarte (Investigadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV, I.P.) e intitulou-se "Dois anos de Projeto +Coelho: Objetivos, Estratégia e alguns Resultados".

O Colóquio foi moderado por José Almeida (membro da FENCAÇA) e contou ainda com as intervenções de Francisco Álvares (Investigador do CIBIO-InBIO), Miguel José Correia Branco (Capitão Chefe da Seção do Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente - SEPNA), Sandra Sarmento (Diretora da Direção Regional da Conservação da Natureza e Florestas do Norte), Jacinto Amaro (Presidente da Federação Portuguesa de Caça - FENCAÇA) e Vitor Mendes (Presidente da Câmara Municipal de Ponte de Lima).

A Expolima 2019, resultou de uma parceria entre o Município de Ponte de Lima e a Escola Profissional de Agricultura e Desenvolvimento Rural de Ponte de Lima que, em colaboração com as Federações de âmbito nacional e Associações do concelho que operam nos setores da caça, pesca, apicultura, desporto, floresta, recreação e lazer, promoveram, dinamizaram e divulgaram serviços e atividades ligadas aos referidos sectores.



Mesa do colóquio: José Almeida (FENCAÇA) Sandra Sarmento (ICNF), Miguel José Correia Branco (SEPNA), Vitor Mendes (Câmara Municipal de Ponte de Lima), Jacinto Amaro (FENCAÇA), Francisco Álvares (CIBIO-InBIO) e Margarida Duarte (INIAV).

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 69
24 junho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 30º aniversário do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, 22 de junho de 2019

O Clube de Caçadores do Vale de Santarém, associado da FENCAÇA, celebrou no passado dia 22 de junho o seu 30º Aniversário, através de um almoço comemorativo que se realizou no Polo de Santarém do INIAV (antiga Estação Zootécnica Nacional). Este evento reuniu o presidente e sócios/caçadores deste clube, assim como muitos convidados. Entre estes, estiveram presentes o presidente da Fencaça, Jacinto Amaro, o Vogal do Conselho Diretivo do ICNF, Nuno Sequeira, o chefe da Divisão de Recursos Cinegéticos e Aquícolas do ICNF, Gonçalo Lopes, a coordenadora do Grupo de Trabalho +Coelho do INIAV, Margarida Duarte, e deputados de vários quadrantes políticos, nomeadamente a presidente da Distrital de Santarém pelo CDS, Patrícia Fonseca de Oliveira e o deputado do Grupo Parlamentar do PSD, Nuno Serra. Esteve também presente o Vereador da Câmara Municipal do Cartaxo, Pedro Filipe Nobre.





Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 30º aniversário do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, 22 de junho de 2019

Na sua intervenção, que iniciou um conjunto de outras proferidas pelos convidados, o presidente do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, Alfredo Lobato, apresentou uma resenha histórica sobre a gênese do Clube de Caçadores do Vale de Santarém, e agradeceu a todos os que, de uma forma ou outra, contribuíram positivamente para a sua existência e sucesso.



Presidente da Associação de Caçadores do Vale de Santarém, Alfredo Lobato, no almoço comemorativo dos 30 anos do Clube.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 70
30 de junho de 2019

Participação do GT +Coelho, através do Projeto Figth-two, nas Jornadas MED/ICAAM Universidade de Évora, 28 de junho de 2019.

Carina Carvalho, investigadora do *Projecto Fight-Two – desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) nos coelhos-bravos*, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020), divulgou, numa apresentação oral, a estratégia e objetivos deste projeto nas primeiras Jornadas MED/ICAAM, que decorreram nas instalações do Pólo da Mitra da Universidade de Évora no dia 28 de junho de 2019.



O Projeto Fight-Two é dedicado ao desenvolvimento de uma vacina oral para controlo da doença hemorrágica viral, pondo em prática uma das medidas do Eixo de Investigação do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, MAFDR).

São parceiros neste projeto o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

Participação do GT +Coelho, através do Projeto Figth-two, nas Jornadas MED/ICAAM Universidade de Évora, 28 de junho de 2019.

(iBET), a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV-UTL) e a Universidade de Évora (UÉ).



As Jornadas MED tiveram como objetivo dar a conhecer o Centro MED que resulta da fusão de vários institutos da região do Alentejo e Algarve, e contará com cerca de 180 investigadores doutorados, dando visibilidade à investigação desenvolvida nos institutos aderentes a este centro.

As jornadas tiveram como tema central "A Agricultura e o Ambiente no Mediterrâneo" e alinharam-se com as 8 linhas temáticas do novo centro MED, nomeadamente, *Olival e Azeite Português, Viticultura e Enologia, Horticultura, Produção e Saúde Animal, Montado, Agricultura Irrigada, Biodiversidade e Dinâmica Rural e Governança*.

A iniciativa contou com a participação, da região do Alentejo, do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), do pólo de Évora do Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO-InBIO) e do Centro de Biotecnologia Agrícola e Alimentar do Alentejo CEBAL.

O Centro para os Recursos Biológicos e Alimentos Mediterrânicos da Universidade do Algarve (MeditBio) foi também participante nas jornadas.

Participação do GT +Coelho, através do Projeto Figth-two, nas Jornadas MED/ICAAM Universidade de Évora, 28 de junho de 2019



JORNADAS MED – PÓLO DA MITRA
27 e 28 de Junho de 2019

27 DE JUNHO

12:00H – Receção
14:00H – Sessão de Abertura –Teresa Pinto Correia (Diretora do ICAAM)
14:15H – **Sessão Plenária: Some thoughts on agriculture and climate change -** Daniel Martin-Collado (CITA - Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Zaragoza) e Ana Iglesias (CEIGRAM - Centro de Estudios y Investigación para la Gestion de Riesgos Agrarios e Medioambientales, Universidad Politécnica de Madrid).

SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL (sala 2)

9:00H – **AWARTECH - Animal Welfare Adjusted Real Time Environmental Conditions of Housing** – Fátima Baptista (ICAAM)
9:15H – **GEN-RES-ALENTEJO - Utilização da Genómica na Seleção de Ovinos Resistentes a Parasitas e Peeira no Alentejo** – Sandra Branco (ICAAM)
9:30H – **TREASURE - Diversity of local European pig breeds and production systems for high quality traditional products and sustainable pork chains** – Rui Charneca (ICAAM)
9:45H – **Reproductive management and biotechnology of reproduction in Lusitano breed horses** – Elisa Bettencourt (ICAAM)
10:00H – **Network for Evaluation of One Health (NEOH)** – Manuela Vilhena (ICAAM)
10:15H - **Desenvolvimento de vacina edível para o controlo da doença hemorrágica viral (RHDV2) nos coelhos-bravos** - Carina Carvalho (INIAV/ICAAM)

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

.

REPÚBLICA PORTUGUESA

|Número 71
30 junho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

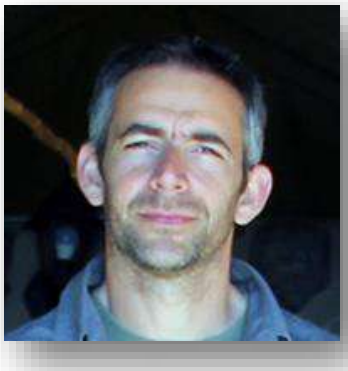
Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho.

O Grupo de Trabalho +Coelho marcou presença no evento "Wildlife & Game Management Innovation Summit", que se realizou de 28 e 29 de junho de 2019 no INIAV, I.P., em Oeiras, através de várias apresentações orais e em painéis temáticos, que incidiram sobre diferentes medidas do Projeto +Coelho.



Paulo Célio Alves (CIBIO), proferiu uma sessão plenária, sobre a preservação do património genético das espécies cinegéticas, como garantia de sustentabilidade e certificação de qualidade, dedicada à sensibilização da importância da preservação da pureza das espécies cinegéticas autóctones, como enfase para a subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus*.

Pedro Monterroso (CIBIO), falou sobre a importância da monitorização populacional de espécies cinegéticas, uma prática essencial para uma exploração sustentável, e que foi aplicada a várias zonas de caça no âmbito do Projeto +Coelho 1 e será continuada e alargada no Projeto +Coelho 2.



Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, Oeiras, 28 a 29 de junho.



Margarida Duarte (INIAV), proferiu uma apresentação sobre a importância do diagnóstico laboratorial no controlo das doenças e no apoio à gestão cinegética, dando como exemplo o projeto +Coelho.



João Carvalho (ANPC), falou sobre o exemplo do Projeto SELECTPREDADORES, que permitiu avaliar novos métodos seletivos para a correção de densidades de predadores em Portugal. Esta é uma medida prevista no Projecto +Coelho 2.



António Roldão (iBET), divulgou a experiencia do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica na produção de vacinas para aplicação em saúde animal. O desenvolvimento de uma vacina oral para imunização de coelhos-bravos contra a Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (RHDV2) é uma das medidas do Plano de Ação, que tem vindo a ser operacionalizado pelos Projetos +Coelho



Carina Carvalho (INIAV) apresentou, em painel temático, uma avaliação atual *in silico*, da aptidão e adequabilidade do método molecular utilizado no diagnóstico de RHDV2, desenvolvido em 2014 e publicado no ano seguinte (Duarte et al,

2015). Este estudo foi realizado no âmbito do projeto Figth 2 – desenvolvimento de vacina edível para o controlo da DHC no coelho-bravo (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020).

Fábio Abade dos Santos (INIAV) apresentou um painel alusivo a um método de amostragem de coelho-bravo sob sedação, desenvolvido no âmbito do Projeto +Coelho, e cuja descrição detalhada estará disponível brevemente numa revista internacional.



As páginas do livro de resumos desta Cimeira relativos a estas sete apresentações, são apresentados abaixo.

Esta cimeira foi dedicada aos setores cinegético, florestal e agrícola, e preveligiou a partilha, divulgação e disseminação de experiências, conhecimentos e resultados de projetos de investigação nacionais e europeus com impacto em fauna silvestre, exploração de espécies cinegéticas, gestão cinegética, caça e biodiversidade.

A Cimeira Wildlife & Game Management Innovation foi organizada pelo Centro de Competências para o Estudo, Gestão e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade, e decorreu na Sede do INIAV.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

PRESERVAÇÃO DO PATRIMÓNIO GENÉTICO DAS ESPÉCIES CINEGÉTICAS: UMA GARANTIA DE SUSTENTABILIDADE E CERTIFICAÇÃO DE QUALIDADE

AUTORES

Paulo Célio Alves[1,2,3]

1. Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, R. Campo Alegre, Porto. pcalves@fc.up.pt
2. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO/InBIO), Universidade do Porto, Campus de Vairao, 4485-661, Vairão, Vila do Conde
3. Wildlife Biology Program, Universidade de Montana, EUA

RESUMO

O património genético é o conjunto da informação presente no ADN em cada indivíduo, população ou espécie, resultante de milhares de anos de evolução e de adaptação aos ecossistemas. Esta informação genética é a responsável pelas diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais que observamos atualmente. Além da necessidade de salvaguardar as características genéticas que definem uma população ou uma espécie, é fundamental proteger a variabilidade genética existente entre os indivíduos, de modo a assegurar a essencial capacidade de adaptação aos ecossistemas, que estão em constante modificação.

No entanto, o património genético das espécies cinegéticas encontra-se ameaçado pelo declínio generalizado das populações, como resultado da perda de habitat, predação, mortalidade associada a doenças infeciosas, bem como de situações de excessiva pressão cinegética. Outro fator importante que tem contribuído para a perda das características genéticas autóctones, e que em parte resulta do declínio das populações, é a crescente intensificação da criação de espécies cinegéticas em cativeiro e a gestão artificial dos recursos através de repovoamentos com animais exóticos e/ou domésticos. Preservar o património genético das espécies cinegéticas é, portanto, primordial para manter as características e comportamentais autócones, uma garantia de assegurar a viabilidade a médio e longo prazo das populações, e de certificação de qualidade. Serão apresentadas as metodologias moleculares existentes para a certificação genética e a detecção de hibridação em coelhos, veados, javali e perdiz, bem como exemplos da sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE

Genética, Hibridação, Certificação Genética, Características Autóctones.

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

MONITORIZAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES CINEGÉTICAS: BASES PARA UMA EXPLORAÇÃO SUSTENTÁVEL

AUTORES

Pedro Monterroso[1]

1. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO/InBIO), Universidade do Porto. Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, nº 7, 4485-661 Vairão, Portugal. pmonterroso@cibio.up.pt

RESUMO

A demografia das populações naturais resulta do balanço relativo de diversos parâmetros, como o número de efetivos, sobrevivência, fecundidade, emigração ou imigração. Assim, uma exploração sustentável das espécies cinegéticas assenta necessariamente sobre um correto conhecimento dos seus parâmetros demográficos. No entanto, a correta estimativa desses parâmetros representa um desafio. O tamanho (ou densidade) populacional – um dos parâmetros chave –, é particularmente complexo de estimar podendo ser influenciado por fatores como a variação espácio-temporal na detetabilidade ou variações nos padrões de atividade dos animais. Devido à sua dificuldade, a gestão das populações de espécies cinegéticas é frequentemente baseada em indicadores alternativos, que se assume estarem diretamente relacionados com o parâmetro de interesse, especificamente o tamanho populacional. Utilizando o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e a perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) como modelos biológicos demonstramos, com dados empíricos recolhidos no âmbito de diversos projetos conduzidos em Portugal, como a detetabilidade e a disponibilidade dos animais pode conduzir a enviesamentos significativos na estimativa do tamanho e da dinâmica das suas populações. Estes resultados reforçam a necessidade de implementar sistemas contínuos de monitorização de espécies com importância ecológica, económica e/ou cultural, permitindo um adequado conhecimento da sua demografia, a deteção precoce de situações anómalas (p.ex. surtos de doenças) e a definição de quotas de abate sustentáveis a longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE

Demografia, monitorização, detetabilidade, exploração sustentável

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL NO CONTROLO DAS DOENÇAS DA FAUNA SELVAGEM E NO APOIO À GESTÃO CINEGÉTICA: O EXEMPLO DO PROJECTO + COELHO

AUTORES

Margarida Duarte[1], Carina Carvalho[1], Fábio Santos[1], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Teresa Albuquerque[1], Teresa Fagulha[1], Pedro Esteves[2], Joana Abrantes [2], Ana Lopes [2], Pedro Monterroso[2]; Nuno Santos[2], Ana Serronha[2], João Queirós[2], Paulo Célio Alves[2], Yolanda Vaz[3], Rita Amador[3], Patrícia Tavares Santos[3], Ana Hora[4], Gonçalo Lopes[4], Jacinto Amaro[5], Fernando Castanheira Pinto[6], João Carvalho[7], António Paula Soares[7], Mónica V. Cunha[1], Nuno Canada[1]

1.Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.), Avenida da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal. margarida.duarte@iniav.pt; carina.carvalho@iniav.pt; fabio.santos@ul.pt; madalena.monteiro@iniav.pt; paulo.carvalho@iniav.pt; paula.mendonça@iniav.pt; teresa.albuquerque@iniav.pt; teresa.fagulha@iniav.pt; monica.cunha@iniav.pt; nuno.canada@iniav.pt

2. Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Universidade do Porto, Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, nº7, 4485-661 Vairão, Portugal. pjesteves@cibio.up.pt; analopes@cibio.up.pt; nuno.santos@cibio.up.pt; joao.queiros@cibio.up.pt; anaserronha@cibio.up.pt; pmonterroso@cibio.up.pt; pcalves@fc.up.pt; jabrantes@cibio.up.pt;

3. Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Campo Grande, nº50, 1700-093 Lisboa, Portugal yolanda.vaz@dgav.pt; psantos@dgav.pt; ramador@dgav.pt

4. Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Av da República, nº16, 1050-191 Lisboa, Portugal.
ana.hora@icnf.pt; goncalo.lopes@icnf.pt

5. Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Rua 25 de Abril, lote 20-C/V B, 2100-123 Coruche, Portugal. presidente@fencaca.pt;

6. Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP). Rua Dr António Oliveira Cruz, nº18, 5340-238 Macedo de Cavaleiros, Portugal. presidente@cncp.pt;

7. Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Rua Mestre Lima de Freitas, nº1, 5º, 1549-012 Lisboa, Portugal. jc@anpc.pt; antoniopsoares@anpc.pt

RESUMO

O Projeto +Coelho, através do financiamento do Fundo Florestal Permanente, tem vindo a pôr em prática o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, determinado pelo Despacho nº 4757/2017 de 31 de maio (MAFDR). O objetivo deste plano inclui o conhecimento do estatuto sanitário dos leporídeos (coelho-bravo e lebre) no território nacional e do risco epidemiológico associado às doenças virais, nomeadamente ao vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) e ao vírus da mixomatose.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos no âmbito deste Plano de Ação durante quase dois anos, em amostras das populações de leporídeos caçados provenientes de zonas de caça selecionadas e de leporídeos mortos recolhidos em todo o território nacional, estão a ser implementadas várias medidas de índole prática que pretendem acelerar a recuperação destas populações.

Entre essas medidas constam i) a suplementação de alimento em zonas onde a disponibilidade de alimento natural é escassa, com uma ração especificamente formulada para coelho-bravo, ii) a desparasitação dos animais em zonas afetadas por elevadas cargas parasitárias, iii) a identificação de populações de coelho-bravo resistentes, com elevados títulos de anticorpos para a criação de santuários genéticos destas espécies e, iv) o desenvolvimento de uma plataforma informativa e interativa, de acesso público, onde será disponibilizada informação cartográfica, gráfica e estatística, e num futuro mais distante, um modelo para apoio à Gestão cinegética. A descodificação da informação genética das estirpes de RHDV2 tem permitido compreender melhor a epidemiologia da doença e é crucial para o desenvolvimento e atualização de uma vacina oral que será desenvolvida contra a DHV dos coelhos.

Projeto +Coelho, financiado pelo Fundo Florestal Permanente.

PALAVRAS-CHAVE

Projeto +Coelho; Coelho-bravo; lebre-ibérica; doença hemorrágica viral dos coelhos; vigilância sanitária

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

ÁREA TEMÁTICA: BOAS PRÁTICAS DE GESTÃO, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA & BIODIVERSIDADE

SELECTPREDADORES - AVALIAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS SELETIVOS PARA A CORREÇÃO DE DENSIDADES DE PREDADORES EM PORTUGAL

AUTORES

João Carvalho[1], Pedro Rocha[2] Carlos Fonseca[3], Victor Bandeira[3] & Pedro Gomes[3]

1. Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Rua Mestre Lima de Freitas, nº1, 5º, 1549-012 Lisboa, Portugal jc@anpc.pt;
2. Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Av. da República, nº 16, 1050-191 Lisboa, Portugal. pedro.rocha@icnf.pt;
3. Unidade de Vida Selvagem, Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro. Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Portugal. cfonseca@ua.pt.

RESUMO

A reintrodução de lince-ibérico em Portugal ocorreu em Zonas de Caça na região do Vale do Guadiana onde ocorrem elevadas densidades de espécies de caça menor, para as quais o controle de predadores generalistas tem um papel relevante. A chegada do lince-ibérico colocou novos desafios ao nível dos métodos de controle de predadores até então utilizados. Para responder a esse desafio, a ANPC e o ICNF desenvolveram o projecto SELECTPREDADORES, visando avaliar a selectividade de novos métodos de controlo de populações de raposa, nomeadamente métodos selectivos específicos para canídeos (laços Collarum e Belisle).

O teste das armadilhas Collarum decorreu durante 7 meses em 7 zonas de caça com a presença confirmada de lince-ibérico, tendo sido analisados 24.596 videos, correspondendo a 5.366 noites de armadilhagem.

O índice de seletividade (Índice W de Savage) das armadilhas Collarum foi de W = 1.67 para raposa e W = 1,25 para cão, cujos valores normalizados são de B = 0.57 e B = 0,43, respetivamente, indicando que a seletividade para estas duas espécies, em separado, não é demonstrada (B < 0.90). Contudo, a associação dos resultados das duas espécies de canídeos capturadas (raposa + cão) gera um valor de W = 1.64 e de B = 1, sendo indicador de seletividade para os canídeos, quando agrupados, como indicavam testes realizados noutros países. No decorrer deste projecto não foi possível obter dados conclusivos para os laços Belisle.

Os resultados obtidos com as armadilhas Collarum sugerem existir compatibilidade com a presença de lince-ibérico, sendo este método igualmente utilizado em Espanha em áreas de lince. Para além da sua utilização na captura de raposas, o método tem particular interesse para a captura de cães assilvestrados, designadamente pelas entidades camarárias.

Os laços Collarum apenas podem utilizar iscos odoríferos e não poderão ser usados em áreas com ocorrência comprovada de lobo-ibérico. A utilização deste tipo de armadilhas exigue ainda a formação dos utilizadores no cumprimento de códigos de ética e de conduta em armadilhagem. Nesse sentido o projecto SELECTPREDADORES concluiu com a realização de três workshops de formação e com a produção de um manual de boas práticas em controle de predadores.

PALAVRAS-CHAVE

Armadilhagem fotográfica; boas práticas; carnívoros; Collarum; controle de predadores; conservação; densidades; eficácia; divulgação e formação; gestão cinegética; gestores cinegéticos; lince-ibérico; métodos selectivos; raposa; seletividade; zonas de caça.

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

PRODUÇÃO DE VACINAS PARA APLICAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL: DA MOLÉCULA AO ISCO

AUTORES

Ana Carina Silva[1], Marcos F.Q. Sousa[1], Manuel J.T. Carrondo[1], Paula M. Alves[1], António Roldão[1]

1. IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal, carinas@ibet.pt, msousa@ibet.pt, marques@ibet.pt, mjtc@ibet.pt, aroldao@ibet.pt

RESUMO

O IBET tem estado envolvido na pesquisa e desenvolvimento de vacinas para aplicação em saúde animal desde finais dos anos 90. O primeiro projecto do IBET foi financiado pelo Programa Específico para o Desenvolvimento da Indústria Portuguesa (PEDIP II) em 1994 e centrava-se no desenvolvimento de uma vacina inativada contra a leptospirose canina e "strangles" em cavalos. O primeiro projecto financiado pela Comunidade Europeia (CE) surgiu em 1998 e visava a produção de uma vacina recombinante baseada em partículas semelhantes a vírus (VLP), composta apenas por proteínas, sem material genético viral e produzida em células de insecto, contra o parvovirus porcino. Desde então, uma serie de outros projectos foram realizados no IBET. De entre todos destaco os projectos "ORALVAC" e "MARKVAC", financiados pela CE em 2000 e 2005 respectivamente, que visavam o desenvolvimento de vacinas marcadoras, testes diagnósticos associados e melhoria do conhecimento epidemiológico para facilitar o controle de peste bovina e peste de pequenos ruminantes (PPR). Os resultados gerados nestes projectos levaram ao desenvolvimento de um processo de produção e de uma formulação termoestável para a vacina PPR atenuada que foi posteriormente transferida para o Instituto Nacional Veterinário (NVI) na Etiópia através do programa VACNADA (Vaccines for Control of Neglected Animal Diseases in Africa) em colaboração com o CIRAD (França). Mais recentemente, e no âmbito de um projeto financiado pela empresa Sartorius Stedim Biotech (Alemanha), o IBET desenvolveu um novo, mais eficiente processo de produção da vacina PPR atenuada com o objectivo de apoiar a erradicação da doença em Africa. Nesta apresentação serão abordados os trabalhos sobre (i) desenvolvimento e transferência para NVI de uma formulação termoestável para a vacina PPR atenuada, e (ii) intensificação do processo de produção da vacina PPR atenuada.

PALAVRAS-CHAVE

Vacina; Partículas semelhantes a vírus (VLP); Peste de pequenos ruminantes (PPR); Formulação termoestável; Processo de produção da vacina

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Silva et al., (2014) Vaccine, 32 (24), 2878–2881
Marcelino et al. (2012) Vet Microbiol, 156: 305–314
Silva et al. , (2011) Vaccine, 29, 4983– 4991
Marcelino et al. (2010) Vaccine, 28(29):4573-80
Ferreira et al. (2009) Biotechnol Prog, 25(1):235-43
Silva et al. (2008) Vaccine, 26 (26), 3305-3311
Maranga L et al. (2006) Vaccine, 24(26):5481-90
Maranga et al. (2004) J. Biotechnol., 107:55-64

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

APTIDÃO DO MÉTODO DE RT-qPCR ESPECÍFICO PARA DETEÇÃO DE RHDV2: ANÁLISE *IN SILICO*

AUTORES

Carina L. Carvalho[1], Fábio Abade dos Santos[1,2], Teresa Fagulha[1], Margarida Dias Duarte[1,2]

1. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Avenida da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, carina.carvalho@iniav.pt, teresa.fagulha@iniav.pt, margarida.duarte@iniav.pt
2. Centro de Investigação Interdisciplinar e Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, faas@fmv.ulisboa.pt

RESUMO

A doença hemorrágica de coelho (DHC) é uma infeção sistémica altamente contagiosa, muitas vezes letal, do coelho Europeu (*Oryctolagus cuniculus*), e um dos principais fatores do seu declínio. Atualmente, é causada pelo RHDV2 que emergiu em 2010, 28 anos após o vírus clássico, RHDV, ter sido reconhecido na Europa. Como o RHDV2 não se multiplica in vitro, o diagnóstico laboratorial depende de métodos moleculares sensíveis.

Em 2015, desenvolvemos e validámos um RT-qPCR específico para deteção de RHDV2, referenciado no manual da OIE. Foi desenhado com base em sequências de RHDV2 de estirpes de Portugal, França e Itália, disponíveis aquela data, na maioria das quais as sequências-alvo dos primers e sonda se encontravam conservadas. Nas poucas estirpes apresentando variabilidade, detetou-se apenas um mismatch por oligómero, geralmente afastado da extremidade 3, não comprometendo, por isso a hibridação.

O RHDV2 é um vírus de RNA de evolução rápida sujeito a uma variabilidade significativa que pode afetar as sequências-alvo dos oligómeros limitando a deteção das estirpes. A análise *in silico* da especificidade do sistema contra sequências de RHDV2 disponíveis a partir de 2015, confirmou que, decorridos 4 anos, o método é adequado para a deteção de estirpes recentes.

A atualização do sistema é essencial para a correta deteção e diagnóstico das estirpes. Um subconjunto destas será selecionado para integrar uma vacina contra RHDV2, comestível e segura (projeto FIGHT-TWO, PTDC / CVT-CVT / 29062/2017-PT2020). A vacina baseada em partículas de tipo viral será produzida num sistema de vetores de expressão de células de inseto-baculovírus e atualizada de acordo com a evolução do RHDV2 num sistema dinâmico aberto.

PALAVRAS-CHAVE

RT-qPCR, RHDV2, métodos moleculares, análise *in silico*

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

AMOSTRAGEM BIOLÓGICA EM VIDA NO *ORYCTOLAGUS CUNICULUS ALGIRUS* DE SANGUE DA VEIA JUGULAR EXTERNA SOB SEDAÇÃO COM MIDAZOLAM

AUTORES

Abade dos Santos, F.[1,2], Carvalho, C.L.[1], Peleteiro, M.C.[1], Gabriel, S.I.[3], Patrício, R[4], Carvalho, J. [5], Cunha, M.V.[2], Duarte, M.D.[1,2]

1. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
2. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), Laboratório de Virologia. Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal
3. Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
4. AllPets – Clínica Veterinária de Tires
5. Associação Nacional de Proprietários e Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC).

RESUMO

A amostragem em vida de coelho-bravo, uma espécie chave nos ecossistemas da Península Ibérica, é crucial para as avaliações sanitárias permitindo monitorar as populações fora do calendário de caça, limitada em Portugal a uma janela estreita de quatro meses anualmente. Devido ao declínio acentuado da espécie observado nas últimas décadas, a amostragem em vida permite obter as matrizes biológicas necessárias para análise laboratorial sem subtrair animais às populações reduzidas.
Neste método descrevemos ajustes aos protocolos de colheita de sangue da veia jugular externa (EJV) descrita para coelho doméstico para o coelho-bravo, um procedimento problemático dado o tamanho pequeno do corpo, o calibre reduzido dos vasos sanguíneos e a disposição nervosa e fragilidade.
O procedimento foi realizado em 30 animais após sedação com midazolam. Os parâmetros fisiológicos foram avaliados antes da sedação, após a sedação e antes da colheita de sangue e após a colheita de sangue, sendo que o início da sedação levou em média 7,6 ± 1,96 minuto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências respiratória e cardíaca antes e após a colheita de sangue, indicando que não houve interferência devido à venopunção. A recuperação da sedação levou em média 17,3 ± 2,17 minuto. Todos os animais foram liberados durante a primeira hora após a colheita, demonstrando que o procedimento é eficaz e seguro.

AGRADECIMENTOS

O trabalho laboratorial e de campo foi financiado pela FCT (SFRH/BD/137067/2018), CIISA, FMV-UL (UID/CVT/00276/2013), pelo projeto +Coelho (Fundo Florestal Permanente, Portugal; Dispatch no. 4757/2017 of 31st May).

|Número 72
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.

As equipas do CIBIO, ANPC e INIAV do Grupo de Trabalho +Coelho, marcaram presença no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, em Espanha, de 1 a 4 de julho.

O CICARC é uma plataforma recentemente formada, concebida para difusão da informação científica atualizada, operando a nível Ibérico. Esta plataforma pretende fomentar e dinamizar a discussão de informação e experiencias entre pares, por forma a garantir a aplicabilidade da investigação científica, através de transferência apropriada do conhecimento gerado, na resolução de problemas concretos, atuais e futuros, de ordem ambiental, sanitária, genética, tecnológica e socioeconómica, relacionados com as atividades cinegéticas.

O evento foi organizado pelo Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), e Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM), com a colaboração do CIBIO/InBIo da Universidade do Porto.



CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Da esquerda para a direita: David Gonçalves (CIBIO), João Queirós (CIBIO), Paulo Célio Alves (CIBIO), (CIBIO), Margarida Duarte (INIAV), Carina Carvalho (INIAV), Fábio Abade Santos (INIAV), João Carvalho (ANPC), David Rodrigues (ESAC), Nuno Santos (INIAV) e Sebastião Miguel (Gestor de Caça).

A presença da equipa do Projeto +Coelho envolveu 1) a participação na Comissão Científica e Organizadora do evento (Paulo Célio Alves, Nuno Santos e João Queirós, CIBIO-InBIO), 2) a participação na Mesa Redonda intitulada "*Visão Intersectorial sobre a ciência aplicada à gestão cinegética*" (João Carvalho, ANPC), 3) a apresentação de alguns temas relacionados com atividades do Projeto +Coelho 2 dirigidas à recuperação e preservação da pureza genética de espécies cinegéticas autóctones (Paulo Célio Alves, CIBIO-InBIO) e a questões relacionadas com outras espécies cinegéticas, nomeadamente a perdiz, o javali e o veado (João Queirós e Nuno Santos, CIBIO-InBIO), 4) a apresentação e discussão de vários painéis sobre questões genéticas, profiláticas e sanitárias do coelho-bravo (Carina Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Margarida Duarte, INIAV).

A Mesa Redonda "Visão Intersectorial sobre a ciência aplicada à gestão cinegética", para além de João Carvalho (ANPC), contou ainda com a participação de Germán Cáceres (Ministerio de Medio Agricultura, Pesca y Alimentación), Llanos Gabaldón (Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha), Miguel Guibert (Gobierno de Navarra) e Beatriz Arroyo (IREC), como

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.

moderadora. Para além da importância crucial da ciência para encontrar soluções para os muitos problemas que enfrentam as populações de espécies cinegéticas, a discussão centrou-se ainda na relevância da ciência enquanto referencial e fiel da balança para separar e distinguir evidências de *fakenews*, em especial num período em que informação (verdadeira e falsa) circula com tanta facilidade, formando frequentemente perceções erradas da realidade.

João Queirós (CIBIO-InBIO), fez uma apresentação oral, intitulada "*Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica*" (O14).

Nuno Santos (CIBIO-InBIO) fez uma apresentação oral intitulada "*Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica*"(O23).

Foram ainda divulgados sete painéis com os seguintes títulos:

- "*Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa*)" (P13), apresentado por João Queirós (CIBIO-InBIO).

- "*Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal*" (P14), apresentado por Paulo Célio Alves (CIBIO-InBIO);

- "*Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola*" (P16), apresentado por João Queirós (CIBIO-InBIO);

- "*Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça*" (P31), apresentado por Margarida Duarte (INIAV);

- "*Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais*

relevantes das lesões" (P32), apresentado por Fábio Abade dos Santos (INIAV);

- "*Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo*" (P33), apresentado por Carina Carvalho (INIAV);

- "*A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares*" (P37) por Nuno Santos (CIBIO-InBIO);

Esta Plataforma interativa é aberta não só à participação da comunidade científica, como também dos sectores públicos e privados interessados, abraçando contributos de índole científica relacionados com questões relativas à biologia, ecologia, biotecnologia, sanidade, monitorização, conservação e gestão dos recursos cinegéticos.

Foi anunciado que o próximo congresso do CICARC decorrerá em Portugal, em 2021.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.



REPÚBLICA PORTUGUESA

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 72
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.

As equipas do Grupo de Trabalho +Coelho do CIBIO, ANPC e INIAV, marcaram presença no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.

O CICARC é uma plataforma recentemente formada, concebida para difusão da informação científica atualizada, operando a nível Ibérico. Esta plataforma pretende fomentar e dinamizar a discussão entre pares, por forma a garantir a aplicabilidade da investigação científica, através de transferência apropriada do conhecimento gerado, na resolução de problemas concretos, atuais e futuros, de ordem ambiental, sanitária, genética, tecnológica e socioeconómica, relacionados com as atividades cinegéticas.

O evento foi organizado pelo Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e a Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM).

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.

FOTO COLETIVA

CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Da esquerda para a direita:...,....

A presença da equipa do Projeto +Coelho envolveu 1) a participação na Comissão Científica e Organizadora do evento (Paulo Célio Alves, Nuno Santos e João Queirós, CIBIO-InBIO), 2) a participação na Mesa Redonda intitulada " ... " (João Carvalho, ANPC), 3) a apresentação oral de alguns temas relacionados com atividades do Projeto +Coelho 2 dirigidas à recuperação e preservação da pureza genética de espécies cinegéticas autóctones (Paulo Célio Alves, CIBIO-InBIO) e a questões relacionadas com outras espécies cinegéticas, nomeadamente a perdiz, o javali e o veado (João Queirós, CIBIO-INBIO), 4) a apresentação e discussão de vários painéis sobre questões genéticas, profiláticas e sanitárias do coelho-bravo (Carina Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Margarida Duarte, INIAV; Nuno Santos, CIBIO-INBIO).

A Mesa Redonda "....." contou ainda com a participação de ...,...,, proporcionando uma discussão esclarecedora sobre .....

Paulo Célio Alves (CIBIO-InBIO) proferiu uma apresentação oral intitulada "Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019.

integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal" (O76).

João Queirós (CIBIO-InBIO), fez 3 apresentações orais, intituladas "Está o património genético da perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" (O73), "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (*Sus scrofa*)" (O75), e "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica" (O74).

Foram ainda divulgados quatro painéis com os seguintes títulos:

- "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça" (P31), apresentado por Margarida Duarte (INIAV);
- "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões" (P32) apresentado por Fábio Abade dos Santos (INIAV);
- "Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo" (P33), apresentado por Carina Carvalho (INIAV);
- "parasitismo?.", por Nuno Santos.

Esta Plataforma interativa, é aberta não só à participação da comunidade científica, como também dos sectores públicos e privados interessados, abraçando contributos de índole científica relacionados com questões relativas à biologia, ecologia, biotecnologia, sanidade, monitorização, conservação e gestão dos recursos cinegéticos.

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENT

|Número 73
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intitulado "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça"

Margarida Duarte, coordenadora do Grupo de Trabalho +Coelho, Investigadora do INIAV, divulgou a estratégia abordacional do Projeto +Coelho no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.



Esta divulgação, em forma de painel intitulado "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça", pretendeu divulgar na comunidade ibérica, os eixos de intervenção e os objetivos do Projeto +Coelho, que põe em pratica o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, MAFDR).

CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. João Carvalho (ANPC), Paulo Célio Alves (CIBIO-InBIO), Carina Carvalho (INIAV), Margarida Duarte (INIAV), Sebastião Miguel e F Abio Abade dos Santos (INIAV).

Apresentação de Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intitulado "Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça"

Resumo do Poster (P31), página 71 do Libro de resumenes CICARC, 2019.



I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

P.31 **Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça**

Margarida Duarte*[1], *Carina Carvalho*[1], *Fábio Santos*[1], *Madalena Monteiro*[1], *Paula Carvalho*[1], *Paula Mendonça*[1], *Teresa Albuquerque*[1], *Teresa Fagulha*[1], *Pedro Esteves*[2], *Joana Abrantes* [2], *Ana Lopes*[2], *Pedro Monterroso*[2], *Nuno Santos*[2], *Ana Serronha*[2], *João Queirós*[2], *Paulo Célio Alves*[2], *Yolanda Vaz*[3], *Rita Amador*[3], *Patrícia Tavares Santos*[4], *Ana Hora*[4], *Gonçalo Lopes*[4], *Jacinto Amaro*[5], *Fernando Castanheira Pinto*[6], *João Carvalho*[7], *António Paula Soares*[7], *Mónica Cunha*[1] & *Nuno Canada*[1]

[1]*Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), Oeiras, Portugal.*
[2]*CIBIO, Universidade do Porto, Vairão, Portugal.*
[3]*Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Lisboa, Portugal.*
[4]*Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Lisboa, Portugal.*
[5]*Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Coruche, Portugal.*
[6]*Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP). Macedo de Cavaleiros, Portugal.*
[7]*Assoc. Nac. Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Lisboa, Portugal.*
E-mail: margarida.duarte@iniav.pt

Palavras chave: coelho-bravo, lebre-ibérica, recuperação de populações, Plano Nacional.

O Ministério da Agricultura, Floresta e Desenvolvimento Rural determinou a constituição de uma parceria de 9 instituições para implementar uma estratégia de abordagem integrativa que contrariasse o efeito do vírus da doença hemorrágica do coelho 2 (RHDV2) no declínio abrupto das populações de coelhos selvagens em Portugal (despacho 4757/2017, 31 de maio). Este plano, intitulado *Plano de Ação para o Controlo do Vírus da Doença Hemorrágica de Coelho*, foi desenvolvido pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV IP), pela Autoridade Nacional de Saúde Veterinária (DGAV), pelo Instituto Nacional para Conservação (ICNF), dois institutos privados (CIBIO, OMV) e por organizações nacionais do sector da caça (FENCAÇA, ANPC e CNCP). O plano envolve também a vigilância de DHC e mixomatose em coelhos e lebres. Os eixos do plano são 1) programa de pesquisa, 2) práticas de gestão e 3) vigilância sanitária. Entre as linhas de investigação consta a identificação de espécimes naturalmente resistentes, a produção de uma vacina oral baseada em partículas de tipo viral visando aumentar a imunidade de populações selvagens à infeção por RHDV2 e o desenvolvimento de uma plataforma pública, informativa e interativa, com cartografia e informação estatística relacionada com os leporídeos disponibilizada em tempo real. Doze meses após a formulação do plano, estão a ser preparadas para implementação imediata, medidas práticas, nomeadamente, a suplementação nutricional com ração formulada para coelho-bravo em reservas de caça onde a comida natural seja escassa, a desparasitação de animais em áreas afetadas por altas cargas parasitárias, a identificação de populações resistentes com altos títulos de anticorpos para RHDV2 e a criação de santuários genéticos. O plano tem sido financiado pelo Fundo Florestal Permanente através de projetos anuais (http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos). O projeto +Coelho constitui um exemplo de interações produtivas e dinâmicas entre a comunidade científica e o setor da caça, e inspirou a criação do Centro de Competências para a Pesquisa e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade.

71

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENT

|Número 74
6 julho
2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intitulado "Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo".

Carina Carvalho, investigadora do Projecto Fight-Two (INIAV), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), divulgou a estratégia e objetivos deste Projeto no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.



O Projeto Fight-Two é dedicado ao desenvolvimento de uma vacina oral para controlo da doença hemorrágica viral, pondo em prática uma das medidas do Eixo de Investigação do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, MAFDR).

O painel, intitulou-se "Quadro estratégico FIGHT-TWO – *Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo*".

CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Carina Carvalho, DVM, PhD.

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intitulado "Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo".

Resumo do Poster (P33), página 73 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

P.33 **Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo**

Carina L. Carvalho[1], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Jorge Correia[2], Berta São Brás[2], Conceição Peleteiro[2], Elsa Duarte[3], António Mira[3], Sandra Branco[3], António Roldão[4] & Margarida D. Duarte[1,3]

[1]INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.
[2]CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
[3]ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Instituto de Formação e Investigação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal.
[4]IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal.
E-mail: carina.carvalho@iniav.pt

Palavras chave: *Oryctolagus cuniculus algirus*, coelho-bravo, RHDV2, vacina oral, VP60-VLPs.

A doença hemorrágica viral (DHV) é uma infeção sistémica altamente contagiosa, frequentemente letal, do coelho Europeu (*Oryctolagus cuniculus*), e um dos principais fatores subjacentes ao declínio da espécie, afetando predadores ameaçados que dela dependem. Atualmente, a afeção é causada pelo vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2), que emergiu em 2010 e substituiu os genogrupos do vírus clássico (RHDV, G1-G6). As vacinas comerciais disponíveis para RHDV2 são inativadas, obtidas de extratos de fígado de animais infetados, e de administração subcutânea. Além dos riscos de inativação incompleta do vírus, estas vacinas são inadequadas para coelho bravo, exigindo manipulação dos animais. A imunidade é curta e a proteção transitória. As vacinas comerciais para RHDV não conferem proteção cruzada contra RHDV2. O quadro estratégico FIGHT-TWO (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020) é o desenvolvimento e produção de uma vacina oral e segura contra RHDV2 para ser distribuída no campo como isco ou em ração seca. Tem o potencial de proteger uma ampla proporção das populações silvestres, sendo crucial para reduzir a transmissão do vírus e controlar a infeção, evitando a captura e manipulação dos animais. A vacina baseada em partículas de tipo viral será produzida em sistema de vetores de expressão de células de inseto-baculovírus (IC-BEVS) e atualizada de acordo com a evolução do vírus (sistema aberto). A parceria do projeto inclui o INIAV, laboratório de referência para doenças dos animais, duas Universidades Portuguesas de Veterinária (Évora e Lisboa) e o IBET, um instituto privado com vasta experiência no campo da produção de vacinas. O FIGHT-TWO permitirá prosseguir com uma das 12 medidas especificadas num Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral do Coelho em Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, Ministério da Agricultura), apoiando políticas de gestão mais generalistas que alavancam a recuperação das densidades populacionais de coelho-bravo, o controlo da DHV, a recuperação dos ecossistemas onde o coelho é essencial e a reativação da caça em Portugal.

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 75
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 201, intitulado "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões"

Fábio Abade dos Santos, membro da equipa do Grupo de Trabalho +Coelho do INIAV, apresentou os resultados de um estudo intitulado "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões" no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.

Este estudo comparativo dos aspetos histopatológicos decorrentes da infeção pelo vírus da mixomatose, desenvolvidos no coelho-bravo e na lebre ibérica, foi efetuado nos Laboratórios de Patologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) e da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV).



CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Fábio Abade dos Santos, DVM, MSc.

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 201, intitulado "Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões"

Resumo do Poster (P32), página 72 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

P.32 Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões

***Fábio Abade dos Santos*[1,2*], Carina L. Carvalho[1*], Madalena Monteiro[1*], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Conceição Peleteiro[2], Andreia Pinto[3], Tânia Carvalho[3], Jacinto Gomes[1], Teresa Albuquerque[1] & Margarida D. Duarte[1,2]**

[1]*Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.*
[2]*CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*
[3]*Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*
**Contribuição equivalente*
E-mail: faas@fmv.ulisboa.pt

Palavras chave: vírus da mixomatose, lebre ibérica, histopatologia, vida selvagem, barreira de espécie.

Surgiu recentemente, em agosto de 2018, um surto de mortalidade em lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) em Espanha e em outubro seguinte, em Portugal. Confirmou-se, no Laboratório Nacional de Referência-INIAV, por recurso a técnicas de biologia molecular, que o agente etiológico envolvido era o vírus da mixomatose (MYXV). Este rasteiro decorre no âmbito da avaliação sanitária que decorre à escala nacional desde 2017 (projeto +Coelho). A especificidade do MYXV para várias espécies de coelho, é conhecida há décadas, embora existam registos muito pontuais de doença na lebre-europeia. Associada a mortalidade elevada e morbilidade desconhecida, a doença afeta atualmente vários distritos do sul do nosso país e mais de 15 províncias de Espanha. Ao exame macroscópico, a ausência de mixomas cutâneos apresentou-se como a principal diferença relativamente à forma nodular de doença no coelho. A histopatologia revelou a presença de aspetos sobreponíveis aos observados no coelho, nomeadamente hiperplasia epidérmica moderada, degenerescência balonizante das células epiteliais, proliferação de células fusiformes e estelares circundadas por extensa matriz extracelular. No entanto, verificaram-se evidências de maior malignidade das lesões histopatológicas em relação ao coelho, pela presença de células fusiformes adjacentes à epiderme ulcerada, com pleomorfismo moderado, núcleos grandes e cromatina densa. Constatou-se também extensa infiltração de células heterofílicas na derme. No entanto está a ser esclarecido o eventual contributo neste quadro lesional de outros agentes patogénicos, nomeadamente bacterianos, através de técnicas como hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Os dados epidemiológicos e histopatológicos sugerem que a severidade da doença é maior na lebre-ibérica o que poderá estar relacionado com a passagem recente de barreira de espécie, que contrapõe, no caso do coelho a uma longa co-evolução e a uma tendência geral de diminuição da virulência. O trabalho laboratorial e de campo foram financiados pela FCT (Grant SFRH/BD/137067/2018), CIISA, FMV-UL (Project UID/CVT/00276/2013), e pelo projeto +Coelho (Fundo Florestal Permanente, Portugal; Dispatch no. 4757/2017 of 31 May).

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 76
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, "Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal".

Paulo Célio Alves, investigador da equipa do Projecto +Coelho (CIBIO-InBIO), financiado pelo Fundo Florestal Permanente (FFP), apresentou um Painel descrevendo uma metodologia laboratorial, baseada em 32 marcadores genéticos, que permite aferir a pureza genética de coelhos-bravos e distinguir animais geneticamente puros (*Oryctolagus cuniculus algirus*) de híbridos, sendo uma ferramenta fundamental para pôr em prática uma das medidas previstas no Eixo de Gestão do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, MAFDR).

Esta apresentação decorreu no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que se realizou no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.



O painel intitulou-se "*Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal*".

CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Paulo Célio Alves, PhD (Biology).

Apresentação de Painel no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019; "3 Selvagem ou doméstico? algirus ou cuniculus? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal".

Resumo do Poster (P14) 3), página 54 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

P.14 **Selvagem ou doméstico? *algirus* ou *cuniculus*? uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal**

***João Queirós*[1], *Miguel Carneiro*[1], *Susana Lopes*[2] & *Paulo Célio Alves*[1,2,3]**
[1]*CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus de Vairão, Portugal.*
[2]*Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal.*
[3]*Wildlife Biology Program, University of Montana, Missoula, USA.*
E-mail: pcalves@fc.up.pt

Palavras-chave: *Oryctolagus cuniculus cuniculus, Oryctolagus cuniculus algirus*, Península Ibérica, SNPs, índice de hibridação.

O coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) é considerado uma espécie-chave nos ecossistemas mediterrânicos e uma das espécies de caça menor mais apreciadas na Península Ibérica. Ao longo das últimas décadas, no entanto, as populações naturais sofreram acentuadas flutuações na abundância e distribuição como consequência da perda de habitat, doenças infeciosas, elevada predação e sobre-exploração cinegética. Numa tentativa de ultrapassar o declínio contínuo das populações selvagens, têm sido realizadas operações de repovoamento com coelhos criados em cativeiro por toda a Península Ibérica, sem quaisquer preocupações relativamente à preservação do património genético das populações de coelho-bravo, particularmente das duas subespécies: *O.c. cuniculus* e *O.c. algirus*. Sabe-se que estas subespécies coexistem na Península Ibérica há mais de dois milhões de anos, estando atualmente a subespécie *algirus* localizada na parte sudoeste da Península Ibérica e a subespécie *cuniculus* no nordeste da Península Ibérica e no Sul de França. O coelho doméstico deriva da subespécie *O.c. cuniculus*. De modo a promover a conservação da integridade genética das populações ibéricas de coelho-bravo, desenvolvemos um painel de 32 marcadores (SNPs, polimorfismos de nucleótidos únicos), para distinguir coelhos-bravos de coelhos domésticos (n=8), bem como *O.c. cuniculus* de *O.c. algirus* (n=24). Os SNPs foram escolhidos com base no padrão de diagnóstico estimado entre indivíduos amostrados das duas subespécies fora da zona híbrida, no centro da Península Ibérica, ou em diferenças marcadas de frequências alélicas dos SNPs entre subespécies (>80%). Estes marcadores foram otimizados em duas multiplexes. O índice de hibridação e valores de corte foram inferidos usando amostras de referência das raças domésticas mais comuns e de várias populações selvagens amostradas por toda a distribuição geográfica de ambas subespécies. Esta nova análise genética é mais eficiente e precisa, potenciando a preservação do património genético das populações ibéricas de coelho-bravo, em particular das populações da subespécie *O.c. algirus*.

Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 77
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação em Mesa Redonda intitulada "Visão Intersectorial sobre a ciência aplicada à gestão cinegética" que decorreu no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 3 de julho, 2019

João Carvalho, Secretário Geral da Associação Nacional de Proprietários Rurais e Biodoversidade e membro da equipa do Projecto +Coelho financiado pelo Fundo Florestal Permanente (FFP), participou na Mesa Redonda intitulada "*Visão Intersectorial sobre a ciência aplicada à gestão cinegética*" que decorreu no Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que se realizou no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho.

A Mesa Redonda foi moderada por Beatriz Arroyo (IREC) e contou ainda com a participação de Germán Cáceres (Ministerio de Medio Agricultura, Pesca y Alimentación), Llanos Gabaldón (Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha) e Miguel Guibert (Gobierno de Navarra).

O debate desenvolveu-se em torno do papel crucial da ciência na identificação de soluções para os muitos problemas que as populações de espécies cinegéticas enfrentam e na sua relevância para elucidar e contradizer *fakenews*, cada vez mais frequentes numa época em que informação (verdadeira e falsa) circula muito rapidamente nos meios de comunicação social, conduzindo frequentemente a perceções distorcidas e erradas da realidade.

Participação em Mesa Redonda intitulada "Visão Intersectorial sobre a ciência aplicada à gestão cinegética" que decorreu *no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 3 de julho, 2019*



CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Da esquerda para a direita.

Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 78
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica ", "Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)".

No Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho, João Queirós, investigador do CIBIO-InBIO e membro da equipa do Projeto +Coelho, apresentou também três estudos sobre a utilização das ferramentas genéticas para o estudo, monitorização e gestão das espécies cinegéticas, bem como para a preservação do seu património genético autóctone.

Preservar o património genético de uma espécie ou população é essencial para manter a sua viabilidade e sustentabilidade a médio e longo prazo. No entanto, o património genético das espécies cinegéticas encontra-se seriamente ameaçado pelo declínio generalizado das populações e a crescente intensificação da gestão dos recursos cinegéticos. Más práticas de gestão, como a solta de animais exóticos [não nativos da Península Ibérica; p. ex. veado (*Cervus elaphus*) europeu com maior troféu], de animais cruzados com animais exóticos [p. ex. híbridos de perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) com perdiz-chukar (*Alectoris chukar*], ou de animais cruzados com animais domésticos [p. ex. híbridos de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) com coelho doméstico], representam uma ameaça constante ao património genético das populações autóctones adaptadas ao ecossistema.

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas " "*Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica* ", "*Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)"*.

Na comunicação oral intitulada "*Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica* ", João Queirós apresentou o impacto das introduções de animais exóticos no património genético das populações autóctones de veado, demonstrando que a hibridação /introgressão está dispersa pela Península Ibérica, varia entre populações, não é influenciada pelo distintos sistemas de gestão cinegética, e parece não influenciar os padrões atuais de diversidade genética das populações.

Na comunicação em painel intitulada "*Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola*", João Queirós apresentou o panorama atual do património genético das populações portuguesas de perdiz-vermelha na região de Mértola e concelhos limítrofes, revelando que cerca de 46% das perdizes analisados apresentam pelo menos um alelo de perdiz-chucar, e que os níveis de hibridação são mais elevadas em zonas de caça turística.

Na comunicação em painel intitulada "*Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)*", foi apresentado dois exemplos da utilização de ferramentas genéticas não invasivas para a monitorização das populações e o estudo da dieta do javali na Península Ibérica.

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica ", "Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)".

CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. João Queirós, DVM, PhD.

Resumo da Comunicação oral (O74), página 18 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica

***João Queirós*[1], Christian Gortazar[2] & Paulo Célio Alves[1,3,4]**
[1]CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus de Vairão, Portugal.
[2]SaBio Research Group, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain.
[3]Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal.
[4]Wildlife Biology Program, University of Montana, Missoula, USA.
E-mail: joao.Queiros@cibio.up.pt

Palavras-chave: *Cervus elaphus*, gestão populacional, diversidade genética, introgressão/hibridação.

A história evolutiva do veado (*Cervus elaphus*) tem sido modelada por fenómenos biogeográficos de grande escala e pela influência antropogénica. Na Península Ibérica, embora o padrão filogeográfico atual seja profundamente marcado pelos ciclos glaciares do Pleistoceno, os fatores mediados pelo Homem parecem influenciar o património genético das populações ibéricas de veados, nomeadamente pela introdução de genes exóticos em populações naturais. Neste estudo, pretendemos i) quantificar a extensão da hibridização e introgressão entre as populações de veados ibéricos; ii) avaliar a influência dos sistemas de gestão cinegética nos padrões atuais de hibridização e introgressão; e, iii) compreender como a hibridação e a introgressão moldam os padrões atuais de diversidade genética nas populações. Para atingir estes objetivos, 47 populações de veado foram amostradas por toda a Península Ibérica, o que incluiu populações com três tipos de gestão cinegética: cercadas, livres e protegidas. Além disso, nove populações de veado foram amostradas em toda a Europa e usadas como referência para populações europeias nas análises. No total, 1307 amostras foram genotipadas para um conjunto de 11 microssatélites altamente polimórficos e sequenciadas para um fragmento do gene D-loop do ADN mitocondrial. Utilizou-se uma abordagem Bayesiana para classificar os indivíduos como nativos ou híbridos (nativos x exóticos). A proporção de hibridização e/ou introgressão com alelos exóticos foi comparada entre as populações dos três tipos de gestão cinegética, bem como foi avaliado o seu impacto nas estimativas de diversidade genética. Além disso, discutiremos como a prática comum de introdução de veados exóticos para melhorar os troféus de caça pode ter um impacto negativo no património genético das populações autóctones de veado, e, por conseguinte, na disrupção de genes-adaptados aos ecossistemas ibéricos ao longo de milhares de anos.

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica ", "Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)".

Resumo da Comunicação em painel (P73), página 54 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

Está o património genético da perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola

***João Queirós*[1], *Marisa Rodrigues*[1], *Susana Lopes*[1], *David Gonçalves*[1,2], *José Davila*[3] & *Paulo Célio Alves*[1,2,4]**

[1]*CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Vairão, Portugal.*
[2]*Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal.*
[3]*IREC, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain.*
[4]*Wildlife Biology Program, University of Montana, Missoula, USA.*
E-mail: joao.Queiros@cibio.up.pt

Palavras-chave: monitorização genética, hibridação, certificação genética, recursos genéticos autóctones.

A perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) é uma das aves de caça mais apreciadas na Península Ibérica. Nas últimas décadas as populações naturais têm sofrido declínios acentuados na abundância e distribuição como consequência da perda de habitat (devido à intensificação das atividades agrícolas) e da sobre-exploração cinegética. Na tentativa de contrariar o contínuo declínio das populações selvagens, milhões de perdizes-vermelhas criadas em cativeiro têm sido libertadas por toda a Península Ibérica a cada ano, sem qualquer preocupação com a preservação do património genético das populações selvagens. Embora em Espanha a hibridação antropogénica de perdiz-vermelha e perdiz-chucar (*Alectoris chukar*) esteja bem documentada, pouco se conhece sobre o atual estado do património genético das populações portuguesas de perdiz-vermelha. Para avaliar as características genéticas das perdizes portuguesas, e determinar o nível de hibridação antropogénica, estudámos a região de caça mais importante em Portugal para espécies de caça menor, a região de Mértola (sudeste de Portugal). Foram amostrados mais de 1500 indivíduos caçados entre outubro de 2018 e janeiro de 2019 em zonas de caça localizadas na região de Mértola e zonas envolventes. O número de indivíduos recolhido por zona de caça variou de acordo com seu tamanho, aproximadamente entre 10 (para 100-1000 ha) e 40 (para mais de 3000 ha). Para caracterizar o perfil genético de cada indivíduo como *A. rufa* ou híbrido de *A. rufa* x *A. chuckar* utilizou-se um conjunto de marcadores de DNA nuclear e mitocondrial já publicados. Os resultados demonstram a presença generalizada de híbridos na região de Mértola, com as populações das zonas de caça a apresentarem diferentes níveis de hibridização. Além disso, obtivemos um mapa de interpolação com o gradiente de hibridação ao longo da área de estudo que será discutido à luz dos possíveis fatores ambientais e de gestão cinegética que determinam este gradiente. Os resultados obtidos evidenciam a urgente necessidade de implementar ações para preservar o património genético das populações portuguesas de perdiz-vermelha.

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Compreender a influência antropogénica no património genético do veado na Península Ibérica ", "Está o património genético da perdiz-vermelha (Alectoris rufa) ameaçado em Portugal? O caso de estudo na região de Mértola" e "Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (Sus scrofa)".

Resumo da Comunicação em painel (P75), página 51 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

Otimização de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir as populações de javali (*Sus scrofa*)

Luís Luzia[1], João Queirós[2], Joaquín Vicente[3], Pelayo Acevedo[3], Susana Lopes[2], Christian Gortázar[3], Joana Paupério[2] & Paulo Célio Alves[1,2,4]

[1]Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal.
[2]CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus de Vairão, Portugal.
[3]SaBio Research Group, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain.
[4]Wildlife Biology Program, University of Montana, Missoula, USA.
E-mail: joao.Queiros@cibio.up.pt

Palavras-chave: monitorização, identificação individual, genética não-invasiva, dieta, DNA metabarcoding.

Espécies elusivas como o javali (*Sus scrofa*) são difíceis de monitorizar usando abordagens tradicionais de ecologia, o que eleva a preocupação sobre a correta gestão das populações selvagens. Na Península Ibérica, o javali encontra-se amplamente distribuído, desde as regiões Mediterrânicas às regiões Atlânticas/Alpinas, com uma tendência populacional crescente nas últimas décadas. Este acentuado aumento populacional coloca várias ameaças, nomeadamente, na saúde animal (p.e. doenças infeciosas), na segurança humana (p.e. colisão de carros) e na biodiversidade (p.e. devido à predação de outras espécies selvagens). Assim, para avaliar a abundância populacional de javali e o seu impacto nos ecossistemas, utilizaram-se amostras não-invasivas (excrementos) e métodos moleculares para confirmar a identificação da espécie, identificar os indivíduos e determinar o sexo, com o objetivo de estimar a abundância populacional através de modelos estatísticos espacialmente explícitos. Além disso, otimizou-se uma metodologia para caracterizar a dieta de javali através da análise de DNA dos excrementos. Até ao momento, analisaram-se 69 amostras de excrementos da região de Castilla-la-Mancha e do Parque Nacional de Doñana, das quais 41 amplificaram para marcadores mitocondriais, permitindo a identificação da espécie. De 32 amostras identificadas como javali, 29 amplificaram para um conjunto de 13 microssatélites. A probabilidade de identidade foi estimada com 13 microssatélites usando uma base de dados de referência de mais de 400 javalis e suínos domésticos genotipados na Península Ibérica. Finalmente, a dieta dos 29 javalis identificados foi caracterizada amplificando dois marcadores moleculares: i) trnl para identificar as plantas consumidas; e ii) COI para identificar os metazoa. O papel do javali no ecossistema ibérico e o uso de ferramentas genéticas não-invasivas para estudar e gerir esta espécie são discutidas. Os resultados obtidos apoiam a inclusão de ferramentas genéticas não-invasivas nas metodologias para monitorizar e gerir as populações selvagens de javali.

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENT

|Número 79
6 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas ”Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica” e “A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares”.

No Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), que decorreu no edifício Luís Arroyo da Universidade de Castilla-La Mancha na Cidade Real, Espanha, de 1 a 4 de julho, Nuno Santos, investigador do CIBIO-InBIO e membro da equipa do Projeto +Coelho, apresentou também dois estudos sobre a epidemiologia da tuberculose em ungulados selvagens.

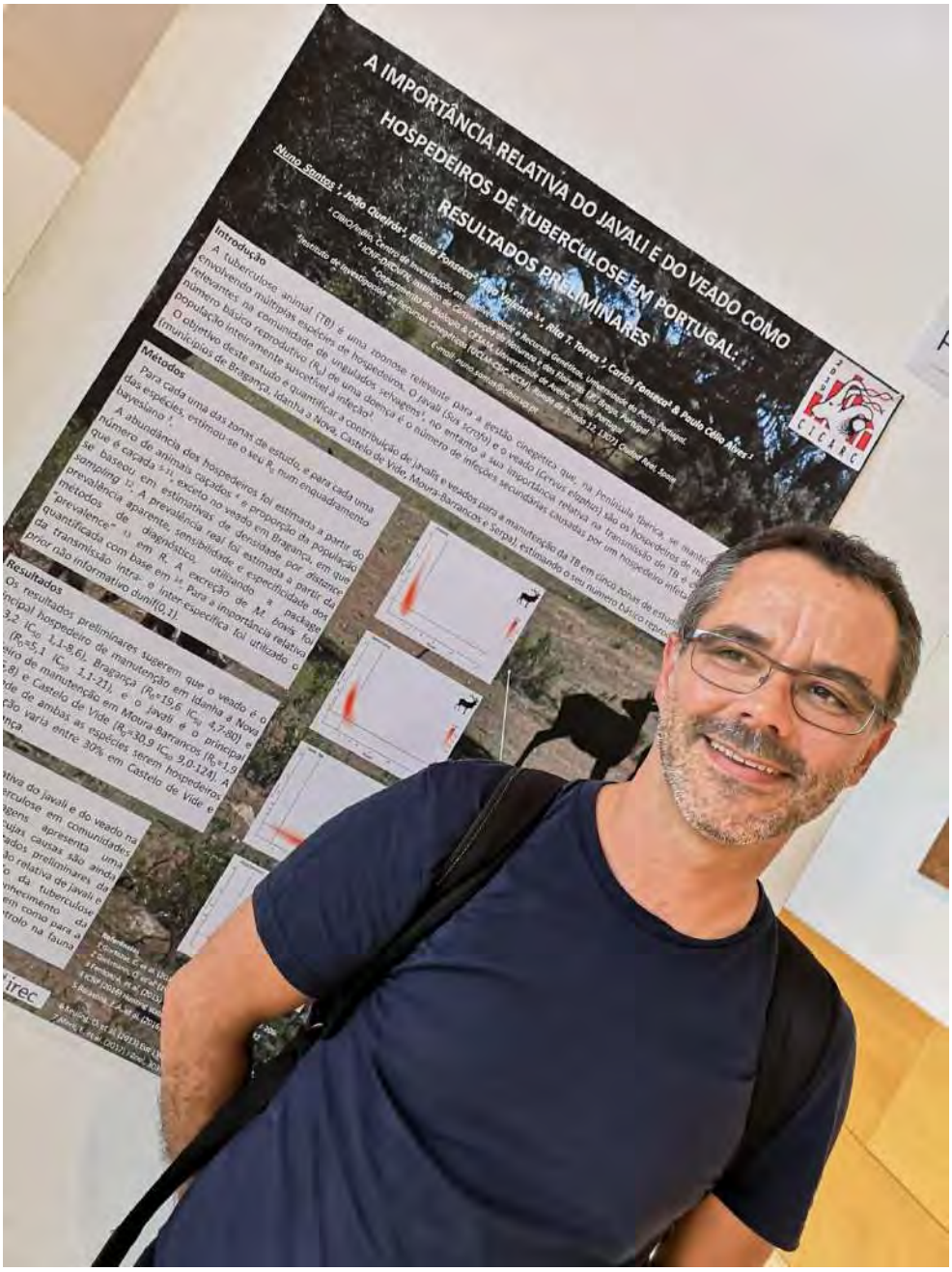
Os casos de tuberculose natural em leporídeos silvestres têm sido reportados muito esporadicamente em lebre europeia, não sendo por isso uma preocupação atual. No entanto, em outras espécies cinegéticas como o javali e o veado, a tuberculose assume proporções preocupantes, por constituir uma fonte de infeção para o gado doméstico nas áreas de co-habitação/simpatria e para o homem, através do contacto, manipulação ou ingestão de carne de animais infetados.

Na comunicação oral intitulada “*Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica*”, Nuno Santos apresentou a estimativa do número de animais infetados por tuberculose na Península Ibérica, demonstrando que o número de animais selvagens e domésticos não-bovinos infetados é muito superior ao de bovinos infetados.

Na comunicação em painel intitulada “*A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares*”, foi demonstrado que em nalgumas regiões do país o javali, e noutras regiões o

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica" e "A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares".

veado, são os principais hospedeiros de manutenção da tuberculose em populações de ungulados selvagens.



CICARC, Cidade Real, 4 de julho de 2019. Nuno Santos, DVM, PhD.

Apresentações no I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), Cidade Real, 1 a 4 de julho, 2019, intituladas "Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica" e "A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares".

Resumo da Comunicação oral (O23), página 28 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

O.23 Quantificação da comunidade de hospedeiros de tuberculose animal na Península Ibérica

***Nuno Santos*[1], *Joaquín Vicente*[2], *José de la Fuente*[2], *Paulo Célio Alves*[1] & *Christian Gortázar*[2]**

[1]*CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal.*

[2]*SaBio (Sanidad y Biotecnologia), IREC, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, España.*

E-mail: nuno.santos@cibio.up.pt

Palavras chave: tuberculose animal, doença multi-hospedeiros, Península Ibérica, epidemiologia quantitativa.

A tuberculose animal é uma doença de importância económica para a pecuária, sujeita a programas de erradicação em bovinos. Apesar do sucesso do controlo da tuberculose nos bovinos, a tendência nos últimos anos foi de um ligeiro aumento da prevalência. Evidências epidemiológicas apontam para a importância da fauna selvagem e espécies domésticas na transmissão da tuberculose aos bovinos. Estudos observacionais e experimentais provam a manutenção da TB na Península Ibérica num sistema multi-hospedeiros. Neste trabalho, o nosso objetivo é caracterizar quantitativamente a comunidade de hospedeiros na Península Ibérica, estimando o número de animais selvagens infetados por tuberculose. A prevalência real foi estimada com base na prevalência aparente, sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos e combinada num contexto bayesiano com dados de abundância dos hospedeiros, para obter a distribuição posterior do número de hospedeiros infetados. Uma abordagem geograficamente estruturada foi utilizada para espécies selvagens devido às grandes diferenças regionais na prevalência ou na abundância previamente descritas nestas espécies. Estimamos que o número de animais infetados por tuberculose na Península Ibérica seja de 225,760 – 1,295,162. As estimativas de espécies não bovinas infetadas excedem a de bovinos infetados, com uma relação de 92,8 (IC_{95} 22,1 – 955).Estes resultados corroboram a ideia de que na Península Ibérica a tuberculose é uma doença mantida por uma comunidade de hospedeiros domésticos e silvestres. A procura por ferramentas de controle inovadoras e a combinação de múltiplas abordagens para diminuir a prevalência de infeção nas principais espécies hospedeiras precisarão ser fortalecidas, na linha da estratégia prevista no PATUBES.

Resumo da Comunicação em painel (P37), página 77 do Libro de resumenes CICARC, 2019.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

P.37 A importância relativa do javali e do veado como hospedeiros de tuberculose em Portugal: resultados preliminares

***Nuno Santos*[1], *João Queirós*[1], *Eliana Fonseca*[2], *Ana Valente*[3,4], *Rita T. Torres*[3], *Carlos Fonseca*[3] & *Paulo Célio Alves*[1]**

[1]*CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal.*

[2]*ICNF-DCNFN, Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas I.P., Braga, Portugal.*

[3]*Departmento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.*

[4]*Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (UCLM-CSIC-JCCM), Ronda de Toledo 12, 13071 Ciudad Real, Spain.*

E-mail: nuno.santos@cibio.up.pt

Palavras chave: tuberculose animal, *Sus scrofa*, *Cervus elaphus*, hospedeiro de manutenção, número básico de reprodução.

A tuberculose animal é uma zoonose relevante para a gestão cinegética, que na Península Ibérica se mantém num sistema envolvendo múltiplos hospedeiros. O javali e o veado são os hospedeiros de manutenção mais relevantes na comunidade de ungulados selvagens, no entanto a sua importância relativa é desconhecida. O objetivo deste estudo é quantificar a contribuição de javalis e veados para a manutenção da tuberculose animal em cinco zonas de estudo em Portugal (municípios de Bragança, Idanha a Nova, Castelo de Vide, Moura-Barrancos e Serpa).Para cada uma das espécies estimou-se o seu número básico de reprodução da tuberculose (R_{0j} em cada uma das zonas de estudo, usando um enquadramento bayesiano. Os resultados preliminares sugerem que o veado é o hospedeiro de manutenção em Idanha a Nova (R_0=3,2 IC_{50} 1,1-8,6), Bragança (R_0=19,6 IC_{50} 4,7-80) e Serpa (R_0=5,1 IC50 1,1-21), e o javali é o hospedeiro de manutenção em Moura-Barrancos (R_0=1,9 IC_{50} 0,7-5,8) e em Castelo de Vide (R_0=30,9 IC_{50} 9,0-124). A probabilidade de ambas as espécies serem hospedeiros de manutenção varia entre 30% em Castelo de Vide e <1% em Bragança. A importância relativa do javali e do veado na manutenção da tuberculose em comunidades de ungulados selvagens apresenta variabilidade espacial, cujas causas são ainda desconhecidas. Os resultados preliminares da quantificação da contribuição relativa de javali e veado para a manutenção da tuberculose contribuem para o conhecimento da epidemiologia desta doença, bem como para a avaliação de estratégias de controlo na fauna selvagem.

"Projeto+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 80
9 julho 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019



A convite do Presidente da Federação de Caçadores do Algarve, Vitor Bota Palmilha, o Grupo de Trabalho +Coelho, esteve presente na XXIII edição da Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza que decorreu de 5 a 7 de julho, na Marina de Albufeira.

A organização esteve a cargo da Federação de Caçadores do Algarve e do Município de Albufeira que, juntamente com a Marina de Albufeira, aceitaram acolher este evento no espaço da marina, também apoiado pela Região de Turismo do Algarve, Agência de Promoção de Albufeira (APAL) e Crédito Agrícola de Albufeira.

Na inauguração estiveram presentes, o autarca da Câmara Municipal de Albufeira, José Carlos Rolo, o Presidente da Federação de Caçadores do Algarve - Vítor Palmilha, o Administrador da Marina de Albufeira - José Morais, a Subdiretora da Direção Geral de Alimentação e Veterinária - Graça Mariano, o presidente do ICNF- Nuno Banza, o Diretor Regional de Agricultura e Pescas do Algarve - Pedro Valadas Monteiro, o Presidente da Mesa da Assembleia Geral da Federação dos Caçadores - Fernando Medronho, o Presidente da Assembleia Municipal da Câmara de Albufeira - Paulo Freitas, o Diretor Regional do ICNF Algarve -

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019

Castelão Rodrigues, assim como outros Presidentes de Câmara e Autarcas do Algarve, Entidades Regionais e Forças de Segurança.

Foi denominador comum dos discursos de todos os oradores, a satisfação e orgulho pela concretização de uma Feira de Caça e Pesca de grande dimensão e qualidade em Albufeira, não obstante as dificuldades sentidas, e o reconhecimento da importância que as atividades cinegéticas, do turismo, e da natureza têm para a dinamização da economia do Algarve, particularmente no período do inverno.



Inauguração da XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, 5 de julho de 2019, Marina de Albufeira. Da esquerda para a direita: Pedro Valadas Monteiro (Diretor Regional de Agricultura e Pescas do Algarve), Castelão Rodrigues (Diretor Regional do ICNF Algarve), Graça Mariano (Sub-directora da DGAV), Nuno Banza (Presidente do ICNF), Fernando Medronho (Presidente da mesa da Assembleia geral da Federação de Caçadores do Algarve), José Rolo (Presidente da Câmara de Albufeira), José Morais (Administrador da Marina de Albufeira), Paulo Freitas (Presidente da Assembleia Municipal da Câmara de Albufeira), Vitor Palmilha (Presidente da Federação de Caçadores do Algarve).

Para além de 113 expositores interiores e 78 exteriores, divulgando marcas e produtos relacionados com os setores temáticos do evento, a XXIII Feira de Caça, Pesca Turismo e Natureza proporcionou ainda diversas atividades como demonstrações de caça, demonstrações de cães de parar, exposições de animais (coelhos, cães, raças autóctones como a ovelha churra algarvia, aves de rapina, patos e animais exóticos), atividades equestres e de falcoaria, concursos e atividades de pesca, tiro aos pratos, artesanato, exposição de máquinas agrícolas e concursos gastronómicos de mel do Algarve de doçaria regional.

No dia 6 decorreu ainda uma Mesa Redonda dedicada ao Turismo e Citricultura com o tema “Exportar cá dentro”.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019

No domingo, dia 7, foi realizado um Colóquio de "Gestão e Sanidade de Espécies Cinegéticas", que teve lugar no Hotel Nau São Rafael Atlântico.

O Grupo de Trabalho +Coelho esteve presente neste colóquio, representado por Margarida Duarte, que divulgou as suas atividades e resultados alcançados nos dois últimos anos do Projeto +Coelho.



Margarida Duarte (INIAV) apresentando o Projecto +Coelho no Colóquio"Gestão e Sanidade de Espécies Cinegéticas", 7 de julho, Hotel Nau, Albufeira.

O colóquio foi moderado por António Miranda, Diretor do Departamento Regional de Gestão e Valorização Vegetal (ICNF) e nele participaram também Paulo Célio Alves (CIBIO-InBIO) e Gonçalo Lopes (ICNF), parceiros do Projeto +Coelho, e ainda Carlos Rouco (IESA/CSIC), Graça Mariano (DGAV), Mónica Cunha (INIAV) e António Bea (Ekos Estudos Ambientais, SLU).



Vitor Bota Palmilha (Presidente da Federação de Caçadores do Algarve, uma Federação da CNCP, Miguel Freitas (Secretário Geral das Florestas e Desenvolvimento Rural), José Rolo (Presidente da Câmara de Albufeira, no encerramento do Colóquio, 7 de julho, Hotel Nau, Albufeira.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho na XXIII Feira de Caça, Pesca, Turismo e Natureza, realizada em Albufeira, 5 a 7 de julho, 2019

O colóquio foi encerrado pelo Presidente da Câmara José Rolo, Presidente da Federação de Caça do Algarve Vitor Palmilha, e Secretário de Estado das Florestas e Desenvolvimento Rural, Miguel Freitas.

Durante os 3 dias, a Feira acolheu cerca de 40 mil visitantes, que, para além de todas as atividades já mencionadas, tiveram também à disposição apresentação de livros e concertos.

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

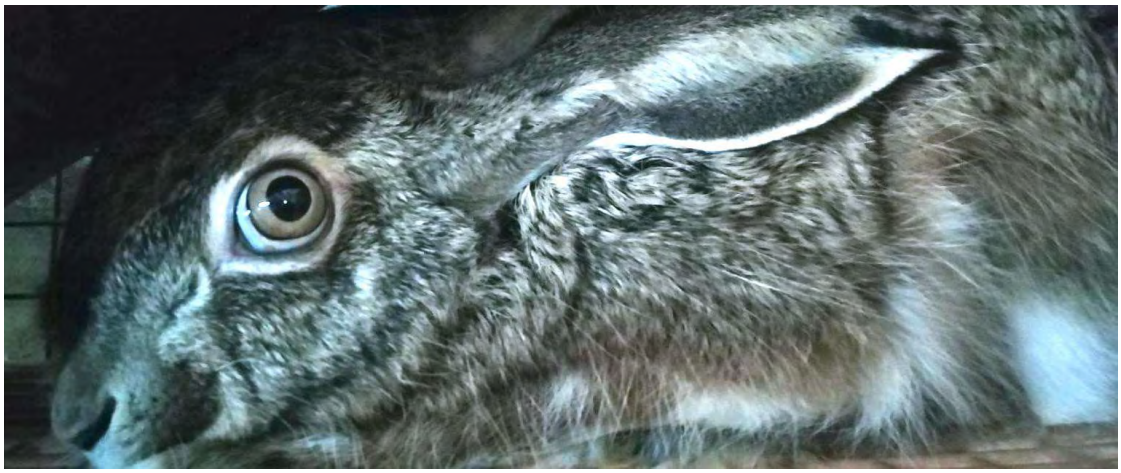
Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

| Número 81
29 agosto 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Implementação da Medida 7.6 do Projeto +Coelho 2: ***Ensaio de Vacinação em lebre-ibérica***

Face à elevada mortalidade de lebre-ibérica por mixomatose, que ocorre em muitas provincias de Espanha desde julho de 2018, e em Portugal desde outubro do mesmo ano, foi considerado importante esclarecer se as vacinas comerciais contra a mixomatose, atualmente disponiveis no mercado para coelho doméstico, são também eficazes no controlo desta doença em lebre.



Lebre-ibérica (Lepus granatensis). Fotografia de Fábio Abade dos Santos.

Sabe-se já que o vírus que infeta atualmente as lebres, é geneticamente diferente (vírus mutante) do vírus da mixomatose que circula nas populações de coelhos-bravos, e que essas diferenças não se localizam na região do código genético viral que determina a sua estrutura exterior, e que é aquela predominantemente reconhecida pelo sistema imunitário durante a infeção dos animais. É por isso expectável que o vírus da

mixomatose dos coelhos e este virus mutante se comportem do mesmo modo enquanto imunogéneos vacinais desencadeadores duma resposta imunitária.

A revelarem-se capazes de induzir uma resposta protetora na lebres, estas vacinas desenvolvidas para coelhos podem constituir ferramentas fundamentais para salvaguardar a preservação de sub-populações desta espécie em refúgios genéticos a desenvolver no futuro.

Nesse sentido, foi previsto um ensaio de vacinação em lebre-ibérica com vacinas comerciais para coelho-bravo, contendo o vírus da mixomatose e o vírus do Fibroma de Shope, e uma autovacina preparada a partir de tecidos de uma lebre infetada. Este ensaio é uma das medidas identificadas no Projeto +Coelho 2, intitulado ***Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal***, financiado pelo Fundo Florestal Permanente.

Para o ensaio de vacinação é necessário reunir cerca de 26 exemplares de lebre-ibérica (quatro grupos de 5 a 7 animais), seronegativas para mixomatose. Uma vez que não existem cercados de reprodução do nosso país, a obtenção destes animais requer a sua captura no campo. Estas capturas carecem de autorização prévia pelo ICNF.

Durante a quarentena e a vacinação, os exemplares serão mantidos na Quinta do Infesto e Almiara, situada em Torres Vedras, após emissão de autorização para deteção de animais para fins científicos, por parte do ICNF.

Participação do Grupo de Medida 7.6 do Projeto + Medida 7.6 do Projeto +Coelho 2: Ensaio de Vacinação em lebre-ibérica

O incremento dos casos de mixomatose confirmados laboratorialmente no laboratório de Referência para a Saúde Animal do INIAV, e os inúmeros relatos escritos e fotográficos de animais infetados que nos chegam, indicam que a doença se encontra ainda em expansão.



Fotografia de lebre-ibérica com mixomatose da autoria de Pedro Ribeiro, captada a 19.09.2019.

A disseminação do vírus pelo território nacional, pode vir a dificultar grandemente a identificação de animais seronegativos, i.e. que não tenham ainda contactado com o vírus, uma condição essencial para poderem ser incluidos no ensaio.

Nesse sentido, serão iniciadas muito brevemente capturas de lebres em zonas de caça do Alentejo e Algarve. As capturas são efetuadas com recurso a redes de tresmalho.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 82
2 setembro 2019

1º Evento de captura de lebre-ibérica, realizado em Canhestros a 31 de agosto de 2019

No âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2 compreendendo um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84), decorreu no dia 31 de agosto na Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, processo nº 6309, localizada em Canhestros, Ferreira do Alentejo, o primeiro Evento de Captura de lebre.

A captura foi organizada pelo Presidente desta ZCA, o Sr. Sérgio Gamito e contou com a colaboração do Eng. Duarte Nuno (ICNF) e de Sebastião Miguel (Gestor de Caça).



Presidente da Zona de Caça Associativa (ZCA) Bate de Água, Sérgio Gamito

1º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Canhestros a 31 de agosto de 2019










Participantes na colocação das redes e no final da batida.

1º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Canhestros a 31 de agosto de 2019



Foram batidas duas zonas com a ajuda de voluntários recrutados pelas várias instituições participantes, nomeadamente a ZCA Bate de Água, o INIAV e o ICNF.



O Grupo de Trabalho +Coelho, agredeçe a todos os participantes o esforço dispendido e a boa vontade com que participaram neste evento.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

| Número 83

6 setembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no ***2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"***

No dia 4 de Setembro, a equipa do Projecto +Coelho voltou a participar no segundo Campo de Férias sobre **"CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"**, que decorreu de 1 a 6 de setembro na Herdade da Barroca D'Alva em Alcochete em Portugal.



Este ano, o programa contou com a presença de várias organizações especialistas em conservação da natureza como a Associação Portuguesa de Falcoaria, a Associação Natureza Portugal/World Wildlife Fund (ANP-WWF), e a Liga Para a Proteção da Natureza (LPN).

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no ***2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"***

Este evento, com a iniciativa e organização da ANPC, contou novamente com a participação do INIAV. Estas duas organizações/instituições, são parceiras do Grupo de Trabalho +Coelho, uma parceria que inclui ainda a DGAV, o ICNF, a FENCAÇA, a ANPC, o CIBIO-Inbio, o iBET e a OMV, com o objectivo conjunto de encontrar estratégias para o controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos.

Fábio Abade dos Santos (Mestre) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV), ambos médicos veterinários, trouxeram a este Campo de Férias uma visão sobre os aspectos morfolóficos, fisiológicos e sanitários das espécies cinegéticas.

A equipa do INIAV foi auxiliada pelo Gestor de Caça Sebastião Miguel, e teve a seu cargo um atelier com diversas espécies cinegéticas, nomeadamente o pato-real (*Anas platyrhynchos*), o faizão-comum (*Phasianus colchicus*), a perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*), a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*) e exemplares de furão (*Mustela putorius furo*). Os furões podem ser usados, em condições especiais devidamente autorizadas, na captura de exemplares vivos de coelho-bravo com vista, por exemplo, a colheita de material biológico em vida.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no **2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"**





Margarida Duarte e Fábio Abade dos Santos manipulando exemplares de pato-real durante a intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho no Campo de Férias da ANPC.



Crianças segurando um furão (Mustela putorius furo).

As crianças tiveram oportunidade de conhecer, ver e tocar nos animais e aprender sobre a sua morfologia, dimorfismo sexual, comportamentos e preferências de habitats.



Fábio Abade dos Santos introduzindo a espécie coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus) junto das crianças.



Fotografias ilustrativas de vários momentos da intervenção do Grupo de Trabalho +Coelho no Campo de Férias da ANPC.

Aprenderam também sobre os cuidados necessários para manipular cada uma destas espécies, e assistiram a alguns atos médicos como a auscultação, colheita de sangue da veia marginal da asa, ou ao procedimento da colheita de conteúdo do papo de um pato-real com uma zaragatoa.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no ***2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"***

Puderam ainda ouvir sobre alguns dos problemas sanitários que mais as afetam, dando-se como exemplo a gripe aviária e a doença hemorrágica viral dos coelhos.



À esquerda, Fábio Abade dos Santos mostrando às crianças um exemplar jovenil de coelho-bravo (O. c. algirus. À direita, João Carvalho mostrando um exemplar fêmea de pato-real.

No campo de férias participaram ainda o Canil da Maralha e personalidades com atividade em áreas distintas, desde a avaliação de provas (Santo Huberto e de Cães de parar) à divulgação e promoção da atividade cinegética e biodiversidade junto ao sector e à sociedade civil, através de artigos, livros e fotografia.

As inscrições para esta atividade esgotaram, não obstante o número de participantes tenha sido reforçado.

O interesse e entusiasmo das crianças demonstra a pertinência e importância destas acções na sensibilização da camada jovem para a relevância da atividade Cinegética no nosso país e para a necessidade de preservar o património vivo das nossa especies autóctones e a Biodiversidade.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no ***2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"***





Fotografias do momento da libertação dos exemplares de perdiz-vermelha (Alectoris rufa) (em cima) e pato-real (Anas platyrhynchos) (em baixo).





Fábio Abade dos Santos e Sebastião Miguel durante uma das suas intervenções no evento.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no ***2º CAMPO DE FÉRIAS ANPC – "CAÇA, CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E BIODIVERSIDADE"***

O grupo +Coelho agradece a Sebastião Miguel a disponibilização dos exemplares de coelhos, lebres e furões utilizados na desmonstração, bem como à empresa CAÇABRAVA pela disponibilização dos casais de perdiz, faisão e pato-real.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 84
6 setembro 2019

Recomendações práticas para a redução da transmissão da mixomatose em lebre-ibérica

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, constante na lista da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE). O seu agente causal, o vírus da mixomatose, infeta apenas leporídeos não constituindo, por isso, uma ameaça à saúde pública.

Por esta razão, **a recolha dos animais mortos (coelhos e lebres) encontrados no campo não constitui um risco para o operador**, devendo, no entanto, ser sempre acautelado o **cumprimento de cuidados básicos**, descritos no Protocolo disponibilizado no Banner +Coelho (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**).

Estes cuidados incluem a utilização de uma luva (ou saco de plástico onde a mão é enfiada, em alternativa) para a manipulação do cadáver, aquando da sua colocação em outro saco, para evitar o contato direto com o animal. Relembramos que a anotação do local e dia da recolha é fundamental para a subsequente utilização dos dados sanitários no seu contexto epidemiológico (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf**).
Desde outubro de 2018, verifica-se mortalidade crescente em lebres provenientes de todos os distritos localizados a sul do Tejo, devido a infeção pelo vírus da mixomatose, um vírus geneticamente diferente do que circula em coelhos.

Uma vez que as medidas de biosegurança que se podem implementar no campo ficam muito aquém daquelas que permitem o controlo da doença na indústria, **apela-se a todos os caçadores, gestores, proprietários rurais e demais interlocutores para reforçarem os seus esforços no que toca à implementação de um conjunto de medidas de boas práticas**, que, em conjunto, contribuirão

para desacelerar a transmissão deste vírus entre os animais e reduzir a sua disseminação pelos territórios ainda não afetados.

MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES

1. Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;

2. Recolha dos cadáveres de lebres, segundo procedimento (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**) adequado e seu envio para os pontos de recolha (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/pontos_entrega_22nov2018.pdf**), que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho;

3. Eliminação dos exemplares que não possam ser enviados para o laboratório, através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

4. Adoção de medidas de higiene, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, nas zonas de caça afetadas;

5. Limpeza e desinfeção periódica dos bebedouros;

6. Evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico, para evitar contaminação de solos, e subsequente eliminação dos subprodutos através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

7. Controlo de vetores (através de armadilhas para insetos), quando possível;

8. Não movimentação (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de áreas afetadas (link para notícia 81);

9. Não introdução no território nacional de coelhos-bravos e de lebres oriundas de outros Estados Membros sem a respetiva certificação sanitária.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos Leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

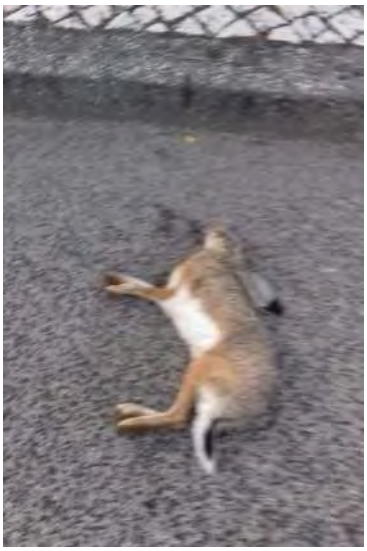
Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 85
6 setembro 2019

Resultados laboratoriais da monitorização do vírus da mixomatose em lebre ibérica entre setembro de 2018 e agosto de 2019.

Depois da deteção do primeiro caso de mixomatose numa lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), caçada no distrito de Évora em finais de outubro de 2018 (Notícia 55), têm-se verificado eventos de mortalidade nesta espécie em várias áreas geográficas localizadas a sul do Tejo.

Chegam-nos do campo muitos relatos alarmantes de avistamentos simultâneos de vários cadáveres de lebre com sinais sugestivos de mixomatose (edemas oculares e outros).





Fotografias recepcionadas de cadáveres de lebres avistados no campo.

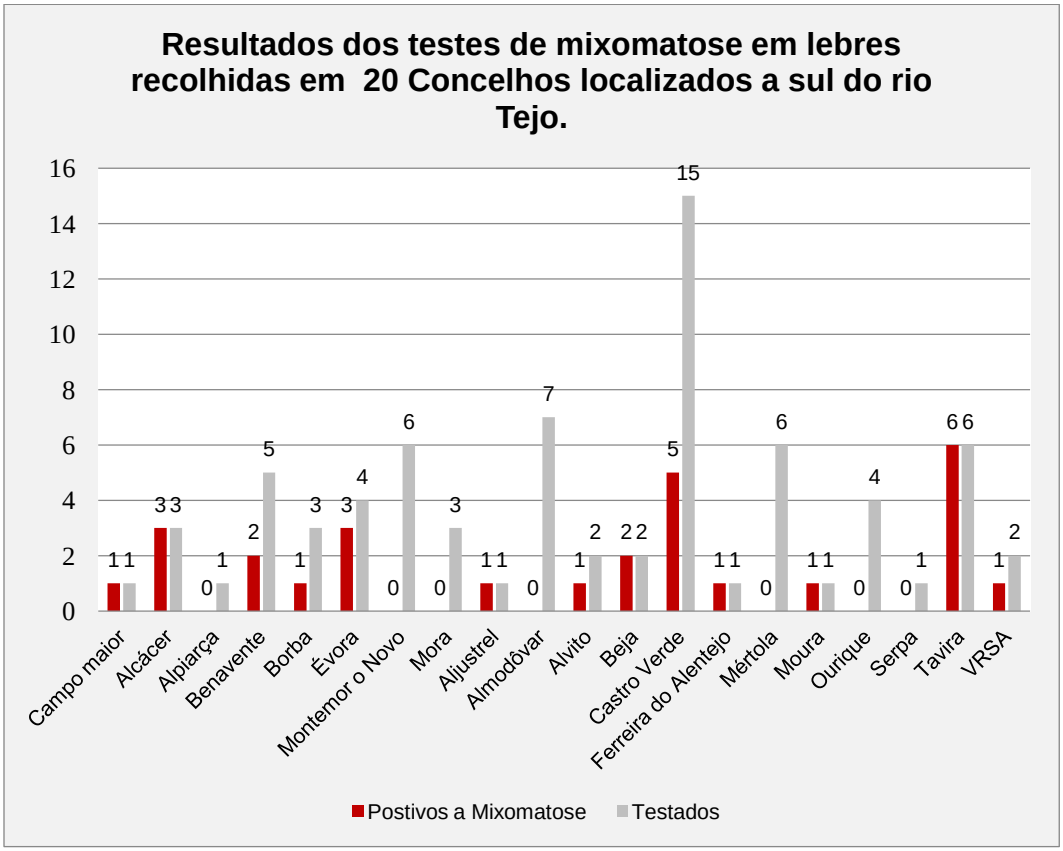




Resultados laboratoriais da monitorização do vírus da mixomatose em lebre ibérica entre setembro de 2018 e agosto de 2019

Alguns gestores de caça estimam que, com base nas observações de campo, se verifique uma redução de populações silvestres locais na ordem dos 80%.
O vírus que circula nas lebres-ibéricas é geneticamente diferente do vírus que circula nas populações de coelho-bravo.

No âmbito da Vigilância Sanitária de coelho-bravo e lebre-ibérica do Projeto +Coelho 2, foram testadas no INIAV até finais de agosto de 2019, quase oito dezenas de exemplares de lebre-ibérica caçados e encontrados mortos ou moribundos no campo, provenientes dos 5 distritos do Alentejo (Setúbal, Santarém, Portalegre, Évora e Beja) e de um do Algarve (Faro).

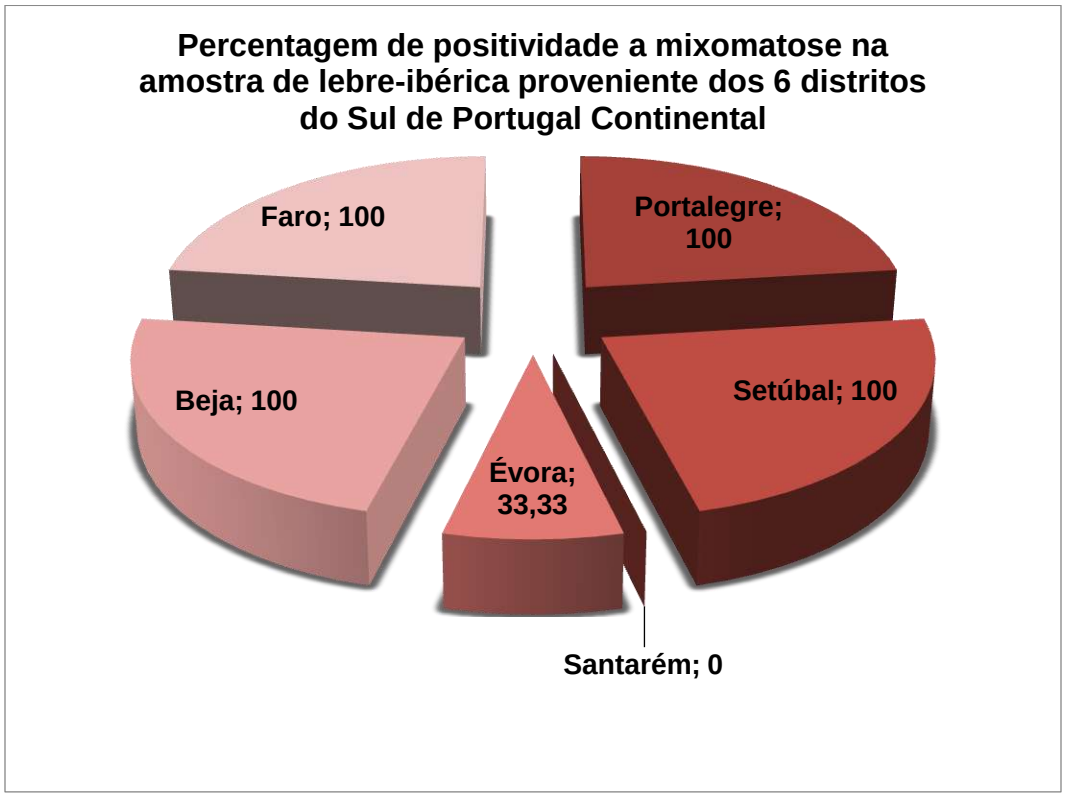


Embora o número de exemplares testados até agora seja ainda reduzido, todos os animais provenientes dos 7 concelhos de Campo Maior, Alcácer, Aljustrel, Beja, Ferreira do Alentejo, Moura, e Tavira foram positivos a mixomatose.

O incremento de casos positivos a mixomatose em lebre-ibérica, desde outubro de 2018 até ao presente, à semelhança do que se verifica desde julho de 2018 em mais de 25 províncias de Espanha, levanta grandes preocupações sobre o futuro desta espécie embora, de acordo com a atualização recente (2019) da lista

Resultados laboratoriais da monitorização do vírus da mixomatose em lebre-ibérica entre setembro de 2018 e agosto de 2019

vermelha das espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), mantenha, um estatuto de conservação de "pouco preocupante".



Recentemente, na Europa, têm sido detetados também casos de doença hemorrágica viral do tipo 2 (RHDV2) em lebre-da-montanha (*Lepus timidus*), na Escócia e Irlanda, nunca antes reportados. Registou-se também pela primeira vez no Reino Unido casos de RHDV2 em lebre-europeia (*Lepus europaeus*).

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 86
9 setembro 2019

2º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Almodôvar, a 7 de setembro de 2019

No âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2 compreendendo um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84), decorreu no dia 7 de setembro na na ZCT da Maruta, Pardeiro e Outras (processo nº 6894), em Almodôvar, o 2º evento de captura de lebres.



Presidente da ZCT da Maruta, Pardeiro e Outra, Sr António Lourenço e Fábio Abade dos Santos

A captura foi organizada pelo Presidente desta Zona de caça Turistica, o Sr. António Lourenço, e reuniu várias pessoas locais que colaboraram na colocação das redes e batida do terreno.

2º Evento de 2º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Almodôvar, a 7 de setembro de 2019






Em cima e no meio- Monte Fernão Dias, propriedade do Sr. António Lourenço. Em baixo- avaliação do local para colcação da rede por António Lourenço e Sebastião Miguel.

2º Evento de captura de lebre-ibérica em2º Evento de captura de lebre-ibérica em Almodôvar, a 7 de setembro de 2019



Em cima e no meio à esquerda.- colocação das redes, no meio à direita- distribuição das caixas para transporte das lebres capturada. Em baixo-vista do terreno com as redes instaladas.

2º Evento de captura de lebre-ibérica em Almodôvar, a 7 de setembro de 2019



Fábio Abade dos Santos preparando-se para a espera, junto às redes

A batida do terreno foi auxiliada por cães.

O Grupo de Trabalho +Coelho, agredeçe a todos os participantes o tempo e esforço dispendidos e boa vontade em participarem nesta medida de ação e ao Presidente Sr Amtónio Lourenço a generosidade com que recebeu e acolheu o Grupo de Trabalho + Coelho.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 87
12 setembro 2019

Grupo +Coelho no Workshop "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019



Representantes das Associações Nacionais Membros da FACE. Reunião Anual da Face, Bruxelas, 11 de setembro

A convite do Doutor David Skallen, Secretário Geral da Federação Europeia de Caçadores (FACE) que representa 7 milhões de caçadores europeus, a investigadora Margarida Duarte, coordenadora do Grupo de Trabalho +Coelho, participou num Workshop sobre ***O Futuro dos Lagomorfos na Europa***, com uma apresentação oral intitulada "***Revisão das Doenças dos Leporideos***", que se realizou em Bruxelas, no dia 11 de setembro.

Portugal está representado na FACE através da FENCAÇA, organização parceira do Projecto +Coelho.

Grupo +Coelho no Workshop "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019

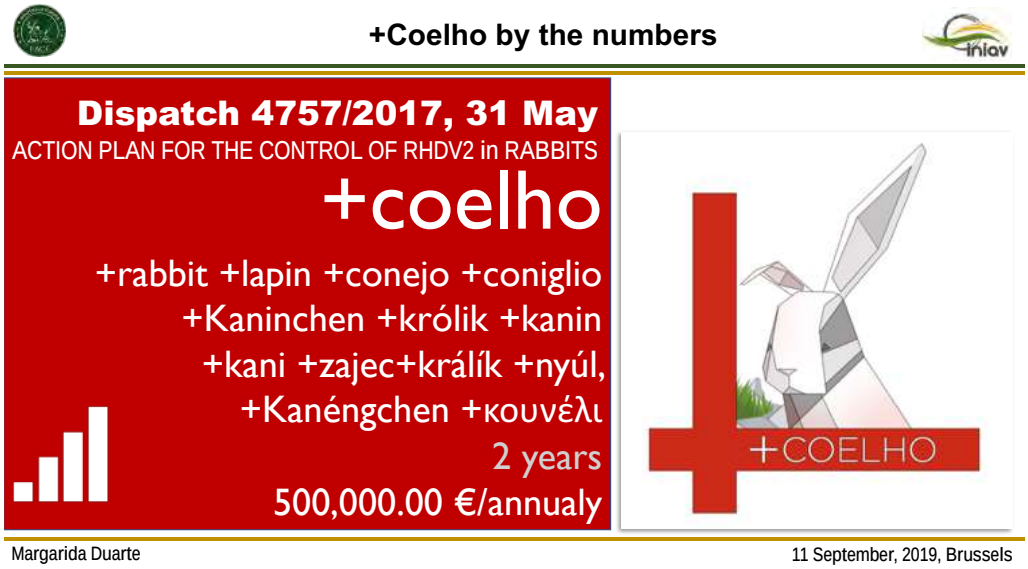
O Workshop, moderado por Cy Griffin, Gerente Sênior de Conservação da FACE, seguiu-se à Assembleia Geral Anual da FACE em cuja abertura participou Humberto Delgado Rosa, Diretor para o Capital Natural na Direção-Geral do Ambiente da Comissão Europeia, tendo a sua intervenção insidido sobre a necessidade de regular o uso de munições de chumbo em ambientes terrestres, além das medidas já propostas para áreas húmidas, cujo conceito requer também revisão.



Nessa apresentação, dedicada às doenças que afetam o coelho-bravo e a lebre-ibérica, Margarida Duarte deu enfase àquelas que são atualmente fatores de ameaça mais preocupantes no que toca à conservação destas espécies, nomeadamente as infeções causadas por Lagovirus (vírus da doença hemorrágica viral e vírus da sindrome da lebre europeia) e Leporipoxvirus (vírus da mixomatose).

Margarida Duarte divulgou ainda a estratégia operacional da parceria +Coelho e apresentou os resultados da vigilância sanitária, obtidos no decurso do Projecto +Coelho 1 e do Projeto+Coelho 2, este ainda em curso.

Grupo +Coelho no Workshop "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019



O Projecto +Coelho foi visto com grande interesse e curiosidade pelos presentes que, através de perguntas várias, proporcionaram uma conversa animada durante todo espaço dedicado a discussão e esclarecimentos.

Neste Workshop, participou também o Dr. Valter Trocchi, da Federazione Italiana Della Caccia (FIDC), Itália, que apresentou uma visão geral dos "Aspectos Ecológicos e Biológicos dos Leporideos". Por fim, Daniel Švrčula, Assistente de Políticas de Conservação da FACE, proferiu também uma apresentação.

Através desta participação, uma iniciativa da FENCAÇA, o Projeto +Coelho chegou ao conhecimento dos representantes de 36 países Europeus.

Grupo +Coelho no Workshop "O Futuro dos Leporídeos na Europa", Reunião Anual da FACE, Bruxelas, 11 de setembro de 2019

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

| Número 88

16 setembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

3º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada-Velha a 15 de setembro de 2019

No âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho2 compreendendo um ensaio de vacinação em lebre-ibérica contra o vírus da mixomatose (Notícia 84), decorreu no passado dia 15 de setembro, na Zona de Caça Municipal Malhada Velha (Processo Nº 2762), em Ferreira do Alentejo, o 3º evento de captura de lebres.



A captura foi organizada pelo Presidente desta ZCM, o Sr. Filipe Cardoso, e reuniu vários sócios, alguns moradores no concelho de Oeiras que se deslocaram especificamente para colaboraram neste evento, na colocação das redes e batida do terreno.



Caçadores sócios na madruada de dia 15 de setembro, em Ferreira do Alentejo

3º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada-Velha a 15 de setembro de 2019

O encontro aconteceu na Associação de Caça Desportiva de Figueiras dos Cavaleiros, tendo a chegada ao local acontecido antes do nascer do sol.











Colocação de redes

3º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada-Velha a 15 de setembro de 2019







Em cima - caçador imóvel, em espera das lebres junto à rede. Em baixo – vista sobre as redes.



Fotografia do grupo que participou no evento.

3º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada-Velha a 15 de setembro de 2019

A Associação de Caça Desportiva de Figueiras dos Cavaleiros, organizou um almoço de confraternização que proporcionou uma oportunidade de dialogo e esclarecimentos sobre a história do Clube e sobre o Projecto +Coelho.







Almoço de confraternização oferecido pela Associação de Caça Desportiva de Figueiras dos Cavaleiros

O Grupo de Trabalho +Coelho, agredeçe vivamente a todos os participantes, o tempo e o esforço dispendidos e boa vontade e simpatia com que participaram nesta medida de ação, deixando uma palavra de apreço especial ao Presidente, Sr Filipe Cardoso, e ao Sr Bento.

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 89

30 de setembro de 2019

Participação do Projeto Figth-two, na ***1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária****, Atenas 26 a 27 de setembro de 2019.*

A estratégia e objetivos do *Projecto Fight-Two – desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) nos coelhos-bravos*, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020), foram divulgados por Elsa Leclerc Duarte, Professora Auxiliar da Universidade de Évora e investigadora do ICAAM na 1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária (ICECVM), que decorreu em Atenas, na Grécia, nos dias 26 e 27 de setembro de 2019.



O Projeto Fight-Two é dedicado ao desenvolvimento de uma vacina oral para controlo da doença hemorrágica viral, pondo em prática uma das medidas do Eixo de Investigação do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, MAFDR).

São parceiros neste projeto o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

Participação do Projeto Figth-two, na ***1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária****, Atenas 26 a 27 de setembro de 2019.*

(iBET), a Universidade de Évora (UÉ) e a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV-UTL).

A 1.ª ICECVM, foi organizada em colaboração com o Grupo de Estudo para a Microbiologia Veterinária (ESGVM, *Study Group for Veterinary Microbiology*) da Sociedade Europeia para Microbiologia Clinica e Doenças Infeciosa (ESCMID). Consistiu essencialmente num fórum dedicado à microbiologia veterinária, organizado em sessões temáticas dedicadas à i) Bacteriologia e Micologia Veterinária, ii) Virologia Veterinária, iii) Diagnóstico Microbiologico, MALDI-TOF, Genómica & Metagenómica, e iv) Resistência Anti-microbiana, One Health e Microbiologia alimentar.



Maria José Saavedra., Professora Associada da UTAD e representante de Portugal no ESGVM-ESCMID(esquerda) com Elsa Duarte, membro da equipa do Fight-Two pela Universidade de Évora (à diretia, ladeadas por duas estudantes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Thessaloniki, Grécia, na 1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária, realizado em Atenas, 26 a 27 de setembro de 2019

Participação do Projeto Figth-two, na 1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária, Atenas 26 a 27 de Setembro de 2019



Elsa Duarte e Eva Cunha (aluna de doutoramento do CIISA-FMV) na 1ª Conferência Internacional do Colégio Europeu de Microbiologia Veterinária, Atenas 26 a 27 de setembro de 201.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 90
30 setembro 2019

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, 28 de setembro de 2019

A convite da organização, representada pelo Sr. Pedro Duarte, o Grupo de Trabalho (GT) +Coelho participou no **5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes**, que decorreu no Pavilhão Multiusos em Arraiolos, Évora, Portugal, nos dias 28 e 29 de setembro.

O evento contou com a participação do Vereador do pelouro do Desporto da Câmara Municipal de Arraiolos, João Campos.



No Workshop, intitulado "Projeto + Coelho: dois anos depois o que foi alcançado e o que mudou ", Carina Carvalho (membro do Projeto Fight-Two, que operacionaliza do desenvolvimento de uma vacina oral contra a doença hemorrágica viral dos Coelhos, também uma das medidas do Projeto +Coelho 2), em representação de Margarida Duarte (investigadora do INIAV e coordenadora do Projeto + Coelho), fez uma súmula sobre as espécies ibéricas de leporídeos silvestres existentes na Europa e seu estado de conservação, e da principais causas que atualmente os ameaçam, nomeadamente as doenças de etiologia viral.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, 28 de setembro de 2019

Na sua intervenção, foi também apresentado o projeto +Coelho, as estratégias desenvolvidas pelo Grupo de Trabalho, e os resultados obtidos durante os cerca de dois anos de execução do projeto.

O encontro contou também com outros oradores, nomeadamente Ana Reis (estudante de doutoramento no INIAV) que falou sobre tuberculose em caça maior, e Graça Mariano (Sub-Directora da DGAV), cuja intervenção incidiu sobre as principais preocupações sanitárias em caça maior.



Em cima à esquerda Carina Carvalho (Fight-two, INIAV) durante a sua intervenção sobre o projeto +Coelho; Em cima à direita Graça Mariano (Sub-Diretora da DGAV) e João Campos, Vereador do pelouro do Desporto da Câmara Munícipal de Arraiolos junto da assistência; Em baixo à esquerda uma panorâmica da assistência; em baixo à direita Ana Reis (estudante de doutoramento do INIAV) durante a sua intervenção sobre tuberculose em caça maior.

Neste evento foram realizadas diversas demonstrações e concursos de pombos e proporcionou aos negaceiros e caçadores a possibilidade de exporem os seus pombos de negaça e todo o tipo de material relacionado com a arte de negaçar.

A FENCAÇA, parceira do projeto, esteve representada por Ana Perdigão e Jorge Santos, técnicos desta Organização. No Stand da FENCAÇA foram disponibilizadas ao público brochuras sobre projeto + Coelho.

Projeto "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 91
3 outubro 2019

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019

No âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2 compreendendo um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84), decorreu no dia 2 de outubro mais um evento de captura de lebres, desta vez na Herdade da Salsa, pertencente ao Eng. Joaquim Almeida Faria.

O evento foi diligenciado pelo Secretário Geral da ANPC, João Carvalho.



João Grave explicando à equipa a estratégia de captura a implementar no terreno.

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019

A logistica e operacionalização da captura no terreno, foi dirigida pelo Dr. João Grave, que gentilmente providenciou veículos de transporte, estacas e caixas de transporte de lebres, trazendo também consigo alguns amigos e funcionários para assegurar a operacionalização da captura. Menção a António Mexia de Alameida, José Maria Rasquilha, Adriano Mata e a Maninho, que ajudaram na colocação das redes e na captura dos animais tresmalhados.

Na colocação das redes estiveram também Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Armando Santos, Fábio Santos (INIAV) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV).

Contámos também a colaboração de Ricardo Neto (ANPC) que, em articulação com João Grave, coordenou as batidas.



Paulo Norte (Clube de Caçadores da Ota), Ricardo Neto (ANPC) e Joaqum Almeida Faria (Proprietário).

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019






Em cima, à esquerda: Brito Paes e João Grave. Em cima à direita: Dr Brito Paes, Adriano Mata e António Mexia de Almeida colocando as caixas para transporte dos animais; Em baixo à esquerda: António Mexia de Almeida atando as rede. Em baixo à direita: Carros de transporte de material de João Grave.

Esteve ainda presente o Dr Brito Paes, que juntamente com João Grave, são referências nacionais e internacionais da modalidade de Caça a Corricão. As suas participações atestam o interesse e vontade em colaborar com esta iniciativa em prole da preservação da biodiversidade e da sustentabilidade do Setor Cinegético.



Sebastião Miguel, mostrando aos presentes as particularidades das caixas de transporte de lebres.

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019

Nas batidas esteve presente também o Gestor João Grosso, Professor da Escola Profissional ALSUD (Mértola) e alguns dos seus alunos do Curso Técnico de Gestão Cinegética, e também dois alunos da Escola Profissional Agricola Fernando Barros Leal de Torres Vedras.



João Grosso e os seus alunos da Escola Profissional ALSUD (Mértola)

Contámos ainda com a colaboração do Clube da Caçadores da Ota, Alenquer, através de Luís Maia e Paulo Norte.



Luís Maia, Presidente do Clube de Caçadores da Ota, Alenquer

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019



Ricardo Neto (ANPC), coordenando os alunos na batida.



Fábio Abade dos Santos espetando estacas no solo para colocação de redes

4º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Serpa, a 2 de outubro de 2019



Grupo parcial presente no evento de captura do dia 4 de outubro. Da esquerda para a direita, Pedro Ambrósio ((EPAFBL)) Ricardo Neto (ANPC), Paulo Norte (Clube de Caçadores da OTA), João Paulo (EPAFBL), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Brito Paes, Adriano Mata, Margarida Duarte(INIAV), João Grave, José Maria Rasquilha, António Mexia de Almeida e Luis Maia.

Estiveram ainda presentes dois alunos da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal (EPAFBL).

O Grupo de Trabalho +Coelho agradeça ao Proprietário, Eng. Joaquim Almeida Faria, a amabilidade de disponibilizar a sua propriedade para a captura de lebres, ao Dr. João Grave pela sua generosidade de contribuir de forma tão substancial e ativa para esta captura, e a todos os participantes, em especial aos jovens estudantes, pelo tempo e esforço dispendidos e boa vontade com que participaram e animaram este evento.

REPÚBLICA PORTUGUESA

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

+COELHO

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 92

6 de outubro de 2019

*Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na **5ª Reunião Internacional de Parasitas Apicomplexa em Animais de produção**, realizada em Berlim 2 a 4 de outubro de 2019.*

O Grupo de Trabalho esteve presente na 5ª Reunião Internacional de Parasitas *Apicomplexa* em Animais de produção (**5th International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals**) que se realizou em Berlim de 2 a 4 de outubro, representado por Helga Waap, parasitologista do INIAV e membro da equipa do Projecto +Coelho 2.



Os parasitas pertencentes a este complexo são seres unicelulares (i.e., formados por uma única célula), formadores de esporos (uma das formas como se replicam), e que apenas crescem no interior de uma célula viva (parasitas intracelulares obrigatórios).

Alguns exemplos mais conhecidos de parasitas pertencentes a este grupo taxonómico de protozoários que inclui cerca de 5000 espécies, são *Babesia*, causadora de babesiose, *Plasmodium*, agente da malária e *Toxoplasma gondii*, causador de toxoplasmose.

Besnoitia e *Neospora*, são agentes patogénicos relevantes para o gado.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na ***5ª Reunião Internacional de Parasitas Apicomplexa em Animais de produção****, realizada em Berlim 2 a 4 de outubro de 2019.*

.

Neste congresso, o Grupo de Trablho apresentou um trabalho intitulado "*Serological survey of Neospora spp. and Besnoitia spp. in wild rabbits in Portugal*".

O rastreio parasitológico foi efetuado em soros de coelho-bravo (n=385), preparados a partir de amostras de sangue recolhidas em animais caçados nas épocas venatórias de 2017/2018 e de 2018/2019, amostrados no âmbito do Projecto +Coelho. Os anticorpos foram pesquisados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFAT).



Helga Waap, no Laboratório de Prasitologia do INIAV, em Oeiras

Não foram encontrados anticorpos contra *Besnoitia spp* em nenhum soro. No entanto, em 13 coelhos foram detetados anticorpos para *N. caninum* com títulos maioritariamente baixos (1:50), representando uma prevalência global de 3,1% [para um intervalo de confiança de 95% (95% CI): 1,8–5,4%].

Os dados obtidos sugerem que o coelho-bravo não é hospedeiro natural de *B. besnoiti*, mas que o coelho-bravo poderá atuar com hospedeiro reservatório selvagem de *N. caninum* para cães e carnívoros selvagens.

Embora se desconheça o impacto clínico da infeção por *N. caninum* no coelho-bravo, revelada pela seropositividade, esta reflete a presença de contaminação ambiental com oocistos, formas reprodutivas altamente resistentes.O pastoreio de gado nestas áreas poderá assim resultar numa exposição à infeção e transmissão horizontal.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na ***5ª Reunião Internacional de Parasitas Apicomplexa em Animais de produção****, realizada em Berlim 2 a 4 de outubro de 2019.*

Serological survey of *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. in wild rabbits in Portugal

Helga Waap[1,2], João Carrilho[3], Ana Munhoz[3], Jacinto Gomes[1,2], Carina Carvalho[1], Mónica Cunha[1,4,5], Margarida Duarte[1,2], Gereon Schares[6]

[1] Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Deiras, Portugal, [2] CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, [3] Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, [4] cE3c-Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, [5] BioISI-Biosystems & Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, [6] Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, Germany

Introduction

Neospora caninum and *Besnoitia besnoiti* are closely related obligate intracellular cyst-forming coccidia.

Both parasites are important pathogens of cattle, causing significant economic losses. While there is evidence that rabbits may be a reservoir species for *N. caninum*, their role in the sylvatic cycle of this parasite is poorly understood.

As for *B. besnoiti*, although several species are experimentally susceptible to infection, in particular rabbits, no other hosts besides cattle have yet been identified.

This study aimed to evaluate the presence of specific antibodies to *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. in naturally exposed rabbits in Portugal.



Materials and Methods

The study involved a total of 385 wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) hunted in different geographical areas in Portugal (Fig. 3).

Serum samples were obtained in the frame of the project Mais Coelho, aimed at implementing an action plan for the control of Rabbit Viral Hemorrhagic Disease and financed by the Portuguese Permanent Forestry Fund.

The number of animals to be sampled was calculated with EpiTools epidemiological calculators[1], using the following inputs: 1) an assumed prevalence of 50%, (2) a confidence level of 95%, and (3) a precision in the estimate of 5% for an unknown population size. Geographical origin of samples was recorded at the municipality level.

Geographical distribution maps were constructed using AcGIS 10.6.1 software.

Sera were screened for antibodies to *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. by the Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) at the commonly used cut-off titre 1:50[2]. Positive and negative IFAT controls for *Neospora* spp. were included in each screening round.

Confidence intervals were calculated using Wilson score intervals (α = 0.05; Wilson 1927[3])

Results

A total of 13 rabbits (Fig. 3) were found to be *N. caninum* positive by IFAT at the screening dilution 1:50 (Fig.1 and 2), resulting in an overall prevalence of 3.1% [95% confidence interval (95% CI): 1.8–5.4%].

Though a few sera showed some degree of fluorescence when tested for *Besnoitia* spp., none of them could be undoubtedly classified as positive.

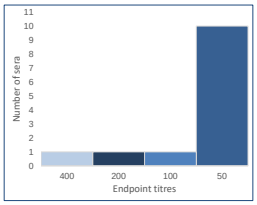


Figure 1. Endpoint titres determined for positive sera.

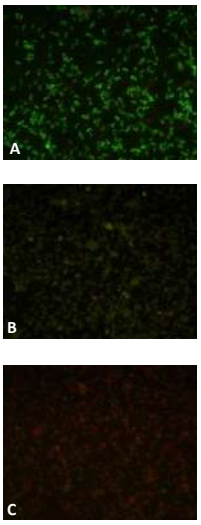


Figure 2. Positive screening results at 1:50 dilution (A) Positive result corresponding to an endpoint titre 1:400; (B) positive result corresponding to an endpoint titre 1:50; (C) negative result.

Discussion

The present results show that rabbits are unlikely natural hosts for *B. besnoiti*, but suggest that that they can act as wild reservoir hosts of *N. caninum* for dogs and wild carnivores.

Since infection in rabbits reflects environmental contamination with oocysts, this means that cattle grazing in the same areas may be exposed to horizontal transmission.



Figure 3. Sample origin and number of seropositive results (red).

Acknowledgements

The authors are thankful to Lucinda Marques and Maria do Carmo Ramos (INIAV) for invaluable laboratory assistance and João Fernandes (INIAV) for cartographic and GIS support.

Contact

Helga Waap
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
Email: helga.waap@iniav.pt
Phone: (+351) 214 403 500

References

1. http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home
2. Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavin S, Gortazar C, López-Gatius F, Dubey JP (2007). Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. Vet Parasitol. 143:21-8.
3. Wilson E . (1927). "Probable inference, the law of succession, and statistical inference". Journal of the American Statistical Association 22: 209–212

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 93
7 outubro 2019

5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019



Pedro Ambrósio, João Paulo e Tomás Martins (Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal (EPAFBL).

Decorreu no dia 4 de outubro mais um evento de captura de lebres, desta vez na Herdade dos Pinheirinhos, na Fundação Eugénio de Almeida. A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2, que compreende um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84). Este evento de captura foi organizado pelo Secretário Geral da ANPC, João Carvalho.

5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019



Alunos da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal com o Professor Joaquim Francisco e Fabio Abade dos Santos (INIAV)

A logistica e operacionalização da captura no terreno foi co-dirigida pelo Gestor Sebastião Miguel, no que toca à colocação das redes, e pelo Eng. Ricardo Neto (ANPC), relativamente às enxotas.



Primeiro plano da esquerda para a direita: Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Ricardo Neto (ANPC), três alunos da EPAFBL e Maninho (funcionário da Quinta de S. José de Peramanca).

O material, nomeadamente redes, ferros e caixas, e um veículo, foram mais uma vez, gentilmente cedidos pelo Dr. João Grave.

Nas batidas estiveram também presentes 16 alunos da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal, de Runa, Torres Vedras, acompanhados pelos seus Professores Engª Margarida Feliciano e Dr. Joaquim Francisco.



Professora Margarida Feliciano (primeiro palno) e seis alunos da EPAFBL à esquerda.

Na colocação das redes, e nas redes durante as enxotas estiveram presentes Gonçalo Lopes (Chefe da Divisão de Recursos Cinegéticos e Aquícolas (DRCA)), Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Armando Santos (voluntário), Fábio Santos (INIAV) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV).

5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019









Colocação das pessoas junto às redes, em espera pelas lebres, durante a batida. Quatro primeiras fotos: Alunos da EPAFBL. Fotos seguintes: Fábio santos, Sebastião Miguel, Gonçalo Lopes.

5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019



Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário, INIAV) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV), libertando uma lebre da rede.



Gonçalo Lopes (Director dos Serviços Cinegéticos e Aquicolas), João Paulo (aluno da EPAFBL), Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário, INIAV) e Margarida Duarte (Investigadora do INIAV), libertando uma lebre da rede.

5º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Évora, a 4 de outubro de 2019

O Grupo de Trabalho +Coelho agredeçe à Fundação Eugênio Almeida a disponibilização da propriedade para a captura de lebres, e ao Director da EPAFBL, Dr. Luís Carlos Sousa Lopes, seus Professores e alunos, a colaboração ativa neste evento. Um agradedimento especial ao Dr. João Grave pela disponibilização de recursos imprescindiveis ao bom sucesso da captura.



Grupo que participou na Captura de dia 4 de outubro.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 94
10 outubro 2019

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 16º Encontro dos Utilizadores da ESRI, 9 de outubro de 2019



Valter Caetano (Diretor do Departamento de Logística e Sistemas de Informação do INIAV), Carina Carvalho (Investigadora do Projeto Fight-Two), Margarida Duarte (Investigadora do Laboratório de Virologia do INIAV), João Fernandes (Departamento de Logística e Sistemas de Informação), João Camacho (Estudante de Doutoramento da UEISSAFSV) e Maria João Barrento UEISSAFSV).

A convite do Departamento de Logística e Sistemas de Informação do INIAV, dirigido pelo Eng. Valter Caetano, o Grupo de Trabalho (GT) +Coelho participou no **16º Encontro dos Utilizadores da ESRI,** que decorreu na Culturgest, a 9 de outubro. O INIAV esteve representado neste evento por João Fernandes (DLSI), João Camacho (UEISAFSV) e Margarida Duarte (UEISPSA).

O INIAV aposta há muito nas tecnologias SIG, no âmbito do desenvolvimento dos seus projetos, permitindo fazer uma espacialização dos fenómenos que se verificam no território, bem como compreender o seu comportamento ao longo do tempo. A recolha longitudinal permite a construção de séries temporais longas, possibilitando a elaboração de estudos estatísticos e geoespaciais.

Neste encontro, foram proferidas três apresentações que enfatizaram a mais-valia e a importância dos SIG para apoio aos projetos de investigação.

Margarida Duarte coordenadora do Projeto +Coelho (financiado pelo Fundo Florestal Permanente), fez uma apresentação intitulada "DOIS ANOS DE PROJETO +COELHO: o apoio SIG através do Departamento de Logística e Sistemas de Informação INIAV"

João Camacho, no âmbito dos seus trabalhos de Doutoramento fez uma apresentação intitulada "SIG na Nematologia Agrária".

O Eng. João Fernandes partilhou com a assistência exemplos de aplicações desenvolvidas para suporte de vários projetos que decorrem atualmente no INIAV (+Coelho, GESVESPA, Merino Parasite, INFOSOLO, entre outros) e as suas experiências, explicando as potencialidades dos sistemas SIG:

- Desmaterializar processos;
- Normalizar procedimentos;
- Gerir de grandes volumes de dados;
- Produzir relatórios dinâmicos e disponibilizar ferramentas de monitorização de dados;
- Notificar, via e-mail a submissão de dados na plataforma;
- Recolher dados em Real-Time com recurso a aplicações móveis desenvolvidas para os projetos;
- Recolher dados em Real-Time proveniente de sensores e sondas instaladas no terreno;
- Emitir alertas e sistemas de notificação por níveis;
- Disponibilizar ambientes de BackOffice, Web e Aplicacional para recolha e tratamento de dados;
- Alimentar, em Real-Time, *Dashboards* (gráficos, mapas, tabelas/tabelas resumo e alertas);
- Utilizar um sistema de credenciais com diferentes níveis de acesso aos dados;
- Fazer *Backups* automáticos dos dados;
- Criar fluxos de trabalho e gerir o mesmo com recurso a uma caixa de notificação para os colaboradores;
- Gerar gráficos dinâmicos, modernos e interativos;
- Fazer análise e tratamento estatístico de dados;
- Recorrer a modelos de inteligência artificial, Machine Learning, Power Bi e aceder a dados Big Data;
- Permitir uma maior interoperabilidade e conetividade entre diferentes sistemas e plataformas.

João Fernandes explicou ainda que:

- O recurso aos SIG permite desenvolver metodologias de análise de risco, suscetibilidade e vulnerabilidade para produzir cartografia para apoiar a tomada de decisão dos gestores do território;

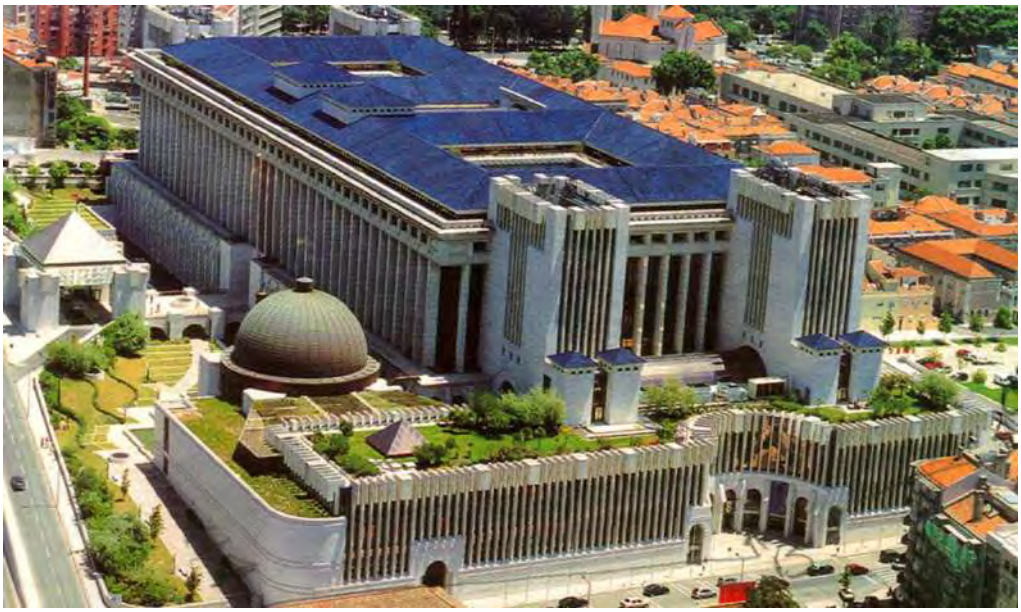
Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 16º Encontro dos Utilizadores da ESRI, 9 de outubro de 2019

- Após a identificação de um risco, é crucial conceber e desenvolver modelos e fluxos de trabalho para mitigação dos potenciais danos associados, geradores de perda económica ameaças à saúde pública;
- As tecnologias SIG permitem produzir modelos preditivos e produzir respostas integradas, capazes de gerir um sistema de alertas de âmbito tecnológico, podendo para isso recorrer a processos de automação e robótica.

Estas apresentações tiveram lugar no **Teaching and Learning Corner (sala 4).**



O encontro permitiu dar a conhecer várias aplicações e projetos desenvolvidos por muitas entidades públicas e privadas com recurso a esta tecnologia de dados.



Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 16º Encontro dos Utilizadores da ESRI, 9 de outubro de 2019



Estiveram presentes no encontro mais de um milhar de utilizadores para partilha das últimas novidades técnicas da Plataforma ArcGIS, assim como exemplos do que de melhor se faz com os Sistemas de Informação Geográfica em Portugal.

A grande afluência a este encontro anual, atesta a importância que os sistemas de informação geográfica têm atualmente na análise, representação, e divulgação de informação de forma objetiva, simples e clara.

O grupo +Coelho agradece vivamente ao Departamento de Logística e Sistemas de Informação do INIAV o apoio precioso que tem dado ao Projeto +Coelho, e em especial ao Eng. João Fernandes cuja disponibilidade e boa vontade são notáveis.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

REPÚBLICA PORTUGUESA

+COELHO

Projeto "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

| Número 95
11 outubro 2019

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, a 10 de outubro de 2019



António Mexia de Almeida, Adriano Mata e Sebastião Miguel durante o evento de captura de lebre-ibérica em Beja, a 10 de outubro de 2019

Decorreu no dia 10 de outubro um evento de captura de lebres nas Herdades de Linhares e Linharinhos localizada, em Beja.

Este evento foi organizado pelo Dr. João Grave que também providenciou material váriado necessário ao sucesso da captura e veículos para transporte.



João Grave percorrendo os limites da mancha com o Gestor João Grosso, na preparação do evento.

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, a 10 de outubro de 2019



Alunos e Professoras (em baixo à esquerda, Engª Elsa Penedo e à direita Dra Inês Soares) da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal, Runa, Torres Vedras.

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, 10 de outubro de 2019







Alunos da Escola Profissional ALSUD (Mértola), do Curso Técnico de Gestão Cinegética, de cima para baixo: Rafael Maria, Ricardo Barbosa, Rui Roque, Bruna Marçalo e Luís Baleisão.

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2, que compreende um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84).

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, a 10 de outubro de 2019

Nas batidas, coordenadas pelo professor João Grosso da Escola Profissional Alsud de Mértola, estiveram presentes 14 alunos da Escola Profissional Agrícola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras), e suas Professoras (Inês Soares e Elsa Penedo) e uma aluna (Bruna Marçal) da EP ALSUD de Mértola.

A colocação das redes esteve a cargo de Maninho, António Mexia de Almeida, Adriano Mata, José Maria Rasquilha, Sebastião Miguel e Fábio Santos.



Maninho, libertando uma lebre da rede.

Na vigilância destas redes durante as enxotas contou com a participação de António Mexia de Almeida, Adriano Mata, José Maria Rasquilha, Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Fábio Santos (INIAV), Margarida Duarte (Investigadora do INIAV) e de 5 alunos da Escola Profissional ALSUD.

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, em Beja, a 10 de outubro de 2019



Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário) transportando um exemplar de lebre para a caixa. Grupo que participou no evento de captura de dia 10 de outubro em Beja



Grupo que participou no evento de captura de dia 10 de outubro em Beja. Da esquerda para a direita na fila de trás: Maninho,Rui Roque, Rafael Maria, João Almeida, João Grosso(Professor da EPAlsud), Ilídeo Matos (Proprietário), Adriano Mata, João Grave, João Henriques, Mariana Garcia, António Maltez, Beatriz Silva, André Baptista, David Rego e Bruno Ferreira.
Fila do meio: José Maria Rasquilha(Médico Veterinário), Rafael Assunção, Rodrigo Henriques, João Tomás, Fábio Abade dos Santos.
Fila da frente: Bruna Marçal, António Mexia de Almeida, Bernardo Duarte, Diogo Jacinto, Afonso Oliveira, Inês Soares (Professora da EPAFBL), António Appleton, Elsa Penedo (Professora da EPAFBL), Sebastião Miguel (Gestor de Caça).

6º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Linhares e Linharinhos, Beja, a 10 de outubro de 2019

O Grupo de Trabalho +Coelho agradeçe vivamente ao Sr. Ilídeo Matos a disponibilização da sua propriedade para a captura de lebres, ao Dr. João Grave a coordenação do evento e o material disponibilizado, à Direção das duas escolas participantes (EPAFBL e EPASUL), aos professores que acompanharam os alunos, e aos alunos, um agradecimento muito especial pela colaboração prestada, numa prespetiva de partilha de esforços e de interesses, em prole da conservação da biodiversidade.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 96
15 outubro 2019

Participação do Grupo de Trabalho no evento ***Patrimónios do Sul,*** *na Feira de Beja a 12 de outubro de 2019*

A convite da Federação Alenteja de Caçadores (FAC), representada pelo Sr. Eng.º José Bernardino, o Grupo de Trabalho (GT) +Coelho participou num colóquio, co-organizado com a CNCP (Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses) da qual FAC é membro, no evento Patrimónios do Sul, que decorreu Parque de Feiras e Exposições Manuel de Castro e Brito, em Beja, Portugal, nos dias 11, 12 e 13 de outubro.



O evento Ptrimónios do Sul consistiu numa feira que promove a identidade do território do sul do país ao nível económico, cultural e turístico. O Município de Beja apostou neste evento como forma de apoio ao desenvolvimento regional e às culturas locais, através da valorização dos seus patrimónios, materiais e imateriais, tradicionais e inovadores, ao mesmo tempo que estimula a produção, a transformação e a comercialização, o espírito criativo, o empreendedorismo e a inovação. Os vinhos, os produtos agroalimentares, o turismo, a biodiversidade, as artes e ofícios, a gastronomia, a caça e a pesca, a tradição taurina e as aves foram as atividades em destaque nesta feira.

Participação do Grupo de Trabalho no evento ***Patrimónios do Sul,*** *na Feira de Beja a 12 de outubro de 2019*

No colóquio, Carina Carvalho (membro do Projeto Fight-Two, que operacionaliza do desenvolvimento de uma vacina oral contra a doença hemorrágica viral do coelho-bravo, também uma das medidas do Projeto +Coelho 2), em representação de Margarida Duarte (investigadora do INIAV e coordenadora do Projeto +Coelho), falou sobre o tema da mixomatose em lebre-ibérica, um tema atual que muito tem vindo a preocupar o setor cinegético, a academia&investigação tanto em Portugal como em Espanha. Durante esta apresentação foram abordadas, de forma resumida, as principais espécies de lebres silvestres na Península Ibérica, o seu estado de conservação e as principais causas que atualmente ameaçam os leporídeos, nomeadamente as doenças de etiologia viral.



À esquerda o Eng.º José Bernardino, da Ferderação Alentejana de Caçadores (FAC) apresentado o colóquio e proferindo algumas palavras dirigidas à audiência. À direita uma panorâmica do auditório.

Foi feito um primeiro enquandramento sobre o vírus da mixomatose do coelho-bravo, um vírus amplamente estudado, no que toca à sua emergência, sinais e lesões típicos de mixomatose, disseminação e eco-epidemiologia, e relatos de mixomatose em lebre no passado. De seguida, foi apresentado o vírus da mixomatose da lebre-ibérica, um vírus mutante, contextualizando a audiência relativamente à sua emergência, disseminação na Península Ibérica, sinais clínicos e lesões de mixomatose na lebre-ibérica e questões relacionadas com a eco-epidemiologia deste vírus. Nesta intervenção, foram também apresentados os resultados virológicos obtidos em lebre-ibérica durante os dois anos de atividade do projeto +Coelho, e as estratégias desenhandas e desenvolvidas pelo Grupo de Trabalho, no sentindo de alavancar a recuperação

Participação do Grupo de Trabalho no evento ***Patrimónios do Sul****, na Feira de Beja a 12 de outubro de 2019*

dos leporídeos silvestres em Portugal, particularmente aquelas com impacto direto na lebre-ibérica, e deixadas recomendações práticas.

O



de evento contou com a participação da Dra Maria Carmo Caetano, da Direção Geral Alimentação e Veterinária (DGAV) de Évora que abordou a situação atual da Peste Suína Africana, fornecendo à audiência informações sobre o vírus e a doença e o presente contexto europeu do vírus, deixando também recomendações práticas.

Intervenção da Dra Maria Carmo Caetano da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) de Évora, durante o colóquio.



A FAC esteve representada num *Stand* próprio no evento Patrimónios do Sul.

Projeto "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 97
16 outubro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

*7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Campo Maior**, a 12 de outubro de 2019*



Intervenientes no evento, pertencentes à Associação Desportiva de Caça e Pesca Campo Maiorense, durante o evento de captura de lebre-ibérica, realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019. Fila de trás, esquerda para direita: Manuel Pedro Saragoça, Caetano Piçarra, Francisco Sardo, Paulo Pinto, Henrique Martins, Paulo Vieira e Luis Vieira, António Paio, Nuno Oliveira, António Carlos Trindade, Fábio Abade dos Santos, Carlos Gomes, António Bencatel, Rodolfo Parrão, João Alfacinha e Sérgio Sardo. Fila da frente, da esquerda para a direita: Paulo Morais, Manuel Portela, Pedro Saragoça, Cláudia Vieira e duas crianças cujas identidades não são reveladas a pedido dos pais. Foto de Sebastião Miguel.

Decorreu no dia 12 de outubro um evento de captura de lebres na Associação Desportiva de Caça e Pesca Campo Maiorense localizada em Campo Maior, no distrito de Portalegre.

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019

Este evento de captura foi organizado por esta Associação, nomeadamente pelo seu presidente, Sr. António Trindade, e vice-presidente, Sr. Pedro Saragoça, em colaboração com o Sr. Francisco Luís Caldeira que, juntamente se prontificaram a colaborar com o projeto +Coelho. O empenho que depositaram na organização e operacionalização deste evento de captura foi notável.



Organização do pessoal e divisão do mesmo para instalação de redes e espera (grupo 1) e o pessoal destinado à batida (grupo2). As duas crianças no primeiro plano, participaram também no processo de batida (os seus rostos foram desfocados para proteção de identidade).

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do desenvolvimento e implementação da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2, que compreende um Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84).

A colocação das redes esteve a cargo de Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário, INIAV) e de vários membros da Associação de Caçadores, cuja colaboração foi preciosa. O grupo de trabalho ficou particularmente sensibilizado com as crianças que estiveram presentes neste evento desde as 06:00h. Embora muito jovens, estiveram sempre com boa disposição e a energia que lhes é característica, dando um

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019

excelente exemplo de conduta a todas as pessoas que se queiram voluntarizar para colaborar nestes eventos.



A colocação de ferros (neste evento foram colocados cerca de 70) é um dos processos em que o esforço físico é mais exigente. Neste caso, um membro da Associação de Caçadores de Campo Maior assegura esta função em pleno. Para ele, bastou a boa vontade.

Foram realizadas várias "enxotas" num olival, tendo de seguida sido movidas as redes e a equipa para um segundo olival, de menores dimensões, por forma capturarmos mais alguns animais. Um dos aspetos positivos que importa já ressalvar, é o facto de não terem sido visualizadas lebres com sinais clínicos de mixomatose.

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019



Caetano Piçarra (Associação Desportiva de Caça e Pesca Campo Maiorense) a assegurar que as redes ficavam bem unidas.



Alguns dos elementos da equipa instalavam as redes de captura de lebres, enquanto os restantes aguardavam noutro local pelo início da batida.

A vigilância destas redes durante as enxotas, contou com a participação de 5 elementos da Associação de Caçadores, com Sebastião Miguel (Gestor de Caça) e Fábio Abade dos Santos (INIAV). É de ressaltar

também que não houve registo de animais lesionados durante o processo, tendo todos chegado ao destino sem quaisquer lesões.

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019



Tudo a postos para iniciar a segunda parte da captura: a batida a pé ou "enxota"



Durante a batida, os elementos colocados nas redes esperam silenciosamente pela passagem dos animais. Após esta passagem, os animais aprisionados nas redes são imediatamente imobilizados prevenindo os danos auto-infligidos.

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019



A meio da manhã, o grupo reuniu-se para repor energias e para reajustar a estratégia das batidas seguintes. Este "mata-bicho" foi organizado pela Associação de Caçadores.



Alguns dos participantes, a trocar impressões antes do almoço.

7º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Campo Maior, a 12 de outubro de 2019



Almoço de convívio e discussão. Alguns dos participantes não estiveram presentes ao almoço por impossibilidades pessoais.

O Grupo de Trabalho +Coelho agradece a preciosa ajuda e altruísmo da Associação de Caçadores pela disponibilização da propriedade para a captura de lebres, do tempo e esforço de todos os participantes e pela coordenação do evento. Agradecemos ainda ao Dr. João Grave pelo material disponibilizado, numa prespetiva de partilha de esforços e interesses em prole da conservação da biodiversidade.

Para o Grupo de Trabalho + Coelho, estas experiências são cada vez mais uma oportunidade para partilhar as vivências e conhecimento de pessoas locais, de discutir problemas e percecionar as realidades do campo. Certamente todos terminamos mais uma captura, fisicamente exaustos, mas mentalmente mais preenchidos.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 98
21 outubro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

Decorreu em Elvas no passado dia 19 de outubro o 8º evento de captura de lebres, desta vez organizado pelo Presidente do Clube de Tiro e Caça de Elvas, Sr. Luís Villar Maior. O evento contou com a participação de muitos sócios e amigos do clube que aderiram ao apelo do Grupo de Trabalho +Coelho, para se poder operacionalizar este evento de captura de lebres, imprescindível à execução da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2.



No primeiro plano, da esquerda para a direita, José Rainho, Luís Villar Maior (presidente do Clube de Tiro e Caça de Elvas) e José Luís Martins (Gestor Cinegético), em marcha para a batida da propriedade.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84).







Em cima à esquerda, Luís Villar Maior recebe e agradece a colaboração aos sócios. À direita, Fabio Abade dos Santos explica a importância dos leporideos na preservação dos ecosistemas mediterraneos.
Em baixo, sócios dejejuam na madrugada de dia 19 de outubro.

O encontro dos participantes ocorreu às 7:00 da manhã, no Clube de Tiro e Caça de Elvas.

O Presidente do Clube, Luís Villar Maior e a equipa do Projeto +Coelho, representada por Margarida Duarte (Médica Veterinária e Investigadora do INIAV) e Fábio Abade Santos (Médico Veterinário) explicaram aos presentes o contexto e os obetivos do evento de captura de lebres e deram a conhecer as atividades gerais do Projeto +Coelho. Foram discutidos os detalhes operacionais da estratégia de captura desse dia. Antes da saída para o campo, os participantes no evento tiveram oportunidade de se conhecer e tomar juntos o pequeno-almoço.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

A colocação das redes de tresmalho esteve a cargo de Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e de vários membros do Clube de Tiro e Caça de Elvas, cuja colaboração foi preciosa.



Em cima e no meio: colocação de redes por Pedro Ricardo, Sebastião Miguel e diversos membros da CTC de Elvas.
Em baixo, Pedro Ricardo em espera e André Serafim dirigindo-se para o local de espera, onde aguardou deitado sobre uma saca e imóvel.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*



Colocação de redes. Vista do retrovisor de um dos veículos de apoio ao evento.



Luís Villar Maior conversando com os sócios sobre a estratégia da batida seguinte.

Foram realizadas 4 “enxotas” num ameixoal, num olival, e num terreno em pousio.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*



A visualização de pegadas de lebre constitui evidência inoquivoca da presença de exemplares na propriedade.



Sebastião Miguel, Luís Villar Maior e Margarida Duarte, num momento de pausa entre batidas.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*








Uma lebre capturada na rede e colocada imediatamente numa saca de sarapilheira para redução do stress, é retirada, observada e acomodada numa caixa de transporte por Sebastião Miguel e Fábio Santos

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

O Clube de Tiro e Caça de Elvas presentiou ainda todos os participantes com um excelente almoço, organizado por Joana Silva Pereira, que demonstrou absoluto dominio pela gastronomia da caça.










Salão do Cube de Tiro e Caça de Elvas durante o almoço oferecido pelo seu Presidente, Luís Villar Maior.

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*



Fotografia do grupo que esteve presente neste evento de captura. Francisco Pinto, João Martins, João Barroso, José Rainho, David Carpinteiro, João Serpa, João Mália, João Francisco, Eduardo Rainho, Pedro Ricardo, Joana Silva Pereira, Sebastião Miguel, Fábio Abade dos Santos, Luís Vilar Maior, Zé Luís, Margarida Duarte, André Serafim, Francisco Canhão, José Luís Martins, Sérgio Caldeira, vitor Martinho, João Gonçalves, Francisco Nunes, António Gonçalves.





Luís Villar Maior e Margarida Duarte exibindo a medalha do Clube

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

Luís Villar Maior, ofereceu à equipa de INIAV, uma medalha do Clube de Tiro e Caça de Elvas, que o Grupo +Coelho muito agradece.



Partida do Clube ao final da tarde, 12 horas depois da chegada a Elvas.



André Serafim e Fábio Abade dos Santos na madrugada de dia 19 a caminho de Elvas.

Não houve registo de animais lesionados durante o processo, tendo todos chegado ao destino sem quaisquer lesões.

O Grupo de Trabalho +Coelho agradece profundamente ao Sr. Luís Villar Maior a forma acolhedora e generosa como nos recebeu no Clube de Tiro de Elvas, a disponibilização das suas propriedades para a captura de lebres, o empenho e esforço que depositou no evento, a simpatia,

*8º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em **Elvas**, a 19 de outubro de 2019*

cordialidade e disponibilidade do Clube que preside para com o Grupo de Trabalho, sem esquecer o delicioso almoço servido no final da captura, confecionado pela Sra D. Joana Silva Pererira, que comprovou grande maestria no dominio da gastronomia de carne de caça.

Agradecemos ainda ao Dr. João Grave pelo material disponibilizado para esta captura.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 99
26 outubro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Inauguração da Escola de Caça, Pesca e Natureza na X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019

Decorreu nos dias 25 a 27 de outubro, no Pavilhão Desportivo Municipal da Vila de Mértola, a X Feira de Caça, organizada pela Câmara Municipal em colaboração com as seguintes entidades;



- Agrupamento de Escolas de Mértola,
- Apiguadiana- Ass. de Apicultores do Parque Natural do Vale do Guadiana,
- Associação de Galgueiros do Sul,
- Projeto Capital Cinegética,
- Escola Profissional Alsud,
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF),
- Federação Portuguesa De Caça (FENCAÇA),
- LPN/Life Imperial,
- Matilha Caça Menor do Algoz,
- ROMEIRAS - Caça e Turísmo, S.A.,
- Turismo Rural "O Alhinho",
- Zona de Caça Associativa Cerro do Moreno,
- Zona de Caça da Dorde/Santana de Cambas,
- Zona de Caça Turística "Moinho Monte Novo".

A Feira teve como objectivo promover as potencialidades cinegéticas do concelho e divulgar a importância desta atividade na valorização do território, na promoção do turismo e da gastronomia e na preservação da biodiversidade. A feira contou com a participação de muitos expositores dedicados à venda de produtos regionais e de material diverso de apoio à atividade cinegética, oferta de serviços, e à divulgação de atividades promovidas pelo setor cinegético.

Inauguração da Escola de Caça, Pesca e Natureza na X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019



Margarida Duarte no Stand da CNCP, na X Feira de Caça, em Mértola

Dos parceiros do Projecto +Coelho, estiveram presentes a FENCAÇA, a ANCP, a CNCP o ICNF e o INIAV.

Margarida Duarte, em representação do GT +Coelho, esteve presente na X Feira de Caça, assistindo à apresentação oficial da Escola de Caça, Pesca e Natureza, projeto da Escola Profissional ALSUD de Mértola (EP-ALSUD), cujos professores e alunos têm colaborado com o Projecto +Coelho em eventos de captura de lebres no âmbito de uma das medidas em desenvolvimento no Projecto +Coelho 2. A Escola de Caça, Pesca e Natureza conta já com 3 ações de formação, ministradas por Albert Ituren da Universidade de Valência e da Federacion de Caza de la Comunidad Valenciana (Segurança em Atos de Caça Maior) e Jorge Piçarra (Formação teórica e prática em Cães de parar).

Inauguração da Escola de Caça, Pesca e Natureza na X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019







Em cima: Isabel Campos (Diretora da EP ALSUD, Teresa Santos (Diretora Pedagógica da EP ALSUD) e João Grosso (Professor da Alsud e Coordenador da ECPN). Ao meio: João Grosso e em baixo: Isabel Campos(Diretora da EP Alsud), o Tenente General Nuno Augusto Teixeira Pires da Silva,(Comandante Operacional da Guarda Nacional Republicana) e Mario Martins (Presidente do Concelho de Admnistração da EP ALSUD)

Inauguração da Escola de Caça, Pesca e Natureza na X Feira de Caça, em Mértola, a 25 de outubro de 2019

Esta nova Escola aposta assim na formação e capacitação de jovens e adultos, através da frequência de diferentes tipologias de formações nas quais participarão especialistas nacionais e internacionais de muitas áreas, para que possam munir-se de conhecimento e experiência para responderem cabalmente às solicitações cada vez mais exigentes desta atividade nas áreas do maneio do habitat, da cinegética e do turismo, a nível regional, nacional e mesmo internacional.

A Feira ofereceu ainda aos visitantes momentos musicais, colóquios e um *Show Coocking*. Decorreu ainda durante a feira, a Taça Ibérica de St.º Huberto, uma montaria de caça maior, tiro aos pratos, corrida de cães galgos, o Campeonato Nacional de Caça de Salto "Fernando Pereira" e a largada de perdizes, faisões, pombos e patos.



Programa da X Feira de Caça de Mertola

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 100
27 outubro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019



Batedores alinhados e preparados para a enxota

Decorreu na Malhada-Velha, em Ferreira do Alentejo no passado dia 26 de outubro o 9º evento de captura de lebres, desta vez organizado pelo Eng. João Gonçalves, Presidente do Clube de Caçadores do Brunhal, na Herdade do Brunhal pertencente à família Raposo Gonçalves, em articulação com o Eng. Duarte Nuno (ICNF de Beja).

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019





À esquerda: Engº João Gonçalves na colocação das redes.
À direita: Duarte Nuno (ICNF, Beja) aguardando a chegada dos participantes no Clube de Caçadores do Brunhal.



João Gonçalves (à esquerda), Duarte Nuno (à frente, no meio) e Jorge Correia (atrás à direita), acompanhando os jovens batedores.

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019



À esquerda: Jorge Correia (Professor da FMV-UL) a conduzir diversos alunos para o local de captura.

Em baixo: Pedro Melo (membro da equipa da DGAV no Projecto +Coelho), Carina Carvalho (INIAV) e Jessica Monteiro.



O evento contou com a participação da Associação Galgueira de Cuba (representada pelo seu Presidente Jorge São Brás), da Associação Galgueira do Norte (representada pelo seu Presidente Jorge Bouça Nova) e da Faculdade de Medicina Veterinária da Lisboa que disponibilizou 12 estudantes voluntários, acompanhados pelo Professor Jorge Correia.

Esteve também presente o Dr. Brito Paes e o Dr. Pedro Melo (Médicos Veterinários). Participaram também como "voluntários reincidentes" de Loures e do Bombarral, Daniel Ramos, Filipe Serafim, Armando Vieira, Cristiano Franco e Manuel José.





À esquerda: Daniel Ramos a preparar-se para o processo de espera. À direita: Armando Vieira e Filipe Serafim colocando as estacas.

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019

Em conjunto, reuniram-se cerca de 50 pessoas com o objetivo de operacionalizar este evento de captura de lebres, imprescindível à execução da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2.



Transporte de pessoal para as redes.

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (Notícia 84).
Neste evento foram realizadas várias "enxotas" em olivais.

A equipa do INIAV no Projecto +Coelho e no Projecto Fight-Two (Margarida Duarte, Fábio Abade Santos e Carina Carvalho) explicaram aos presentes o contexto e os objetivos do evento de captura de lebres e deram a conhecer o âmbito das atividades gerais do Projeto +Coelho. Foram discritos os procedimentos a operacionalizar pela equipa das batidas ou enxotas e pela equipa de colocação e vigilância das redes.

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019

A colocação das redes de tresmalho esteve a cargo de Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário, INIAV), Pedro Melo (Médico Veterinário, DGAV) e de vários membros das Associações de Galgueiros cuja colaboração foi preciosa.



Da esquerda para a direita: Manuel José do Bombaral (voluntário do Bombarral), Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Daniel Ramos e Cristiano Franco (Voluntários de Torres Vedras).









Em cima à esquerda: Sebastião Miguel (Gestor de Caça) e Pedro Melo (Médico Veterinário da DGAV) colocando as redes. Em cima à direita:Pedro Melo e Jorge Boça Nova (Presidente do Clube de Galgueiros do Norte) colocando uma estaca. Em baixo: Batedores recolocando-se para as batidas.

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019

.





Equipa na colocação das redes e no reposicionamento



Cristiano Franco junto às redes, imóvel na espera,



Alguns dos participantes no evento em momento de confraternização

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019



Momento de pausa entre batidas



Almoço tardio no Clube da Caçadores do Brunhal

Não houve registo de animais lesionados durante o processo, tendo todos chegado ao destino sem quaisquer lesões.

9º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Malhada Velha, a 26 de outubro de 2019



Grupo que participou no evento sem alguns participantes que se retiraram mais cedo.

O Grupo de Trabalho +Coelho agradece a colaboração ao Clube de Caçadores do Brunhal, presidido por João Gonçalves, às Associações de Galgueiros, à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e a todos demais participantes. Agradecemos ainda ao Eng. Duarte Nuno Dr. João Grave o apoio incondicional que têm dado a esta causa.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 101
4 novembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019

No passado dia 29 de outubro, decorreu, na propriedade do Dr. Miguel Portela Morais, em Santa Clara do Louredo, em Beja, o 10º evento de captura de lebres, organizado por João Grave e José Maria Rasquila com a colaboração de António Mexia de Almeida, Adriano Mata e António Brito Paes.

O evento contou também com a participação de Sebastião Miguel (Gestor de Caça), da Associação de Galgueiros de Cuba (representada por Vasco Dotes e pelo Sr José) e com cerca de 20 estudantes do curso de Agropecuária da Escola Profissional Agricola de Torres Vedras Fernando Barros Leal, e seus professores Luísa Roque, Ana Paula Monteiro e Michael Santos.





Em cima:João Grave
Em baixo: Colocação de lebre em caixa de transporte

Estiveram também presentes Pedro Melo (DGAV) e Jéssica Monteiro (Médica Veterinários).

Reuniram-se neste evento cerca de 40 pessoas que ajudaram a concretizar a

captura de lebres, imprescindível à execução da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2.

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (ver Notícia 84).



À esquerda, João Grave instruindo os alunos da Escola Profissional Agricola Fernando Barros Leal (Runa, Torres Vedras) de como se faz uma enxota.



Sebastião Miguel (Gestor Cinegético), carregando uma saca com redes. Ao fundo uma carrinha com as caixas de transporte dos animais.

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019

Margarida Duarte (Médica Veterinária e Investigadora do INIAV) e Fábio Abade Santos (Médico Veterinário), explicaram aos participantes o contexto e os objetivos do evento de captura de lebres. Foram discutidos os detalhes operacionais da estratégia de captura desse dia.



Professores da Escola Profissional Agricola de Torres Vedras Fernando Barros Leal, Luísa Roque, Ana Paula Monteiro e Michael Santos.



Alunos da Escola Profissional Agricola de Torres Vedras Fernando Barros Leal

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019



Sara Fernandes (aluna de Medicina Veterinária), Sebastião Miguel, Jessica Monteiro (Médica Veterinária) e um aluno da Escola Profissional Agricola da escola , na recolha de redes.



Tiago Lopes (Aluno da EPAFBL) e João Grave (coordenador do evento) na distribuição do pessoal.

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019

Na colocação das redes de tresmalho esteve a cargo de Sebastião Miguel (Gestor de Caça), Fábio Abade dos Santos (INIAV), Margarida Duarte (INIAV) e de membros da Associação Galgueira de Cuba. Foram realizadas várias "enxotas" em olivais.



Sara Fernanades e Margarida Guerreiro (estudantes de Medicina Veterinária da FMV-ULisboa)



Margarida Guerreiro (Estudante do curso de Medicina Veterinária) e José (Associação de Galgueiros de Cuba), na recolha de redes

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019



Final da recolha dos alunos que participaram na batida, para concentração da equipa junto às redes





À esquerda: Alunos da EPAFBL. À direita: Professoras Luísa Roque e Ana Paula Monteiro à chuva, durante o evento.



Depois da chuvada.

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019



Vasco Dotes (Associação de Galgueiros de Cuba).



Pedro Melo e Jessica Monteiro



A esquerda: João (Estudante FMV), Fábio Santos, Sebastião Miguel
À direita: de António Mexia de Almeida , João Grave, José Maria Rasquila e Adriano Mata

10º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Santa Clara do Louredo, a 29 de outubro de 2019



Reunião do grupo no final do evento (por volta das 19h) para confraternização e snack.

Não houve registo de animais lesionados durante o processo, tendo todos chegado ao destino sem quaisquer lesões.

O Grupo de Trabalho +Coelho agradece profundamente a todos os participantes, em especial ao Director (Dr. Luís Carlos Lopes), Professores e Alunos da Escola Profissional Agricola de Torres Vedras Fernando Barros Leal, pela participação neste evento, e em eventos anteriores, que muito contribuiu para o sucesso das capturas.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 102
5 novembro 2019

Participação do GT +Coelho no encontro MIXOLEPUS-Avances en Investigation sobre el brote de mixomatosis em Liebres, Madrid, 30 de outubro de 2019.





A equipa do Projeto +Coelho esteve presente no 1º encontro do Grupo MIXOLEPUS intitulado ´***Avances en Investigation sobre el brote de mixomatosis em Liebres***' , que se realizou e Madrid, a 30 de outubro de 2019.

Os investigadores espanhois que participam neste projeto apresentaram os progressos cientificos registrados até o momento na investigação de surtos de mixomatose em lebres.

A reunião contou com a intervenção das principais entidades participantes do projeto, nomeadamente o IRTA (Research and Food Technologies) e CReSA (Centro de Pesquisa em Saúde Animal), e o Ministério da Agricultura. O Projecto Mixolepus tem financiamento dos Laboratórios Labiana e da Fundacão Artemisan. Também participam o Laboratório Veterinário Central de Algete, a Universidade de Oviedo, a Universidade de Córdoba, a Real Federação Espanhola de Caça, a Federação Espanhola de Galgos e a Junta Comunitária de Castilla-La Mancha.

Participação do GT +Coelho no encontro MIXOLEPUS-Avances en Investigation sobre el brote de mixomatosis em Liebres, Madrid, 30 de outubro de 2019

A situação em Portugal e Espanha é muito semelhante no que toca ao impacto da doença nas populações silvestre, pelo que a partilha de dados entre os dois países é extremamente importante pois pontencializa sinergismos e facilita soluções. O contacto do Grupo de Trabalho +Coelho tem-se feito mais diretamente com o Dr José Alberto Viñuelas de la Fuente, Director del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo, IRIAF, a quem agradeçemos a abertura e cordialidade.



FUNDO FLORESTAL PERMANENTE
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas
Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 103

29 novembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

Ação de Formação sobre o Inquérito Epidemiológico (Medida 7.3 do Projeto +Coelho 2), em Oeiras, a 28 de novembro de 2019

No passado dia 28 de novembro decorreu em Oeiras, entre as 14:00 e as 18:00 horas, uma ação de formação para os Técnicos das OSC, efetuada no âmbito da medida 7.3. do Projecto +Coelho 2, intitulada "Identificação das condições mais favoráveis ao coelho-bravo e à lebre-ibérica: consolidação do desenvolvimento de uma Plataforma Interativa e do inquérito Epidemiológico em sistema Survey123", que constou de duas sessões;

Na primeira parte da formação, Patrícia Taveres Santos (DGAV), apresentou o conteúdo do inquérito epidemiológico, e seus objetivos percorrendo as várias componentes do inquérito;

Parte I –Caracterização da Zona de Caça,

Parte II- Gestão Cinegética,

Parte III- Outras Informações.

O inquérito foi desenvolvido em parceria entre os membros da DGAV, INIAV e ANPC.



Patrícia Tavares Santos na Formação de dia 28 de novembro de 2019.

Ação de Formação sobre o Inquérito Epidemiológico (Medida 7.3 do Projeto +Coelho 2), em Oeiras, a 28 de novembro de 2019

Na segunda parte, João Fernandes (INIAV), co-responsável pelo desenvolvimento do inquérito na aplicação Survey 123, demonstrou com recurso a um tutorial, a instalação da aplicação e auxiliou os Técnicos na instação da referida aplicação nos dispositivos electrónicos pessoais (telemóveis, tablets, computadores portáteis).

Houve ainda lugar a uma sessão prática de testagem do inquérito pelos participantes.

Estiveram presentes António Moreira (CNPC), Sandra Esteves (CNPC), Ana Paula Ferreira (CNPC), Pedro Colaço (CNPC), Eduardo Valente (CNPC), Ana Perdigão (FENCAÇA), Jorge Santos (FENCAÇA), Paulo Paixão (FENCAÇA), Jorge Maia (FENCAÇA), Ricardo Neto (ANPC), João Carvalho (ANPC), Gonçalo Lopes (ICNF), Ana Serronha (CIBIO), Margarida Duarte (INIAV).



Da direita para a esquerda, Gonçalo Lopes (ICNF), João Carvalho (ANPC), Ana Serronha (CIBIO) e Técnicos das OSC durante a formação (Ricardo Neto (ANPC), Eduardo Valente (CNPC), Pedro Colaço (CNPC), Ana Perdigão (FENCAÇA), Jorge Santos (FENCAÇA), Paulo Paixão (FENCAÇA), Sandra Esteves (CNCP), Ana Paula Ferreira (CNCP), António Moreira (CNPC), Jorge Maia (FENCAÇA).

Na fase seguinte, e uma vez operacional, os Técnicos das 3 OSC levarão a cabo o preenchimento e submissão do Inquérito juntamente com os gestores das Zonas de Caça aderentes ao Projeto.

A automatização do descarregamento dos dados recolhidos para uma base de dados sediada no INIAV permitirá agilizar a análise estatística dos resultados e visualização gráfica de estatísticas básicas no formato dash-board, com representação da evolução temporal e geográfica das doenças no território, e disponibilização através de plataforma *online*.

A modelação dos dados recolhidos visa a construção de mapas de risco e a identificação das variáveis bióticas e abióticas que possam impactar na abundância e sanidade das populações de coelho-bravo e, também, de lebre. Esta informação será então disponibilizada às OSC e divulgada ao público, com diferentes graus de confidencialidade.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

+COELHO

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 104
16 de Dezembro 2019

11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado em Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019

No passado dia 14 de dezembro, decorreu, na propriedade de Hans e Carrie Jorgensen, Herdade de Cortes de Cima- Family Vineyeards, em Vidigueira - Beja, o 11º evento de captura de lebres, organizado por Anna Jorgensen e Sandra Coelho em colaboração com Fábio Abade dos Santos e João Grave.



Daniel Ramos, Mateus Ramos, Fábio Abade dos Santos, Sara Fernandes e João Jardim em curta paragem na vila da Vidigueira antes da captura.

O evento contou também com a participação de Daniel e Mateus Ramos, de dois alunos de Medicina Veterinária, Sara Fernandes e João Jardim, Adriano Mata e Clélio Silva ("Maninho") e com cerca de 20 pessoas destacadas para auxílio da batida.



Fábio Abade dos Santos e Sandra Coelho em ação de reconhecimento do terreno. O reconhecimento do terreno e a decisão sobre a melhor forma de realizar a batida, é uma ação prévia de crucial importância para o sucesso da ação.

Reuniram-se neste evento cerca de 30 pessoas que ajudaram a concretizar a captura de lebres, imprescindível à execução da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2.

11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (ver Notícia 84).



Daniel, Jorge e Sara no processo de montagem das redes de captura.



As redes são colocadas geralmente no sentido perpendicular à direçã da batida. A altura da rede, a tensão da mesma, entre outros aspectos, ditam a diferença entre o aprisionamento ou a fuga dos animais que emalham na rede.

11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019



A fase de espera realiza-se em absoluto silêncio e imobilização dos participantes, principalmente quando realizadas em vinhas onde a visibilidade por parte dos animais está facilitada.



Pessoal a dirigir-se para a linha de batida, dando assim início a mais uma tentativa de captura. No canto inferior direito pode ver-se uma das caixas, que são distribuídas ao longo da rede para colocação dos animais aquando da captura.

11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019



Francisco Caro (Pombinho)e Faustino colocadas nos postos de espera, até que se iniciasse a batida. Um deles, come favas desidratadas para não lhe faltar energia na corrida.



Engª. Sandra Coelho, João Carvalho e o Tiago Monte. e Dr. João Grave a acompanhar o processo de montagem de redes.

11º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Vidigueira, a 14 de dezembro de 2019



Entrada princial da Herdade de Cortes de Cima

A despedida de mais um evento de captura, faz-se com um sentimento agridoce, com mais uma evidência do estado crítico das populações deste leporídeo, tendo em conta que se observou e capturou um número reduzido de animais, mas, simultaneamente, com um sentimento de dever cumprido e de profundo agradecimento aos proprietários e demais colaboradores pela forma generosa como aceitaram este desafio e pela forma calorosa como nos receberam. Realizaram-se "enxotas" em olival, pinhal e alfarrobal.

Não houve registo de animais lesionados durante o processo, tendo todos chegado ao destino sem quaisquer lesões.

O Grupo de Trabalho +Coelho agradece profundamente a todos os participantes, em especial aos proprietários e à Engª Sandra Coelho, pela participação neste evento e pela total disponibilidade e entusiasmo com que abraçaram este desafio.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 105
30 dezembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019

No passado dia 28 de dezembro, decorreu, na Sociedade Agricola do Monte Novo-Figuerinha, em Beja, o 12º evento de captura de lebres, organizado por Fábio Abade dos Santos, João Grave e Sebastião Miguel com a colaboração do responsável pella propriedade, Sr. Filipe Cameirinha Ramos.

O evento contou também com a participação de Margarida Duarte (INIAV, Coordenadora do Projeto +Coelho), Daniel Ramos, Mateus Ramos e Sara Fernandes.



Adega da Figueirinha, Beja

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (ver Notícia 84).

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019

O evento, à semelhança de todos, iniciou-se com o nascer do sol, permitindo a todos os intervenientes observar o esplendor da alvorada.





Clélio Silva, presença assídua nestes eventos, é das pessoas mais experientes na colocação de redes e na captura de lebres. A sua atitude positiva e energia contagearam toda a equipa nos eventos eventos.

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019






O momento de colocação de redes é o processo mais exigente em termos de tempo e esforço físico. Na fotos, vemos a quantidade de pessoas envolvidas sendo importante o silêncio para que os animais não se sintam ameaçados e fujam. Entre outras pessoas, vemos Margarida Duarte e Sara Fernandes.



Rede depois de colocada, tendo sido extendidos perto de 2 km de rede.

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019



O processo de verificação das redes é também muito importante de forma a garantir que não existem locais de fuga e que a rede está colocada da melhor forma. Na foto vemos, da esquerda para a direita, Clélio Silva, Daniel Ramos, Sara Fernandes e Mateus Ramos.



Algumas das pessoas que participaram na batida, aguardam indicações de como decorrerá a batida seguinte.

Foram realizadas várias "enxotas" nas vinhas. Todos os animais chegaram ao seu destino sem registo de incidentes.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2:Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 105
30 dezembro 2019

Informações das atividades do GT +Coelho

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019

No passado dia 28 de dezembro, decorreu, na Sociedade Agricola do Monte Novo-Figuerinha, em Beja, o 12º evento de captura de lebres, organizado por Fábio Abade dos Santos, João Grave e Sebastião Miguel com a colaboração do responsável pella propriedade, Sr. Filipe Cameirinha Ramos.

O evento contou também com a participação de Margarida Duarte (INIAV, Coordenadora do Projeto +Coelho), Daniel Ramos, Mateus Ramos e Sara Fernandes.



Adega da Figueirinha, Beja

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em lebre-ibérica (ver Notícia 84).

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019

O evento, à semelhança de todos, iniciou-se com o nascer do sol, permitindo a todos os intervenientes observar o esplendor da alvorada.





Clélio Silva, presença assídua nestes eventos, é das pessoas mais experientes na colocação de redes e na captura de lebres. A sua atitude positiva e energia contagearam toda a equipa nos eventos eventos.

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019






O momento de colocação de redes é o processo mais exigente em termos de tempo e esforço físico. Na fotos, vemos a quantidade de pessoas envolvidas sendo importante o silêncio para que os animais não se sintam ameaçados e fujam. Entre outras pessoas, vemos Margarida Duarte e Sara Fernandes.



Rede depois de colocada, tendo sido extendidos perto de 2 km de rede.

12º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Herdade da Figueirinha, a 28 de dezembro de 2019



O processo de verificação das redes é também muito importante de forma a garantir que não existem locais de fuga e que a rede está colocada da melhor forma. Na foto vemos, da esquerda para a direita, Clélio Silva, Daniel Ramos, Sara Fernandes e Mateus Ramos.



Algumas das pessoas que participaram na batida, aguardam indicações de como decorrerá a batida seguinte.

Foram realizadas várias "enxotas" nas vinhas. Todos os animais chegaram ao seu destino sem registo de incidentes.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2:Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

|Número 106
13 janeiro 2020

Informações das atividades do GT +Coelho

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020

No passado dia 9 de janeiro, decorreu, na Herdade Rabo da Lagoa, na Freguesia de Santo Amador em Moura, propriedade do Sr. João Cardoso, o 13º evento de captura de lebres realizado pela equipa do Projeto +Coelho. A captura foi planeada em estreita articulação com o encarregado da Herdade, o Sr. José Carlos que se prontificou a acompanhar-nos nas 2 visitas de planeamento e no dia da captura. Importa ainda agradecer ao Eng. João Chamorro, Gestor da Herdade da Bacalhôa por ter sinalizado o local.

O proprietário, Sr. João Cardoso, autorizou prontamente a captura pelo reconhecimento que estes eventos têm para a preservação da natureza e da lebre-ibérica em particular. A Herdade Rabo da Lagoa representa um modelo de habitat favorável a lebre.



Sr. José Carlos colaborou durante a captura utilizando o veículo para "afugentar" os animais para a linha de batida. Ao fundo vêem-se algumas pessoas a posicionarem-se para outra batida e trazem em suas mãos, uma caixa com uma lebre capturada.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020

A Captura foi organizada por Fábio Abade dos Santos, Sebastião Miguel e José Carlos (Herdade Rabo da Lagoa) com a colaboração de João Grave, António Mexia de Almeida, Adriano Mata e Clélio.



Sebastião Migue dá algumas indicações aos elementos que participaram no evento. Com colete laranja (João Pereira, Canil Monte Pereira), vermelho (César Sousa, Canil Real de Óbidos) e em segundo plano Rafael Maria, estes parceiros da Amster, treinadores profissionais de cães, voluntariaram para ajudar neste evento. A sua ajuda foi preciosa e serviu ainda para demonstrar a alunos presentes da escola o papel que os cães de caça podem ter.



Carina Carvalho (INIAV) e Clélio Silva na colocação das redes. Atrás, a equipa cinotécnica que colaborou na batida.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020



Alguns intervenientes posicionam-se para a espera junto às redes.



Os restantes intervenientes distribuem-se em distâncias pré-estabelecidas para a iniciarem a batida.



Vista panoramica durante a batida.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020

Participou ainda João Grosso, Professor da Escola Profissional ALSUD (Mértola), que se fez acompanhar da sua turma de alunos do Curso Técnico de Gestão Cinegética. Esta turma de alunos, assim como o Professor João Grosso, têm sido presença recorrente em vários eventos organizados pela equipa +Coelho. A sua vontade de aprender, colaborar e energia positiva foram sempre constantes e essenciais para o sucesso dos eventos em que colaboraram.

Vários médicos veterinários estiveram presentes nesse dia, nomeadamente, Margarida Duarte (INIAV, Coordenadora do Projeto +Coelho), Fábio Abade dos Santos (Responsável pelo Ensaio de Vacinação, INIAV), Carina Carvalho e (INIAV), Jéssica Monteiro (INIAV), Patrícia Tavares Santos (DGAV) e Pedro Melo (DGAV). Sara Fernandes (Estudante da FMV) esteve presente colaborando na espera junto às redes.



Batedores sendo transportados para as frentes das batidas.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020

Na colocação das redes de tresmalho estiveram Clélio Silva, António Mexia, Adriano Moreira, Sebastião Miguel, Fábio Abade dos Santos, João Grave, Carina Carvalho, Margarida Duarte, Pedro Melo, Armando Abade dos Santos, Frederico Romão e Pedro Guerreiro.

As batidas foram realizadas por José Carlos, João Grosso e os seus alunos, Patrícia Tavares Santos, Jéssica Monteiro, Sebastião Miguel, bem como pela equipa cinotécnica já referida. Esteve ainda presente Anderson a realizar filmagens de drone, reconhendo imagens para um vídeo de divulgação.





Da esquerda para a direita: João Grosso (Escola ALSUD), Sebastião Miguel, Frederico Romão e Bruna (Escola ALSUD) colocando as redes.



Pedro Melo (DGAV) à esquerda, e António Mexia à direita, transportando uma lebre.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020



No fim, a ajuda de todos é ainda necessária para a recolha das redes. Aqui vemos Clélio Silva, vários alunos da Escola ALSUD, Patrícia Tavares dos Santos (DGAV) e Pedro Melo (DGAV).



César Sousa (Canil Real de Óbidos), com o seu exemplar da raça Epagneul Breton. Esta raça é caracterizada pela busca energética e metódica do terreno.

13º Evento de captura de lebre-ibérica realizado na Freguesia de Santo Amador em Moura a 9 de janeiro de 2020

A recolha de exemplares vivos de lebre-ibérica enquadra-se no âmbito do Ensaio de vacinação em l.ebre-ibérica (ver Notícia 84).



Um dos momentos altos destes eventos é a oportunidade para conhecer novas pessoas, realidades e saberes.

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 107
1 março 2020

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no II Forum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020



O Governo dos Açores realizou o II Fórum da Caça, na ilha Terceira, intitulado **'Caça nos Açores: Uma Visão Atual'**, organizado pela Direção Regional dos Recursos Florestais (DRRF) desta região autónoma. O evento decorreu no Centro Cultural e de Congressos de Angra do Heroísmo no passado dia 29 de fevereiro, reunindo caçadores e associações representativas, especialistas regionais e nacionais, numa reflexão conjunta e alargada sobre os desafios da caça nos Açores, por forma a garantir a sua sustentabilidade assente na preservação dos recursos naturais, e particularmente da biodiversidade local.

Estiveram presentes vários Parceiros do Projecto +Coelho 2, nomeadamente Paulo Célio Alves (Investigador do InBIO-CIBIO) que proferiu uma apresentação sobre a importância dos aspectos genéticos e sanitários das populações de espécies cinegéticas, e Fernando Castanheira Pinto, presidente da Confederação Nacional de Caçadores Portugueses, que falou sobre a importância social, ambiental e económica da caça.



Paulo Célio Alves no Centro Cultural e de Congressos de Angra do Heroísmo no passado dia 29 de fevereiro

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no II Forum de Caça na Ilha Terceira, 29 de fevereiro de 2020



Fernando Castanheira Pinto no Centro Cultural e de Congressos de Angra do Heroísmo no passado dia 29 de fevereiro

O painel de oradores contou ainda com António Emídio Santos (ICNF), Manuel Leitão (DRRF), Tiago Rodrigues (DRRF) e David Gonçalves (CIBIO-UP), cuja intervenção se intitulou ‘ Impacto da DHV nas populações de coelho-bravo dos Açores’.



David Gonçalves no Centro Cultural e de Congressos de Angra do Heroísmo no passado dia 29 de fevereiro

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho no 5º Encontro de Negaceiros e Caçadores de Pombos Torcazes, 28 de setembro de 2019

Na sessão de abertura intervieram o Sr. Secretário Regional da Agricultura e Florestas (João António Ponte), a Srª Diretora Regional dos Recursos Florestais (Anabela Isidoro), o Sr Presidente da Câmara Municipal de Angra do Heroísmo (Álamo Meneses) e o Presidente da Associação Terceirense de Caçadores (Luís Silveira).



FUNDO FLORESTAL PERMANENTE
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas
Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

+COELHO

Projeto "+Coelho2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 108
06 Março 2020

Informações das atividades do GT +Coelho

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

No âmbito do cumprimento da medida 7.6 do Projeto +Coelho 2, intitulada "Avaliação da eficácia de vacinas comerciais contra mixomatose em lebre-ibérica", a equipa do Projeto visitou vários locais para identificação de um alojamento adequado à manutenção dos exemplares de lebre-ibérica durante a realização do referido ensaio.

Para o efeito, foi lançado um concurso para apresentação de proposta de instalações e tratamento dos animais. Foi selecionado um local em Torres Vedras com características adequadas e excelente localização, quer pelo desenho dos parques e maior proximidade ao INIAV, quer pela paisagem e envolvência biogeográfica.

A equipa do Projeto +Coelho, juntamente com o técnico responsável pela manutenção dos animais (Sr. Sebastião Miguel, Gestor Cinegético experiente em leporídeos, e técnico responsável pela manutenção dos animais em cativeiro na medida 7.6), fez o levantamento das intervenções necessárias para adequação desse espaço, com vista ao aproveitamento de algumas estruturas existentes. O início das intervenções deu-se em agosto de 2019, tendo-se prolongado até março de 2020 (7 meses). As intervenções foram programadas, coordenadas e levadas a curso por Sebastião Miguel com a supervisão de Fábio Abade dos Santos (Médico Veterinário e membro da equipa +Coelho 2 do INIAV). As operações de adaptação foram custeadas e realizadas pela empresa adjudicada, mas contaram com a ajuda de mão-de-obra da equipa técnica do Gabinete de Gestão do Património do INIAV, nomeadamente de José Lopes, Artur Lopes e Paulo Apolo. Nas intervenções participaram também regularmente vários voluntários. Destacamos Daniel Ramos e Sara Fernandes que também colaboraram assiduamente nos eventos de capturas de exemplares de lebre-ibérica.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

As referidas instalações, localizadas em Torres Vedras, foram outrora alocadas à criação de perdiz-vermelha tendo essa atividade sido abandonada há vários anos. Acreditou-se que as instalações reuniam o potencial, após as intervenções necessárias, para o fim destinado.

Consistem em 8 parques individuais cada um compreendendo uma área coberta e uma área exposta ao sol.

A área envolvente consiste em vinhas onde não há registo de lebre-ibérica, um aspeto importante para reforçar a segurança epidemiológica do ensaio.

Antes de ser dar inicio às intervenções, Margarida Duarte e Fábio Santos convidaram Ana Paula Martins (Divisão de Bem-Estar Animal da DGAV) e Patrícia Tavares (Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal da DGAV, e membro da equipa do Projeto) a visitarem e avaliarem as instalações. A Equipa do Projeto agradece à Dra. Paula Martins os conselhos dados sobre as adaptações necessárias com vista ao cumprimento das condições de bem-estar para os animais. É ainda de referir a celeridade com que o ICNF na pessoa do Eng. Gonçalo Lopes (Chefe da Divisão de Recursos Cinegéticos e Aquícolas) tratou das diligências necessárias quer para a captura quer para o alojamento dos animais.





Instalações antes das intervenções. Vista frontal (em cima) e lateral (em baixo). Fotografias de 6 de agosto de 2019.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)





Instalações antes das intervenções. Vista posterior (em cima) e lateral direita (em baix0). Fotografia de 6 de agosto de 2019.

No primeiro dia de intervenção, em 6 de agosto de 2019, estiveram presentes Sebastião Miguel, Fábio Abade dos Santos, Daniel Ramos e os irmãos Diamantino Silva e Dinis Silva. Nesse dia foi feito o levantamento de todas as intervenções necessárias, nomeadamente do que seria necessário remover, limpar, substituir, intervir e construir de novo.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)





Daniel Ramos, Sebastião Miguel, Dinis Silva e Diamatino Silva e Fábio Abade dos Santos (a fotografar).



José Lopes e Paulo Apolo a iniciar as instalações das vedações.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

No segundo dia de intervenção (dia 10 de setembro de 2019), estiveram presentes Sebastião Miguel, Fábio Abade dos Santos, Daniel Ramos, José Lopes, Artur Lopes e Paulo Apolo. Deu-se continuidade aos trabalhos do dia anterior e iniciou-se a aplicação de vedações, imprescindíveis para conter os animais e evitar predação aérea e terrestre.



Daniel Ramos (à esquerda) e Artur Lopes (à direita), uma parelha muito eficaz e profissional.



Daniel Ramos (na foto a soldar) e Fábio Abade dos Santos estiveram no dia 19 de setembro de 2019 a efetuar a aplicação das janelas.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

Neste dia (19 de setembro de 2019) estiveram também presentes Daniel Ramos e Fábio Abade dos Santos. Foram realizadas algumas intervenções estruturais e a aplicadas as janelas nos espaços cobertos, para visualização dos animais. Nem mesmo a chuva demoveu a equipa de intervenção, altamente motivada.



Dinis a pregar, sobre chuva intensa (21 de setembro de 2019)



Paulo Apolo (à esquerda) e José Lopes (à direita) a aplicar as vedações (21 de novembro de 2019).

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Artur Lopes durante uma pequena pausa para repor as energias. A boa disposição que o caracteriza ficou registada nesta fotografia.



Sara Fernandes (aluna do 4º ano de Medicina Veterinária da FMV-ULisboa) a higienizar os bebedouros dos animais.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Sara Fernandes a cortar a malha de ferro para as janelas dos animais.



Sara Fernandes, mais uma vez, demonstra que não há trabalho de "homens".

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

Uma vez finalizadas as obras estruturais, em meados de dezembro de 2019, iniciaram-se os acabamentos e as intervenções para salvaguarda do bem-estar para os animais. No dia 30 de novembro de 2019, Fábio Abade dos Santos e Sara Fernandes concluíram a aplicação das janelas nos parques individuais e iniciaram a instalação de bebedouros e comedouros.

No dia 17 de dezembro de 2019 iniciaram-se as pinturas pela mão da equipa experiente dos técnicos do Gabinete de Gestão do Património do INIAV (GGP). O Projeto +Coelho muito agradece ao Diretor do GGP, Engº Paulo Dias Carvalho, a colaboração prestada e o esforço que sempre fez para conseguir responder positivamente às nossas solicitações. Nesse dia, pintaram-se zonas estratégicas com tinta antiferrugem, de forma a melhorar o bem-estar dos animais, e concluiu-se a colocação dos bebedouros, comedouros e de equipamentos para esconderijo dos animais.



José Lopes (atrás) e Paulo Apolo (à frente) preparam o equipamento para as pinturas.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



José Lopes a cortar chapa com rebarbadora para completar uma vedação.

Neste dia, Paulo Apolo pintou cerca de 100 m^2 cm recurso a ar comprimido.



Paulo Apolo a finalizar as pinturas daquele dia.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Artur Lopes prepara as superfícies para a pintura.



Diamatino e Sebastião Miguel a serrar madeira.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Sara Fernandes também participou nas pinturas.



A equipa do INIAV no último dia de trabalhos

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)

As intervenções foram concluídas em fevereiro de 2020.





Vista aérea das instalações captada por drone (captações por Anderson Sousa).

A equipa do Projecto presta ainda um agradecimento especial ao Dr. Benvindo Maçãs, Director da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos, pela disponibilização de aveia, trigo e centeio, produzidos no Polo de Elvas.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Sebastião Miguel segura uma cria nascida nas instalações.





Cria de lebre-ibérica nascida a 27 de Feveiro nas instalações do Ensaio 7.6 do Projeto +Coelho2.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto +Coelho2)



Fábio Abade dos Santos (à esquerda) e Sebastião Miguel (à direita), discutem alguns pormenores a seguir no maneio dos animais.



Fêmea adulta de lebre-ibérica a apanhar sol, na zona descoberta do parque onde esta alocada.

Intervenções nas instalações destinadas ao alojamento dos espécimes de lebre-ibérica durante o ensaio de vacinação (medida 7.6 do Projeto

Após sete longos meses de trabalho, as instalações encontram-se concluidas. Relembre-se que em paralelo se realizaram 13 eventos de capturas de animais em vários pontos do país (http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos/mais-coelho-em-noticia).

Estas instalações representam as primeiras instalações desenvolvidas para deter lebre-ibérica em semi-cativeiro em Portugal, o que foi possivel mediante autorização emitida pela Divisão de Recurso Cinegéticos e Aquicolas do ICNF (ao abrigo do ponto 1 do artigo 1º da portaria 464/2001 de 8 de maio), no âmbito do ensaio de vacinação atrás referido. Encontram-se à data cerca de 24 lebres instaladas nos 8 parques, não tendo sido registados eventos lesionais relacionados com problemas de desenho de instalações. Tendo em conta a ausência de modelos de instalações que pudessem ser seguidos, este facto representa seguramente uma enorme vitória.

A equipa do Projecto+Coelho considera assim estarem reunidas as condições para o cumprimento da medida 7.6 do Projeto + Coelho 2, financiado pelo Fundo Florestal Permanente. Estas instalações servirão como ponto de referência para eventuais estudos complementares que permitam aumentar o conhecimento, presentemente bastante escasso, sobre as características fisiológicas, comportamentais, alimentares e reprodutivas desta espécie tão icónica, e ameaçada, do nosso país.
Encontra-se em preparação um vídeo sobre a adaptação das instalações que será disponibilizado brevemente.

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 109
22 maio 2020

Divulgação do Projeto Figth-2 em artigo jornalístico na revista científica da American Association for the Advancement of Science (AAAS), uma organização international sem fins lucrativos

O **Projecto Fight-Two**, intitulado "Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) nos coelhos-bravos", financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020), foi referido num artigo jornalístico da revista Science da Associação Americana para o Avanço da Ciência (AAAs), publicado no passado dia 20 de maio de 2020, da autoria de Erik Stokstad, repórter da Science ao serviço da AAAS desde 1997, especialista em questões ambientais com enfoque nos recursos naturais, sustentabilidade e biologia da conservação além da agricultura, florestas e pesca.

O interesse pelo Projeto Fight-2 surge na sequência da deteção recente de RHDV2 nos Estados Unidos, nomeadamente no sul da California, em coelhos do género *Sylvilagus*, como o coelho-do-deserto (*Sylvilagus audubonii*), suscetível ao vírus. O artigo pode ser consultado em link https://www.sciencemag.org/news/2020/05/deadly-virus-killing-wild-rabbits-north-america.

Projecto Fight-2 põe em prática uma das medidas do Programa de Investigação do lano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Divulgação do Projeto Figth-2 em artigo jornalístico na revista científica da American Association for the Advancement of Science (AAAS), uma organização international sem fins lucrativos



Desert cottontails, like this healthy animal, are susceptible to a new virus. JOHN J. MOSESSO/U.S. GEOLOGICAL SURVEY

A deadly virus is killing wild rabbits in North America

By Erik Stokstad | May 20, 2020 , 2:40 PM

A deadly virus is **spreading** quickly among wild rabbits in southwestern North America, threatening populations and possibly endangered species. Last week the virus, which causes a hemorrhagic disease, reached Southern California.

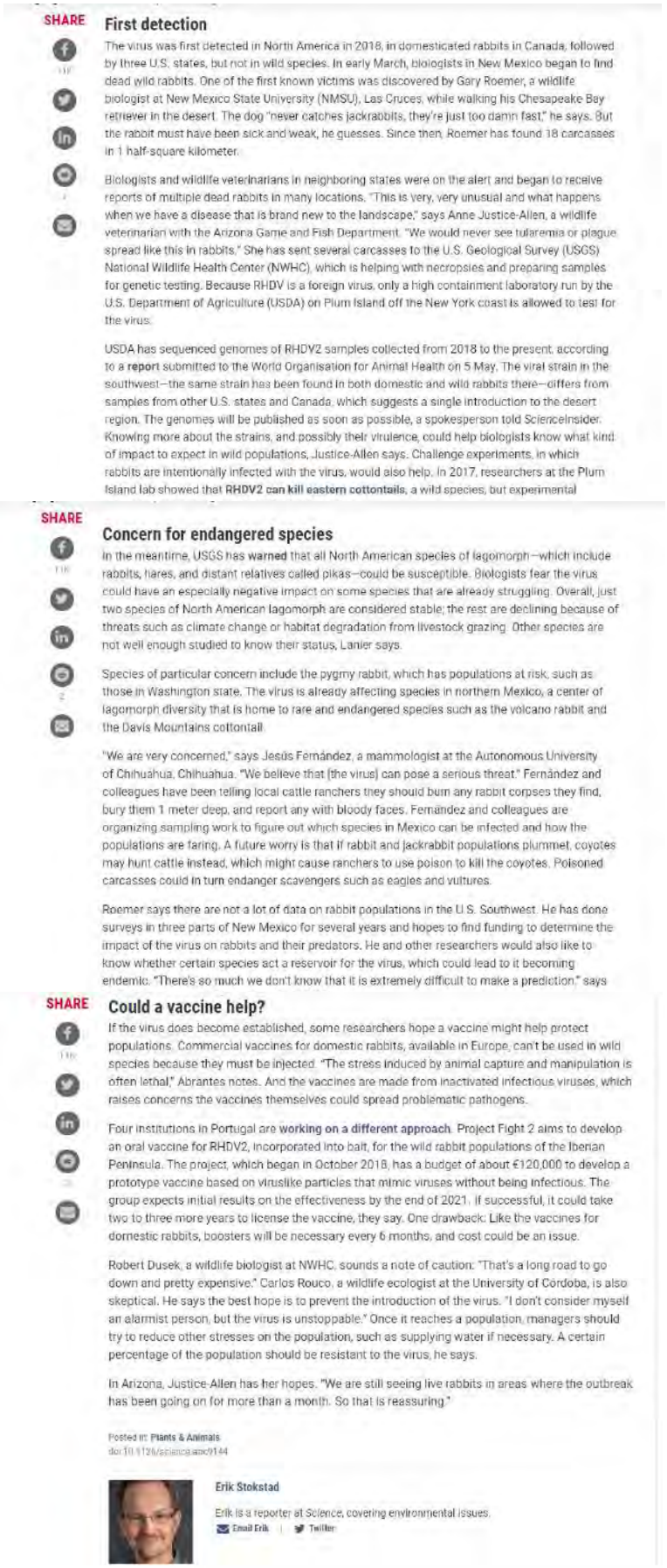
"The outlook right now is so unbelievably bleak," says Hayley Lanier, a mammologist at the University of Oklahoma. "We're simply left to watch the wave spread out and worry about imperiled species in its path."

Rabbit hemorrhagic disease virus first spread worldwide in the 1980s, devastating domestic rabbit populations in China and Europe. It raced through Australia, where feral rabbits had flourished after being introduced in the 18th century. Populations began to recover, but then a new strain emerged in France in 2010 that also kills wild species.

Strains of this new pathogen—rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2, also called *L. europaeus*/GI.2)—are more prone to recombination, which could explain the broader range of hosts, says Joana Abrantes, a researcher in virus evolution at the Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources in Portugal. The new strain is less deadly in adults, but unlike its predecessor it also kills young rabbits. After the virus hammered populations in the Iberian Peninsula, killing 60% to 70%, two predators that depend on rabbits also declined: the Spanish imperial eagle by 45% and the Iberian lynx by 65%.

Both types of RHDV are extremely infectious. They also persist in the environment, surviving in dead animals for at least 3 months. Predators and insects can spread it through their feces. The virus is now poised to spread throughout North America, says Robyn Hall, a veterinary virologist and epidemiologist with the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, where RHDV2 sped cross-country in 18 months between 2015 and 2016.

Divulgação do Projeto Figth-two em artigo jornalístico na revista científica da American Association for the Advancement of Science (AAAS), uma organização international sem fins lucrativos



SHARE

First detection

The virus was first detected in North America in 2018, in domesticated rabbits in Canada, followed by three U.S. states, but not in wild species. In early March, biologists in New Mexico began to find dead wild rabbits. One of the first known victims was discovered by Gary Roemer, a wildlife biologist at New Mexico State University (NMSU), Las Cruces, while walking his Chesapeake Bay retriever in the desert. The dog "never catches jackrabbits, they're just too damn fast," he says. But the rabbit must have been sick and weak, he guesses. Since then, Roemer has found 18 carcasses in 1 half-square kilometer.

Biologists and wildlife veterinarians in neighboring states were on the alert and began to receive reports of multiple dead rabbits in many locations. "This is very, very unusual and what happens when we have a disease that is brand new to the landscape," says Anne Justice-Allen, a wildlife veterinarian with the Arizona Game and Fish Department. "We would never see tularemia or plague spread like this in rabbits." She has sent several carcasses to the U.S. Geological Survey (USGS) National Wildlife Health Center (NWHC), which is helping with necropsies and preparing samples for genetic testing. Because RHDV is a foreign virus, only a high containment laboratory run by the U.S. Department of Agriculture (USDA) on Plum Island off the New York coast is allowed to test for the virus.

USDA has sequenced genomes of RHDV2 samples collected from 2018 to the present, according to a report submitted to the World Organisation for Animal Health on 5 May. The viral strain in the southwest—the same strain has been found in both domestic and wild rabbits there—differs from samples from other U.S. states and Canada, which suggests a single introduction to the desert region. The genomes will be published as soon as possible, a spokesperson told ScienceInsider. Knowing more about the strains, and possibly their virulence, could help biologists know what kind of impact to expect in wild populations, Justice-Allen says. Challenge experiments, in which rabbits are intentionally infected with the virus, would also help. In 2017, researchers at the Plum Island lab showed that **RHDV2 can kill eastern cottontails**, a wild species, but experimental

SHARE

Concern for endangered species

In the meantime, USGS has **warned** that all North American species of lagomorph—which include rabbits, hares, and distant relatives called pikas—could be susceptible. Biologists fear the virus could have an especially negative impact on some species that are already struggling. Overall, just two species of North American lagomorph are considered stable; the rest are declining because of threats such as climate change or habitat degradation from livestock grazing. Other species are not well enough studied to know their status, Lanier says.

Species of particular concern include the pygmy rabbit, which has populations at risk, such as those in Washington state. The virus is already affecting species in northern Mexico, a center of lagomorph diversity that is home to rare and endangered species such as the volcano rabbit and the Davis Mountains cottontail.

"We are very concerned," says Jesús Fernández, a mammologist at the Autonomous University of Chihuahua, Chihuahua. "We believe that [the virus] can pose a serious threat." Fernández and colleagues have been telling local cattle ranchers they should burn any rabbit corpses they find, bury them 1 meter deep, and report any with bloody faces. Fernández and colleagues are organizing sampling work to figure out which species in Mexico can be infected and how the populations are faring. A future worry is that if rabbit and jackrabbit populations plummet, coyotes may hunt cattle instead, which might cause ranchers to use poison to kill the coyotes. Poisoned carcasses could in turn endanger scavengers such as eagles and vultures.

Roemer says there are not a lot of data on rabbit populations in the U.S. Southwest. He has done surveys in three parts of New Mexico for several years and hopes to find funding to determine the impact of the virus on rabbits and their predators. He and other researchers would also like to know whether certain species act a reservoir for the virus, which could lead to it becoming endemic. "There's so much we don't know that it is extremely difficult to make a prediction," says

SHARE

Could a vaccine help?

If the virus does become established, some researchers hope a vaccine might help protect populations. Commercial vaccines for domestic rabbits, available in Europe, can't be used in wild species because they must be injected. "The stress induced by animal capture and manipulation is often lethal," Abrantes notes. And the vaccines are made from inactivated infectious viruses, which raises concerns the vaccines themselves could spread problematic pathogens.

Four institutions in Portugal are **working on a different approach**. Project Fight 2 aims to develop an oral vaccine for RHDV2, incorporated into bait, for the wild rabbit populations of the Iberian Peninsula. The project, which began in October 2018, has a budget of about €120,000 to develop a prototype vaccine based on viruslike particles that mimic viruses without being infectious. The group expects initial results on the effectiveness by the end of 2021. If successful, it could take two to three more years to license the vaccine, they say. One drawback: Like the vaccines for domestic rabbits, boosters will be necessary every 6 months, and cost could be an issue.

Robert Dusek, a wildlife biologist at NWHC, sounds a note of caution: "That's a long road to go down and pretty expensive." Carlos Rouco, a wildlife ecologist at the University of Córdoba, is also skeptical. He says the best hope is to prevent the introduction of the virus. "I don't consider myself an alarmist person, but the virus is unstoppable." Once it reaches a population, managers should try to reduce other stresses on the population, such as supplying water if necessary. A certain percentage of the population should be resistant to the virus, he says.

In Arizona, Justice-Allen has her hopes. "We are still seeing live rabbits in areas where the outbreak has been going on for more than a month. So that is reassuring."

Posted in: Plants & Animals
doi:10.1126/science.aaz9144

Erik Stokstad

Erik is a reporter at *Science*, covering environmental issues.
Email Erik | Twitter

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

|Número 110
21 Outubro 2020

Informações das atividades do GT +Coelho

Vírus recombinante da mixomatose das lebres está a afetar o coelho-bravo e o coelho doméstico

Como é do conhecimento de todos, em junho de 2018 surgiu um surto epidémico de mixomatose em Espanha, causando elevada mortalidade em lebre-ibérica, atribuída a um vírus da mixomatose recombinante (ha-MYXV), diferente das estirpes clássicas que afetam os coelhos bravos e da cunicultura. Este novo vírus caracteriza-se pela presença de genes adicionais com origem no MYXV ou em poxvírus de outras espécies.

Em outubro de 2018, este vírus foi também detetado em lebre-ibérica em Portugal, tendo este achado sido objeto de duas noticias (Noticia 55 e Notícia 56) e de uma publicação científica (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/myx_em_lebres.pdf).

A monitorização dos surtos verificados nos meses seguintes, tanto em Espanha como em Portugal, revelou que as estirpes clássicas de MYXV e de ha-MYXV circulavam separadamente em coelhos e em lebres, sugerindo alguma especificidade de cada vírus para cada uma das espécies de leporídeos.

No entanto, recentemente o ha-MYXV foi identificado como agente etiológico de mixomatose em coelhos-bravos (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/viruses_2020.pdf) e em coelhos domésticos (em publicação), evidenciando não só a sua capacidade para infetar também coelhos, como a circulação nas populações de coelho- bravo.

A capacidade de infetar coelhos e lebres favorece a transmissão do ha-MYXV entre as populações das duas espécies de leporídeos silvestres existentes em Portugal e consequentemente acelera a sua disseminação pelos territórios, agravando as preocupações relativas à futura sustentabilidade destas populações no nosso território. A monitorização sanitária contínua das populações das duas espécies é de extrema importância para que se possa avaliar a disseminação geográfica e o impacto do ha-MYXV vírus no coelho-bravo e na lebre-ibérica.

Vírus recombinante da mixomatose das lebres está a afetar o coelho-bravo e o coelho doméstico

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

|Número 111

28 outubro

2020

Informações das atividades do GT +Coelho

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



No âmbito dos objectivos operacionais da medida geral do Projecto +Coelho 2 que prevê o estabelecimento de uma rede piloto de cercados de reprodução modelo para a criação de coelho-bravo em zonas de caça das 3 Organizações do Sector da Caça de 1º nível decorreu no dia 27 de outubro, em Alpiarça (Distrito de Santarém), um

João Carvalho, Secretário Geral da ANPC

evento de captura de coelho-bravo com recurso a furões e redes de tresmalho, organizado por João Carvalho, Secretário Geral da ANPC com vista ao povoamento do Cercado de Reprodução construido na Companhia das Lezírias.



A captura foi precedida de trabalho de prospeção de núcleos populacionais com elevada densidade e que pudessem evidenciar altos níveis de

anticorpos/resistência a doenças, tendo-se identificado um núcleo existente na região, situado em Alpiarça, numa área periurbana e que possuía as condições desejadas, para além de ser um núcleo que, pela elavada densidade, causava prejuízos nas explorações agrícolas.

Obtida a autorização do proprietário dos terrenos em apreço para a realização da captura, proprietário esse que inclusivamente sofria prejuízos causados pelos coelhos nas pastagens, foi pela ANPC solicitado ao ICNF (e obtido) autorização para a captura de exemplares neste local, mediante credencial emitida para o efeito (CREDENCIAL N.º 2 / 2020 / Outras - DRCNFLVT/DECF CAPTURAS DE COELHO-BRAVO

A captura foi planeada em estreita articulação com o Senhor Eurico Ferreira (detentor de registo de furões) .

Participaram nesta ação de captura várias entidades afetas ao projecto MAIS COELHO, nomeadamente elementos da ANPC (João Carvalho) elementos do CIBIO (Nuno Santos, médico veterinário responsável e Henrique Pacheco), INCF (Gonçalo Germano e equipa de vigilantes da DRCNF LVT), DGAV (Pedro Melo) e INIAV (Margarida Duarte, Fábio Abade dos Santos e Carina Carvalho), entre vários outros voluntários que colaboraram nesta ação aos quais muito agradecemos.

O proprietário do terreno, autorizou a captura dos coelhos-bravos no local por este estar dedicado a pastoteio de ovelhas, e o núcleo populacional de coelhos causar prejuízos na pastagem e culturas agrícolas de terrenos circundantes.



Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



A equipa da Companhia das Lezírias, coordenada por José Luís Coelho (à esquerda) colaboraram na captura dos animais.



Pedro Melo (Médico Veterinário, DGAV) e Nuno Santos (Médico Veterinário, CIBIO)

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



Gonçalo Germano do ICNF (à direita) e atrás Rui Rodrigues Louro e Gabriel Bento Simões da equipa de vigilantes da natureza do ICNF que colaboraram na ação de captura.

Foram capturados 28 animais (17 fêmeas e 11 machos).



Desenrolar da ação de captura com a remoção de dois exemplares das redes periféricas

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



À esquerda, vigilância junto a uma caixa de transporte enquanto um coelho-bravo transita entre covas e um furão se prepara para entrar numa outra.

Em baixo, Madalena Carvalho, anotando os valores das medições

Todos os coelhos foram pesados, medidos e identificados com um brinco e um chip subcutâneo. Foi recolhida uma amostra de orelha para análise genética e uma amostra de sangue para titulação de anticorpos para o vírus da doença hemorrágica dos coelhos. Estes procedimentos foram dirigidos por Nuno Santos (CIBIO), e tiveram a colaboração da equipa de veterinários do INIAV e da DGAV.



Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



Henrique Pacheco e Nuno Santos (CIBIO) tomando medições de um exemplar.



Fábio Abade dos Santos, Margarida Duarte e Carina Carvalho(INIAV) recolhendo uma amostra de orelha para genotipagem de subespécie

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



Os animais foram transportados para as instalações da Companhia das Lezírias onde ficaram em quarentena enquanto se aguardavam os resultados das análises.



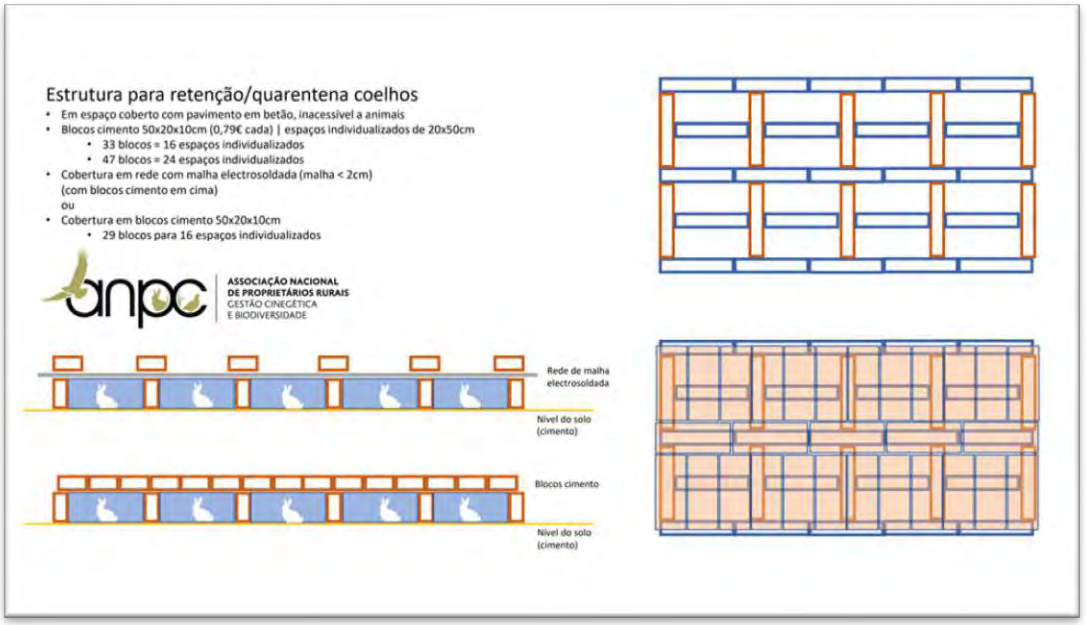
Os animais foram destribuidos por células individuais, com luzerna e cenouras à disposição, onde aguardaram até ao resultado dos testes genéticos e serológicos.

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020



João Carvalho colocando um coelho numa célula de quarentena.

A ANPC ideializou uma estrutura para a quarentena dos animais capturados de forma individualizada, de baixo custo e garantindo o bem estar dos exemplares, recorrendo a blocos de cimento dispostos de forma a criar uma matriz de células de retenção onde os animais ficaram retidos 72h até à obtenção dos resultados genéticos e de serologia.



Esquema da estrutura de retenção e quarentena idealizada pela ANPC.

Captura de coelhos-bravos para o Cercado da ANPC, em Alpiarça a 27 de outubro de 2020

A estrutura serviu ainda para assegurar a quarentena e desparasitação dos animais de acordo com indicações veterinárias, tendo sido administrada uma dose de desparasitante por via oral aquando da captura e uma segunda dose de desparasitante injectável, aquando da translocação dos exemplares para os cercados.

O CIBIO conseguiu obter os resultados das análises genéticas e serológicas dentro do prazo pretendido, as quais comprovaram que os coelhos capturados correspondiam na plenitude à subsespécie *Oryctolagus cuniculus algirus* e apresentavam elevados níveis de anticorpos.

A operação de captura e criação do núcleo fundador do cercado de reprodução criado pela ANPC na Companhia das Lezírias, combinando vários objectivos do projecto +COELHO2, revestiu-se assim de pleno sucesso, graças à combinação de esforços de toda a equipa e a um conjunto de boas vontades e voluntarismo de várias pessoas com as quais colaborámos e às quais agradecemos.

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

|Número 112
4 novembro 2020

Informações das atividades do GT +Coelho

Cercado de reprodução de coelho-bravo construído pela ANPC na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias

No âmbito dos objectivos operacionais da medida geral do Projecto +Coelho 2 que prevê o estabelecimento de uma rede piloto de cercados de reprodução modelo para a criação de coelho-bravo em zonas de caça das 3 Organizações do Sector da Caça de 1º nível, a ANPC construiu um cercado de reprodução na ZCT do Roubão, Braço de Prata e Outras, gerida pela Companhia das Lezírias.

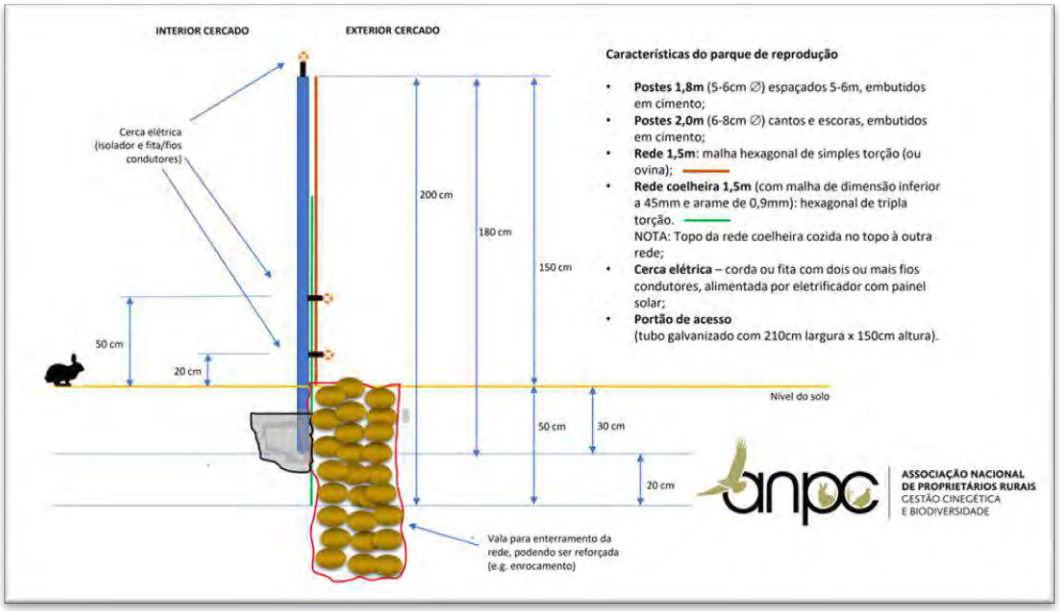
A construção do cercado foi precedida de trabalho de prospeção, tendo sido selecionada uma área onde historicamente ocorriam grandes densidades de coelho-bravo, beneficiando ainda de permitir o acesso a água e a energia elétrica produzida por paneis solares. O cercado foi instalado com recurso a aquisição de serviços de acordo com caderno de encargos definido pela ANPC.

A cerca perimetral foi instalada de forma a garantir o isolamento da população de coelhos no interior do cercado, bem como para prevenir a entrada de predadores terrestres. Para tal recorreu-se a uma combinação de redes de malhas diferenciadas bem como à instalação de três linhas sequenciais de cerca elétrica que impedem a entrada de predadores terrestres bem como impedem a utilização dos postes da cerca perimetral como poisos de caça para predadores alados, diurnos e noturnos.

A rede perimetral foi enterrada no solo e procedeu-se ao preenchimento da vala com pedra recorrendo a empréstimo em local próximo do parque, fazendo um enrocamento de baixo custo e de grande eficácia para reforçar a rede colocada, prevenindo a saída de exemplares do cercado bem como a entrada de predadores que tentassem escavar por baixo da rede.

Acresce que desta forma é ainda mais simples controlar a vegetação herbácea junto à cerca, a qual poderia comprometer o bom funcionamento da cerca eléctrica.

Cercado de reprodução de coelho-bravo construído pela ANPC na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias



Esquema do cercado construído pela ANPC na Companhia das Lezírias





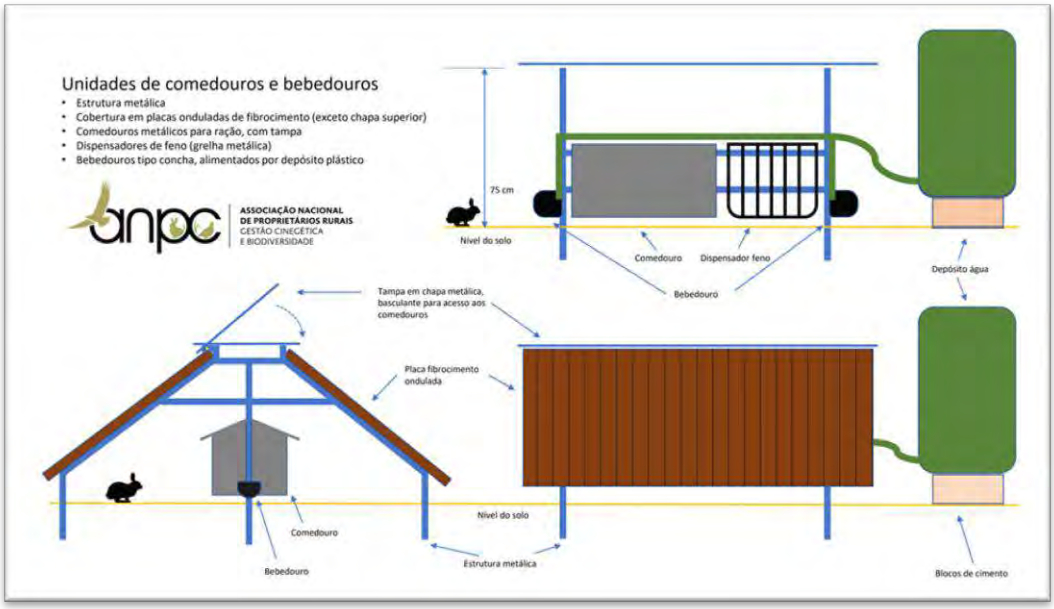
Vala perimetral e enrocamento

Não tendo sido possível cobrir a totalidade do cercado com rede de proteção por questões orçamentais, complementarmente foi criada uma proteção suplementar contra predadores alados, instalando uma grelha de cabos de nylon, agarrada aos postes da cerca perimetral, cruzando-se de forma a impedir e desincentivar o voo de aves de rapina.

A ANPC idealizou ainda um sistema de alimentação e abeberamento que foi executado, construindo unidades cobertas com comedouros (dispensadores de ração e dispensadores de feno) e bebedouros (próprio para coelhos). O sistema de alimentação de água é contínuo e permite ainda a realização de regas no interior

Cercado de reprodução de coelho-bravo construído pela ANPC na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias

do cercado caso seja considerado necessário para potenciar o crescimento de vegetação herbácea.



Unidades com comedor (ração e forragem) e água, desenvolvidos pela ANPC.

A gestão e vigilância corrente do cercado está a ser assegurada pela equipa da Companhia das Lezírias que tem dado uma colaboração extremamente importante, em articulação com a ANPC.

Para facilitar a monitorização, foram instaladas várias câmaras de fotoarmadilhagem que permitem ir avaliando a evolução da população.



Pormenores da cerca e da monitorização (José Luis Coelho da Companhia das Lezírias)

Cercado de reprodução de coelho-bravo construído pela ANPC na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias

A população fundadora deste cercado foi capturada em local próximo e com solos com características semelhantes, com recurso a credencial emitida pelo ICNF. As capturas foram realizadas sob coordenação da ANPC com o apoio do CIBIO, INIAV, ICNF, DGAV e Companhia das Lezírias.



Captura de coelho-bravo para núcleo fundador do cercado da Companhia das Lezírias.

Pretendia-se que a população fundadora deste cercado fosse constituída por indivíduos provenientes de núcleos de alta densidsde e com elevads níveis de anticorpos, tendo em vista comprovar se a seropositividade alta tem influência na produção do cercado e na capacidade de resistência dos animais, para potenciar ações de repovoamento.



O cercado dispõe de várias unidades onde é dosponibilizada comida e água aos coelhos.

Cercado de reprodução de coelho-bravo construído pela ANPC na ZCT gerida pela Companhia das Lezírias



A população fundadora do cercado instalado na Companhia das Lezírias dá sinais de boa adaptação e franco crescimento, detetando-se abundante reprodução.

A disponibilidade e interesse demonstrados pela Companhia das Leírias para abraçar o projeto +Coelho tem sido uma constante desde a primeira hora, decorrendo nesta zona de caça várias ações, desde a monitorização da população existente até à captura de exemplares para recolha de amostras, como já foi anteriormente noticiado pela equipa de projecto.

Agradecemos assim mais uma vez à Companhia das Lezírias, quer à Direção, quer à sua equipa e em especial ao Eng.º Rui Alves e José Luis Coelho, por todo o empenho e ajuda que têm dado ao projeto +Coelho, agora reforçada com a intervenção da equipa da Companhia das Lezírias no acompanhamento deste cercado de reprodução onde decorrem trabalhos de investigação relevantes.



Foram instaladas culturas para alimentação dos coelhos.

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto +COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 113

13 de dezembro de 2020

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020

O Grupo de Trabalho +Coelho 2 participou. com 3 apresentações orais, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos que teve lugar a 12 de dezembro de 2020 por via digital.



Margarida Duarte divulgou os resultados obtidos nos Projectos +Coelho 1 e +Coelho, Carina Carvalho apresentou as Linhas Gerais do Quadro Estratégico do Projcto FIGHT-TWO (desenvolvimento de vacina oral para RHDV2), e Fábio Abade dos Santos partilhou um método de diagnóstico molecular para gammaherpesvirus dos leporídeos de tipo 5 recentemente descoberto, que se encontra em desenvolvimento.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020

Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020-12-07

Linhas Gerais do Quadro Estratégico FIGHT-TWO: Desenvolvimento de uma Vacina Oral para o Controlo do Vírus da Doença Hemorrágica Viral de Tipo 2 (RHDV2) no Coelho-bravo

Carina L. Carvalho[1*], Fábio A. Santos[1,2], Hélio Tomás[3], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Jorge Correia[2], Berta São Brás[2], Conceição Peleteiro[2], Elsa Duarte[4], António Mira[4], António Roldão[3], Margarida D. Duarte[1,2]

1-Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.), Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras
2-Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
3-Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Avenida da República, Estação Agronómica, 2780-157 Oeiras
4-Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Instituto de Formação e Investigação Avançada (IIFA), Universidade de Évora, (UÉ) Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora

**Corresponding author:* Carina L. Carvalho (carina.carvalho@iniav.pt)

Resumo

O vírus da doença hemorrágica de tipo 2 (RHDV2) causa uma infeção sistémica altamente contagiosa e frequentemente letal no coelho Europeu (*Oryctolagus cuniculus*). Desde a sua emergência em França em 2010, é um dos principais fatores subjacentes ao declínio da espécie na Península Ibérica, afetando direta e indiretamente predadores ameaçados que dela dependem.

As vacinas comerciais atualmente disponíveis para RHDV2 são inativadas, obtidas de extratos de fígado de animais infetados, ou recombinantes utilizando o vírus da mixomatose como vetor. São de administração subcutânea, sendo por isso inadequadas para as populações selvagens de coelho-bravo, na medida em que exigiriam a captura e manipulação dos animais.

O Projecto FIGHT-TWO (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020) visa o desenvolvimento e produção de uma vacina oral, segura contra DHV (Doença Hemorrágica Viral dos coelhos) para ser distribuída no campo em alimento. Esta nova vacina tem o potencial de proteger uma ampla proporção das populações silvestres, permitindo reduzir a transmissão do vírus e controlar a doença, ultrapassando simultaneamente a necessidade de manipulação dos animais.

Esta vacina baseada em partículas de tipo viral (VLPs) de VP60 (proteína maioritária da cápside viral) será produzida em células de inseto infetadas com baculovírus (IC-BEVS) recombinantes e será atualizada de acordo com a evolução do vírus.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020

Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020-12-07

o molecular do gammaherpesvirus dos leporídeos de tipo 5 por qPCR com sistema Taqman ou SYBR green

Fábio Abade dos Santos[1*], Carina Carvalho[1], Teresa Fagulha[1], Margarida D. Duarte[1]

[1]Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Laboratório de Virologia, Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), 2780-157 Oeiras, Portugal

**Corresponding author:* Fábio Abade Santos (fabio.abade@iniav.pt)

Resumo

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) é a única espécie de lebre existente em Portugal e juntamente com o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*), constituem os únicos leporídeos do nosso país. Fazendo parte do nosso património genético, estas espécies icónicas são fundamentais para o equilíbrio dos ecossistemas mediterrânicos.

Não existem estudos que avaliem de forma holística e sistemática as causas do declínio da lebre-ibérica, e também é escasso o conhecimento sobre o estado sanitário das populações existentes. Recentemente, o interesse dos investigadores por esta espécie aumentou, devido à emergência da mixomatose em 2018.

Também em 2018, foi descrito pela primeira vez um herpesvirus das lebres, denominado gammaherpesvirus dos leporideos de tipo 5 (LeHV-5), cujo impacto real ainda não é totalmente conhecido, embora já tenha sido associado a mortalidade e reconhecido o seu impacto reprodutivo. Este vírus é frequentemente encontrado em co-infeção com o vírus da mixomatose, nomeadamente com o vírus recombinante (ha-MYXV) que emergiu em 2018.

A monitorização do estado frágil desta espécie em Portugal e em Espanha, implica a utilização de ferramentas de diagnóstico precisas, rápidas e económicas.

Está presentemente em desenvolvimento um método de diagnóstico molecular do LeHV-5 por PCR em tempo real (qPCR). A análise *in silico* e *in vitro* demonstrou uma eficácia, sensibilidade e especificidade de 100%. Para controlo da extração e da amplificação, foi desenhado um controlo interno utilizando o gene do 18S rDNA. O sistema permitirá a quantificação das cargas virais, e a utilização de uma sonda TaqMan ou, alternativamente, do sistema SYBR green.

Participação do Grupo de Trabalho +Coelho, na VI Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020

Reunião da Associação Ibérica de Veterinários de Fauna Selvagem e de Parques Zoológicos, 12 de dezembro de 2020-12-07

2,5 ANOS DE PROJETO +COELHO (agosto 2017- dezembro 2020); Atividades desenvolvidas e alguns dos resultados alcançados

Margarida D. Duarte[1*], Carina Carvalho[1], Fábio Abade dos Santos[1], Teresa Fagulha[1], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Jacinto Gomes[1], Helga Waap[1], António Roldão[2], Paulo Célio Alves[3], Pedro Esteves[3], Joana Abrantes[3], Nuno Santos[3], Ana Serronha[3] Pedro Monterroso[3], Patrícia Tavares[4], Pedro Melo[4], Gonçalo Lopes[5], Ana Hora[5], João Carvalho[6], Fernando Castanheira-Pinto[7], Jacinto Amaro[8]

[1]Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), 2780-157 Oeiras, Portugal
[2]Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Avenida da República, Estação Agronómica, 2780-157 Oeiras, Portugal
[3]Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos & Dep. Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, nº 7, 4485-661 Vairão, Portugal
[4]Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Campo Grande, 50, 1700-093 Lisboa, Portugal
5.Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF, I.P.), Av. da República 16, 1050-191 Lisboa, Portugal
[6]Associação Nacional de Proprietários Rurais Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC), Rua Mestre Lima de Freitas, 1-5º, 1549-012 Lisboa, Portugal
[7]Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP), Rua Dr. António Oliveira Cruz, 18, 5340-238 Macedo de Cavaleiros, Portugal
[8]Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Rua 25 de Abril, Lote 20 – Cave B, 2100-126 Coruche, Portugal

**Corresponding author*: Margarida Dias Duarte (margarida.duarte@iniav.pt)

Resumo

No final de maio de 2017, em resposta às preocupações das Organizações do Setor da Caça, também sentidas pela academia e por vários grupos de investigadores do país, o Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural de Portugal determinou, pelo despacho 4757/2017, 31 de maio, a constituição de uma parceria de nove membros, coordenada pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), para implementação de uma estratégia integrada para contrariar o efeito do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) na diminuição abrupta da população de coelho-bravo. Os parceiros incluem a Autoridade Nacional de Saúde Veterinária (DGAV), o Instituto Nacional de Conservação (ICNF), dois institutos privados (CIBIO, OMV) e as principais Organizações Nacionais de Caça (Fencaça, ANPC e CNCP).

O Plano de Ação, designado Plano de Ação para o Controle da Doença Hemorrágica dos Coelhos, com enfoque nos dois leporídeos silvestres de Portugal (*Oryctolagus cuniculus algirus* e *Lepus granatensis*), foi elaborado pelas instituições parceiras compreendendo 12 medidas principais, distribuídas pelos 3 eixos definidos no despacho, nomeadamente 1) Programa de Investigação, 2) Práticas de gestão e 3) Vigilância Sanitária. Foi incluído um 4º eixo para disseminação e transferência de conhecimento.

Até agora o Plano de Ação tem vindo a ser operacionalizado por projectos anuais (Projecto +Coelho 1 e Projecto +Coelho 2), financiados pelo Fundo Florestal Permanente (ICNF).

São apresentados alguns dos resultados alcançados decorrentes da vigilância sanitária e sumarizados os outputs da parceria.

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Anexo VII-B

Manual de Boas Práticas de Gestão (Versão de Trabalho)



FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

REPÚBLICA PORTUGUESA

+COELHO

RECUPERAÇÃO DO COELHO-BRAVO
(*Oryctolagus cuniculus*)
e
LEBRE-IBÉRICA (*Lepus granatensis*)

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE GESTÃO CINEGÉTICA

2021

FICHA TÉCNICA

Coordenação da Edição: Paulo Célio Alves (CIBIO), Gonçalo Lopes (ICNF), Margarida Duarte (INIAV, I.P.)

Contribuições:
CIBIO: João Queirós, Ana Serronha, Nuno Santos, David Gonçalves, Pedro Monterroso, Pedro Esteves, Joana Abrantes, Ana Lopes
ICNF: Ana Hora
INIAV: Fábio Abade dos Santos, Carina Carvalho, Teresa Fagulha, Mónica V. Cunha
DGAV: Pedro Melo, Patrícia Tavares Santos
FENCAÇA: Jacinto Amaro
CNCP: Fernando Castanheira-Pinto, José Bernardino
ANPC: João Carvalho, António Paula Soares

Ilustrações: ?
Design gráfico: Ana Paula Alves (o final, não este)
Produção:?

Depósito Legal: ?

Edição: Grupo de Trabalho +Coelho (2021)

Citação recomendada: GT +Coelho 2/CIBIO/ICNF/DGAV (2021). Recuperação do Coelho-Bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e Lebre-Ibérica (*Lepus granatensis*). Manual de Boas Práticas de Gestão Cinegética. Fundo Florestal Permanente

Confidencial. Documento de trabalho não finalizado

Manual financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE no âmbito do Projeto "+COELHO 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal".

Indice

1. **Nota Introdutória**
2. **A origem dos leporídeos silvestres de Portugal**
3. **Importância dos leporideos de Portugal**
4. **O coelho-bravo: características gerais da espécie**
5. **A Lebre-ibérica: características gerais da espécie**
6. **Medidas gerais para mitigar o declínio do coelho-bravo e da lebre-ibérica**
   - *6.1 Prevenção e Controlo de doenças*
   - *6.2 Gestão de habitat: medidas de disponibilização de abrigo*
   - *6.3 Gestão de habitat: medidas de disponibilização de alimento*
   - *6.4 Gestão de habitat: medidas de disponibilização de água*
   - *6.5 Gestão de habitat: medidas de controlo de predação*
   - *6.6 Adequação da Pressão Cinegética*
   - *6.7 Repovoamentos de Coelho-Bravo e de Lebre-Ibérica*

7. A Gestão Cinegética dos Leporideos e a Importância do conhecimento demográfico e sanitário das populações

8. Considerações Finais

9. Legislação Aplicável

10. Referências Bibliográficas

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Indice de Figuras

Figura 1.
Figura 2.
Figura 3.
Figura 4.
Figura 5.
Figura 6.
Figura 7.
Figura 8.
Figura 9.
Figura 10.
Figura 11.
Figura 12
Figura 13.
Figura 14.
Figura 15
Figura 16.
Figura 17.
Figura 18
Figura 19.
Figura 20.
Figura 21

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Manual de Boas Práticas de Gestão Cinegética Dirigidas ao Coelho-Bravo e à Lebre-ibérica

1. Nota Introdutória

Neste Manual de Boas Práticas Cinegéticas, orientado para o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e para a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), revêem-se os princípios reguladores da atividade cinegética dirigida a ambas as espécies, enquanto importantes recursos naturais e cinegéticos, bem como as boas práticas necessárias à sua preservação e exploração, tendo em vista a recuperação e o fomento das populações selvagens, a sua gestão sustentável e a compatibilização da atividade cinegética com a conservação da biodiversidade.

O grupo de trabalho +Coelho, constituído pelo Despacho nº. 4757/2017 de 31 de maio, concebeu o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (PACDHVC), que visa reverter a tendência de decréscimo acentuado das populações de coelho-bravo através da implementação de medidas de curto, médio e longo prazo, inseridas em quatro eixos: investigação, boas práticas de gestão, controlo sanitário, e comunicação & divulgação. Algumas destas medidas têm sido suportadas pelo Fundo Florestal Permanente, *Eixo IV – Funções Ecológicas*, *Sociais e Culturais da Floresta* | *Ação: Intervenções Relativas Aos Recursos Cinegéticos*, através do financiamento do projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" (1 de agosto de 2017 1 31 de outubro) e do projecto "+COELHO 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal" (1 de novembro de 2018 e 30 de junho de 2020).

O Plano de Ação tem enfoque principal no coelho-bravo e na doença hemorrágica viral causada pela variante 2 do vírus (RHDV2, RHDVb ou GI.2). No entanto, contempla medidas que incidem também na lebre-ibérica e em outros agentes infeciosos relevantes, nomeadamente no vírus da mixomatose, que desde 2018 tem afetado esta espécie de forma relevante.

As áreas de intervenção do Projeto +COELHO foram, numa primeira fase, cerca de meia centena de zonas de caça, distribuídas de norte a sul do território de Portugal continental. Apesar das boas práticas agrícolas e cinegéticas serem de especial relevância nesta rede de áreas ordenadas aderentes, a sua aplicação é igualmente importante em todas as áreas de ocorrência do coelho-bravo e da lebre-ibérica, e, portanto, aplicáveis à generalidade do território de Portugal Continental e Ilhas.

A monitorização contínua e sistemática das populações animais é primordial para uma gestão autosustentada e equilibrada. Apenas com base em informação correta e atualizada, é possivel adequar as medidas de gestão à realidade. Em situações de grande redução, as entidades gestoras deverão suspender o exercício da caça, ainda que se encontre a decorrer oficialmente o período venatório da espécie em questão. A pressão excessiva de caça pode acentuar o

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

declínio de populações, principalmente quando estas enfrentam outros fatores de ameaça, pelo que o esforço cinegético deve ser sempre adequado à realidade no campo.

As entidades da administração do Estado com responsabilidades e competências em matéria de recursos cinegéticos, ambiente, sanidade e diagnóstico laboratorial, e os institutos académicos e de investigação que desenvolvem trabalho relevante em espécies cinegéticas, devem ser vistos como parceiros nas diferentes atividades relacionadas com a caça. Estas entidades têm o potencial de gerar conhecimento técnico-científico sobre as espécies cinegéticas e, em estreita articulação com as organizações do setor e com os caçadores, gestores, guarda-florestais, apoiar a ajudar a reverter as tendências de declínio e a mitigar os fatores de ameaça que assolam várias espécies de caça menor.

Somente através de parcerias estratégicas e do exercício e demonstração sistemáticos e continuados de boas práticas venatórias e da adoção de práticas de gestão ecológica, se conseguirá recuperar espécies em declínio e manter a composição e estrutura das comunidades silvestres.

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

2. A Origem dos leporídeos selvagens de Portugal

O coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*) e a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), são as duas únicas espécies de leporídeos selvagens existentes em Portugal.

O coelho-bravo é originário da Península Ibérica, onde estão descritas duas subespécies (*Oryctolagus cuniculus algirus* e *Oryctolagus cuniculus cuniculus),* que divergiram há cerca de dois milhões de anos e atualmente são diferentes a nível genético, morfológico, ecológico comportamental. A distribuição natural da subespécie *O. c. algirus* está restrita ao sudoeste da Península Ibérica, enquanto a subespécie *O. c. cuniculus* ocorre no nordeste da Península Ibérica e sul de França. Existe, no entanto, na Península Ibérica, uma faixa de sobreposição da distribuição das duas subespécies onde ocorre hibridação natural (Figura 1).

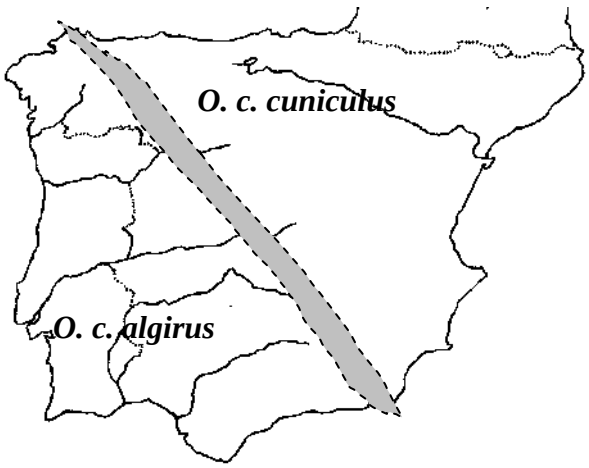


Figura 1. Distribuição geográfica das duas subspécies de coelho-europeu, Oryctolagus cuniculus algirus (*O. c. algirus*) e Oryctolagus cuniculus cuniculus (*O. c. cuniculus*), com base em múltiplos marcadores moleculares. A zona de hibridação entre estas duas subespécies está indicada a cinzento. Adaptado de Ferreira e Alves (2006).

A subspécie *Oryctolagus cuniculus algirus* é a única subespécie existenteem Portugal, ocupando também cerca de metade do território de Espanha. Até aos anos 50 a densidade populacional do coelho-bravo foi muito elevada no nosso país, levando inclusivamente a

prejuízos agrícolas, sendo pontualmente descritos como uma "praga". Porém, nas últimas décadas, as populações de coelho-bravo sofreram uma diminuição acentuada, quer em número, quer em distribuição geográfica, estimando-se que atualmente existam apenas 5 a 10% da população de há 50 anos atrás e que, ainda assim, o coelho-bravo se encontre em diminuição acrescida de cerca de 20% por ano na Península Ibérica (1).

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), é também endémica e autóctone da Península Ibérica. É e a única espécie de lebre existente em Portugal, e a sua área geográfica estende-se pelo sudoeste de Espanha.

3. O valor inestimável do coelho-bravo e da lebre-ibérica

Enquanto espécies autóctones, o coelho-bravo e a lebre-ibérica estão profundamente adaptadas aos seus territórios de origem, constituindo um património genético e uma riqueza inestimável para a biodiversidade dos ecossistemas locais.

O coelho-bravo é uma espécie-chave nos ecossistemas mediterrânicos, particularmente na Península Ibérica, onde exerce uma importante influência ecológica sobre as comunidades vegetais e animais, tanto de invertebrados como de vertebrados.

O coelho-bravo e a lebre-ibérica ocupam um lugar basilar nas diversas e complexas cadeias tróficas que envolvem muitas outras espécies de predadores. O coelho-bravo é uma das principais presas de pelo menos 27 espécies de aves de rapina, 11 espécies de carnívoros e duas espécies de serpentes. Entre elas destacam-se o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*), onde o coelho-bravo é parte significativa das suas dietas, e cujas suas reduções acompanharam o declínio do coelho-bravo. Algumas destas espécies apresentam estatuto de conservação ameaçado, associado à diminuição das populações de coelho-bravo.

Não obstante a sua importância ser há muito reconhecida, a diminuição das populações selvagens de coelho-bravo e de lebre-ibérica vem ocorrendo continuadamente há várias décadas, levando a que, em 2019, o coelho-bravo fosse pela primeira vez na história, classificado como "Ameaçado" pela União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN).

Embora atualmente as populações da lebre-ibérica sejam ainda consideradas estáveis, a sua redução progressiva, aleada à emergência recente de doenças infeciosas graves de origem viral irão certamente desencadear a reclassificação para um estatuto de maior preocupação.
Entre os fatores extrínsecos que afetam os leporídeos, encontra-se a perda de habitat e sua fragmentação, devido à alteração das práticas agrícolas, à desertificação do mundo rural, aos incêndios florestais, assim como a caça e predação excessivas e, sobretudo, a emergência de doenças infeciosas.

O seu valor é reconhecido em múltiplas esferas de atividade da sociedade e a relevância do papel dos leporídeos selvagens faz-se sentir claramente nos setores social e económico,

Confidencial. Documento de trabalho não finalizado

nomeadamente no impacto que têm na preservação das tradições, no turismo da natureza, na atividade cinegética e, indiretamente, no turismo rural e na hotelaria.

4. O coelho-bravo: características gerais da espécie

O coelho-bravo pertence à família Leporidae da ordem Lagomorpha. É um pequeno herbívoro generalista, com cerca de 40 cm de comprimento, de cor acinzentada, e com orelhas relativamente curtas (menores que o comprimento da cabeça). No campo, é reconhecido pelo apertado ziguezague da sua corrida e pela cor branca na face inferior da cauda.



Figura 2. Exemplar de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) em vigilância (foto de Sebastião Miguel).

Confidencial Documento

Morfologicamente, as subespécies de coelho distinguem-se principalmente pelo tamanho, sendo que o *O. c. algirus* é mais pequeno, apresentando um peso adulto médio de 1,0 kg, enquanto que o *O. c. cuniculus* apresenta um peso adulto médio de 1,2 kg. O peso varia entre machos e fêmeas em ambas subespécies, sendo as fêmeas ligeiramente mais pesadas. A subespécie *O. c. algirus* apresenta também orelhas e membros posteriores mais pequenos que a subespécie *O. c. cuniculus* (Tabela x).

Biometrias	Subespécie	Machos adultos	Fêmeas adultas	Machos e fêmeas adultos
Tamanho da orelha (mm)	*O. c. algirus*	72,6 ± 5,7	72,9 ± 5,8	72,8 ± 5,7
	O. c. cuniculus	79,1 ± 4,7	78,4 ± 4,9	78,8 ± 4,8
Tamanho do membroposterior (mm)	*O. c. algirus*	56,2 ± 3,5	56,6 ± 3,3	56,4 ± 3,4
	O. c. cuniculus	59,6 ± 3,8	59,3 ± 2,7	59,4 ± 3,3
Peso (g)	*O. c. algirus*	1003,2 ±120,3	1102,4 ± 138,6	1043,3 ± 137,3
	O. c. cuniculus	1208,7 ± 159,8	1257,7 ± 174,9	1234,5 ±169,3

Tabela 1. Principais diferenças morfológicas entre as subespécies *Oryctolagus cuniculus algirus* (*O. c. algirus*) e *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (*O. c. cuniculus*). Os valores apresentados dizem respeito à media± desvio padrão. Adaptado de Ferreira et al. 2015.



Figura 3. Paisagem mediterrânica característica.

Confidencial, Documento

Na Península Ibérica, a reprodução do coelho-bravo ocorre principalmente no inverno e na primavera, quando estão reunidas as condições ecológicas e climatéricas adequadas, sobretudo quanto à disponibilidade e qualidade de alimento. Na estação mais quente e seca, e consequentemente, de maior escassez de alimento e água, ocorre, de uma forma geral, uma pausa na atividade reprodutora da espécie. Geralmente, a espécie atinge o máximo populacional no início do verão.

É uma espécie polígama, que pode reproduzir-se no primeiro ano de vida. O período de gestação é de 28 a 30 dias. Podem ocorrer 3 a 5 ninhadas por ano, cada uma delas com 3-6 láparos, que nascem sem pelo e com os olhos fechados. As fêmeas utilizam tocas de reprodução, que podem ser totalmente separadas, ou com ligação às tocas de refúgio.

A distribuição e a abundância de coelho-bravo dependem de vários fatores, dos quais se destacam a qualidade do habitat, disponibilidade de alimento e água, predação natural, pressão cinegética e estado sanitário.
O coelho-bravo é uma espécie sedentária e que vive em colónias. Em condições normais, não se afasta mais de 300 a 500 m das tocas onde vive. No entanto, os machos jovens poderão dispersar-se, quer no princípio, quer no final da época de reprodução, para procurarem ou fundarem um novo núcleo populacional.

O *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* classifica o coelho-bravo como espécie "Em Perigo", devido aos episódios recorrentes de declínio a que a espécie tem sido sujeita, perdendo o estatuto de "Quase ameçado" que detinha desde 2005.

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

5. A Lebre-ibérica: características gerais da espécie

A lebre-ibérica (*Lepus granatens*is), única espécie de lebre existente em Portugal, é um herbívoro generalista, crepuscular e noturno. A lebre-ibérica é a mais pequena das 6 espécies de lebre existentes na Europa.

A lebre-ibérica é encontrada em habitats diversos, contudo não tão diversos como o coelho-bravo. Prefere zonas de planalto, alternadas com zonas de algum mato denso, sendo também encontrada em olivais, sementeiras de girassol, vinhas e diversos pomares de fruta. Caracteriza-se por apresentar grandes olhos com íris âmbar ou castanha, e orelhas muito longas, de extremidades escuras. O comprimento total e o peso médio nos adultos variam entre os 44,4 a 47,0 cm e os 2,06 a 3,30 kg, respetivamente, sendo as fêmeas em geral maiores e mais pesadas. A pelagem da lebre-ibérica é a mais diversa (Figura 2) e contrastante das 6 espécies de lebre existentes na Europa, com uma extensa zona branca ventral que se prolonga para os membros anteriores e posteriores, sendo o restante corpo coberto por pelagem ocrácea, com tons de cinzento, preto e bege. A cauda é também preta na sua face dorsal, e branca na face ventral. Os membros posteriores são mais longos que os anteriores, habilitando-a para corridas de longa duração, saltos e ziguezagues em velocidade que pode atingir os 70 km/h. À semelhança do que acontece com o coelho-bravo, não apresenta dimorfismo sexual, embora os olhares experientes consigam diferenciar o sexo com alguma certeza em ambas as espécies por algumas características morfológicas.

A lebre-ibérica, pertence à família Leporidae da ordem Lagomorpha. Na Península Ibérica, para além da lebre ibérica existem mais duas espécies de lebre: a lebre-de-piornal (*Lepus castroviejoi*) e a lebre-europeia (*Lepus europaeus*). A lebre-de-piornal está presente apenas na parte norte da Península Ibérica (Cordilheira Cantábrica), enquanto a lebre europeia encontra-se na parte noroeste da Península Ibérica (ao longo dos Pirenéus). No entanto, a lebre-ibérica é a espécie mais amplamente distribuída na Península Ibérica (Figura 4). Em Portugal é mais comum a sul do Tejo.



Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Figura 4. Distribuição geográfica das três espécies de lebre presentes na Península Ibérica: lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), lebre-de-piornal (*Lepus castroviejoi*) e lebre-europeia (*Lepus europaeus*).

A lebre-ibérica reproduz-se durante todo o ano em Portugal, embora a proporção de machos e fêmeas reprodutivamente inativos seja maior no outono.

O menor tamanho médio das ninhadas de lebre-ibérica em Portugal (média de 1,6 crias por ninhada), comparativamente com o coelho-bravo (média de 4 crias/ninhada) é compensado por uma extensa época reprodutiva. Cada fêmea produz, em média, 9,8 crias por ano, valor muito semelhante ao observado noutras espécies do género *Lepus*. A duração da gestação é de 41 a 42 dias. Ao contrário do coelho-bravo, as crias das lebres nascem com os olhos abertos e cobertas de pelo, ficando independentes no primeiro mês de vida.



Figura 5. Exemplar de lebre-ibérica

A lebre-ibérica faz depressões no solo (conhecidas por camas), para descanso e proteção dos juvenis. As camas são, normalmente, encontradas em áreas abrigadas, sob trincheiras e troncos.

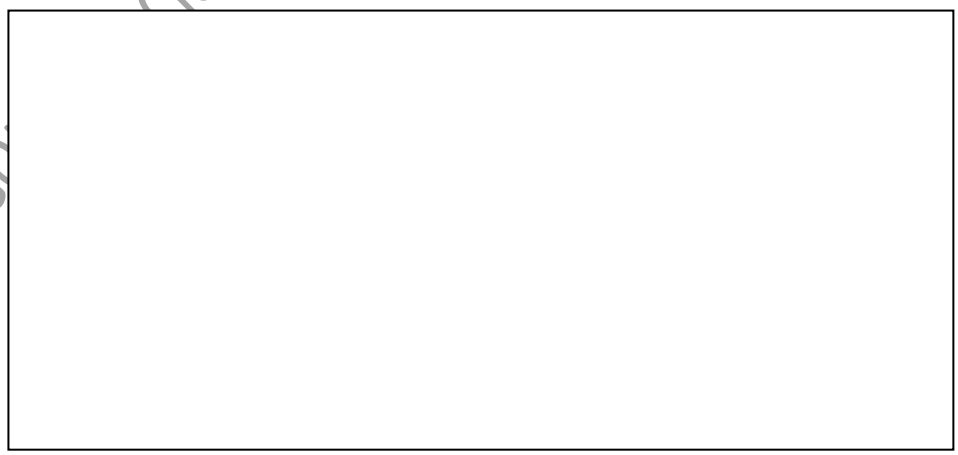


Figura 6. Lebre na cama, perfeitamente camuflada

Diversos fatores podem ameaçar a distribuição e abundância da lebre-ibérica, nomeadamente apressão de caça, predação natural, alterações de habitat e algumas doenças, como a tularémia e outras bacterioses, parasitoses e mais recentemente a mixomatose.

De acordo com a União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN), a população de lebre-ibérica é considerada estável, figurando na lista vermelha da IUCN na categoria de "menor preocupação".

6. Medidas gerais para mitigação do declínio do coelho-bravo e da lebre-ibérica

As mudanças profundas que se fizeram sentir nas últimas décadas no mosaico mediterrânico, levando à fragmentação do habitat pelo abandono das principais práticas agrícolas tradicionais e pela intensificação agrícola, com m crescimento notavel de monoculturas, conduziram a uma degradação cumulativa do habitat favorável à proliferação do coelho-bravo e da lebre-ibérica.

Documento de trabalho não finalizado

Algumas das medidas gerais de gestão que promovem a recuperação dos habitats favoráveis ao coelho-bravo e à lebre-ibérica incluem:

- **Reabilitação do mosaico mediterrânico, com manutenção de zonas de matos em áreas predominantemente agrícolas, de zonas de pastagens em áreas de predominância de matagal, incremento de ecótonos (efeito de orla) e prevenção dos incêndios florestais;**
- **Redução de áreas de monocultura (regadios e zonas florestais com espécies de crescimento rápido);**
- **Harmonização das práticas agro-silvo-pastoris com os interesses de recuperação das populações de coelho-bravo (e.g. zonas de exclusão de pastoreio, regulação de encabeçamentos de espécies pecuárias, calendarização de amanhos e granjeios, uso de agroquímicos, etc.);**
- **Criação ou melhoria de locais de refúgio para o coelho-bravo, através da construção de marouços artificiais (amontoados de troncos, pedras e terra, cobertos com vegetação), com dimensões aproximadas de 3 x 3 m.**
- **Promover a amontoação de pedras (de grandes dimensões) nas operações de despedrega durante a preparação dos terrenos para as culturas cerealíferas.**
- **Melhoramento da capacidade de sustentação dos habitats ao nível da disponibilidade de alimento natural, nomeadamente através de:**
- **instalação de culturas para a fauna, anuais (extremes ou consociações) ou plurianuais (e.g. pastagens permanentes), bem como reforço das faixas de leguminosas de primavera para disponibilização de alimento natural;**
- **Implementação, se necessário, de cercas eletrificadas para proteção de pastagens semeadas para o coelho-bravo e para a lebre-ibérica, evitando o seu consumo por outros herbívoros (ungulados selvagens e domésticos);**
- **Minimização do uso de fitossanitários e herbicidas, de modo a prevenir efeitos disruptores cumulativos e a garantir uma maior diversidade de plantas;**

- **Minimização da utilização de sementes tratadas com produtos tóxicos (sementes blindadas);**
- **Recolha adequada dos cereais, evitando colheitas prematuras e em período de reprodução do coelho-bravo e da lebre-ibérica;**
- **Controlo da velocidade da maquinaria da ceifa;**
- **Fertilização (sobretudo, biológica e fosfórica) de pastagem de leguminosas para aumentar a sua produtividade;**
- **Permitir e fomentar o acesso a fontes naturais de água corrente (p. ex. ribeiros).**
- **Aquando da indisponibilidade natural de água , assegurar uma fonte de água alternativa, de acordo com a abundância de animais e objetivos de gestão;**
- **Se verdadeiramente necessário, fornecimento de suplementação alimentar não acessível às espécies pecuárias ou de caça maior. O alimento suplementar deve ser fornecido de forma homogénea no espaço (p. ex., ao longo dos caminhos) para minimizar a agregação artificial dos animais, com consequências sanitárias negativas.**
- **Adequação da pressão cinegética à abundância e dinâmica populacional das espécies;**
- **Quando comprovadamente necessário, controlo da predação por métodos indiretos, isto é impedindo ou minimizando o acesso dos predadores aos exemplares de coelho-bravo e da lebre-ibérica, por exemplo, através da gestão do coberto vegetal e dos pontos de concentração de animais ou do acesso às áreas de reprodução, e diretos (apenas para predadores domésticos ou generalistas e que constam da lista das espécies cinegéticas – javali, raposa e sacarrabos) através de métodos seletivos, devidamente autorizados e adequadamente monitorizados.**

Confidencial, Documento de

Considerando que a dimensão e estrutura das populações locais de leporídeos depende de vários fatores, dos quais se destacam não só o habitat, mas também a predação natural, a pressão cinegética e o estado sanitário dos animais, e dada a complexidade dos fatores, são necessárias abordagens integradas que possibilitem a melhoria da sua condição geral para melhor enfrentarem surtos de doenças epidémicas, que continuam a constituir porventura as maiores ameaças aos leporideos.

6.1 Prevenção e controlo de doenças infecto-cotagiosas

6.1.1. Prevenção

De forma geral, a prevenção das doenças faz-se através de um conjunto de medidas profiláticas, assentes na implementação de medidas práticas que previnam a introdução de agentes infeciosos em áreas livres de doença, e a sua disseminação, ou alternativamente através da vacinação, quando existem vacinas disponíveis.

No caso das populações selvagens, a via de imunização é crítica no sucesso da vacinação, uma vez que a captura e manusamento de espécies selvagens são extremamente complicados. Nesses sentido, quando aplicáveias, as vacinas orais são mais eficazes tendo sido aplicadas para o controlo da Raiva em raposas e da Doença de Aujeszky em javalis.

Por esta razão, devem ser feitos todos os esforços para impedir a introdução de agentes patogénicos nas populações, evitando-se comportamentos de risco por parte dos agentes

locais (proprietários, gestores, caçadores, outros) e a introdução de animais de estatuto sanitário desconhecido.

Recomendações para evitar a introdução ou o alastramento da doença em áreas afetadas

- **Intensificar a prospeção no campo de cadáveres de leporídeos, e a recolha dos animais mortos ou moribundos para diminuição da transmissão;**
- **Alguns exemplares destes animais deverão ser mantidos refrigerados ou congelados e enviados para o INIAV para determinação da causa de morte; caso esteja em curso algum dos Projectos +Coelho, esta testagem será efetuada de forma gratuita para o rementente;**
- **No caso de serem visualizadas lesões características de doenças infeciosas em coelhos (mixomatose, doença hemorrágica, etc) ou em lebres (mixomatose, herpesvirose, etc), por favor contactar rapidamente o Laboratório de Virologia do INIAV, por telefone (+351) 214403500 ou através do endereço de e-mail: maiscoelho@iniav.pt, para se organizar a recolha destes animais;**
- **Desinfetar semanalmente os bebedouros com hipoclorito de sódio (0.5 %), se existentes, e enxaguar devidamente;**
- **Em caso de surto, enterromper a suplementação de alimento, por forma a desfavorecer a proximidade entre animais;**
- **Desinfetar a sola das botas, equipamentos robustos, rodas dos veículos, através de pedilúvios ou rodolúvios, com hipoclorito de sódio (0.5 %), antes da saída da zona de caça afetada, tendo em conta a possibilidade de transporte mecânico do vírus através de cães, pessoas, equipamento e veículos contaminados;**
- **Desinfetar as entradas das tocas com cal viva e controlar vetores (moscas, mosquitos, etc), uma vez que estes podem ser veículos de variadas doenças;**
- **As áreas reconhecidamente afetadas por doenças contagiosas devem ser as últimas a ser percorridas na zona de caça. Neste caso, todos os animais caçados deverão ser amostrados e as amostras biológicas respetivas, enviadas para o INIAV, através dos pontos de recolha;**
- **A evisceração dos animais em ato venatório deve ser realizada sobre um plástico, por forma a evitar pingos de sangue no chão;**
- **As vísceras de coelhos e lebres das áreas afetadas devem ser enterradas em vala revestida com cal viva, que também deve ser aplicada sobre as vísceras, antes de cobrir com camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v), alínea a), artigo 8º do Reg. CE n.º 1069/2009].**
- **Os subprodutos também podem ser encaminhados para empresa de tratamento.**

6.1.2 As doenças

As principais doenças que afetam os leporídeos são aqui revistas de forma simplificada. Para mais informação deve ser consultado o Manual de Boas Práticas Sanitárias editado pelo Grupo de Trabalho +Coelho em 2019.

A maioria dos estudos desenvolvidos sobre as doenças que afetam os leporídeos têm enfoque nas doenças epidémicas, como a mixomatose e a doença hemorrágica viral pelo seu impacto mais brutal e por isso visível. Contudo, outras doenças insidiosas e de evolução mais lenta, podem debilitar os animais de forma continuada, fragilizando-os do ponto de vista sanitário, tornando-os reprodutivamente menos aptos e mais susceptíveis à captura por predadores.

Pela sua natureza e envolvência, os animais selvagens estão expostos simultânea e muitas vezes continuamente a inúmeros agentes patogénicos, não sendo possível controlar-se a sua saúde de forma sistemática, como se faz para os animais de pecuária ou de companhia. Neste contexto, os rastreios sanitários revestem-se de particular relevância.

Mixomatose

A mixomatose é uma doença endémica em Portugal e em outros países da Europa, mas também na Austrália e na América do Sul, de acordo com as notificações de doença à OIE em 2019. É causada por um leporipoxvirus que emergiu na Europa nos anos 1950, afetando o coelho-bravo, em resultado de introdução intencional e ilegal para controlo das populações excessivas de coelho-bravo em França.

No coelho-europeu, a doença pode apresentar-se em duas formas, uma caracterizada por lesões nodulares cutâneas (forma nodular ou típica) e outra caracterizada por insuficiência respiratória (forma atípica).

A mixomatose foi considerada uma doença dos coelhos durante décadas por apenas se verificarem casos extremamente esporádicos em algumas espécies de lebre (nomeadamente na lebre-da-montanha e na lebre-europeia). No entanto, emergiu na lebre-ibérica de forma comprovada e preocupante no final do ano de 2018, primeiro em Espanha e depois em Portugal, sendo atualmente uma das grandes ameaças à estabilidade das populações selvagens.

Após a sua emergência, verificou-se uma redução das densidades populacionais de todo o território nacional que se estima ter sido superior a 75%, e que acentuou a diminuição gradual verificada das últimas décadas. De acordo com um inquérito recente a cerca de 700 caçadores e agentes do campo portugueses, em alguns locais, essa redução chegou a 75 a 100%, sendo por isso extremamente preocupante.

Figura

Doença Hemorrágica Viral

A Doença Hemorrágica Viral é também umadoença endémica que afeta o coelho em Portugal e em vários países de todo o mundo. É causada por um vírus pertencente à família Caliciviridae. Emergiu na Europa em 1986, disseminando-se rapidamente a partir de 1988, ano em que foi também identificada pela primeira vez em Portugal, nomeadamente na região Autónoma da Madeira. Nos anos seguintes, a doença progrediu para a Região Autónoma dos

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Açores e para o continente. Em 2010, um novo vírus (Vírus da Doença Hemorrágica Viral do tipo 2, RHDV2), foi detetada em 2010 em França, em 2011 em Espanha e em 2012 em Portugal, causando elevada morbilidade e mortalidade e afetando os coelhos de todas as faixas etárias, tanto domésticos como selvagens. Progressivamente as estirpes de RHDV2 substituíram as estirpes de RHDV anteriores.
O seu aparecimento levou igualmente a mortalidades superiores a 90% das populações de coelho-bravo. Atualmente, a DHV representa provavelmente a maior ameaça para as populações selvagens e coelho-bravo, pela menor capacidade de adaptação do hospedeiro a este vírus, vírus, comparativamente ao vírus da mixomatose.

Os sinais vulgarmente associados a esta doença são a mortalidade súbita de vários animais, a observação de movimentos espásticos dos membros e aparecimento de sangue nas narinas. A DHV não afetou, desde a sua emergência até à atualidade, a lebre-ibérica, embora este vírus tenha sido detetado esporadicamente em outras espécies de lebre nomeadamente na lebre-da-montanha (4), na lebre-europeia (5, 6) e na lebre-da-Córsega (7). Assim, face à forte possibilidade de a lebre-ibérica poder vir também a ser afetada, é importante incluir-se este agente nos programas de monitorização sanitária.
Figura

Herpesvirose por LeHV-5

Foi descrito recentemente um herpesvírus (LeHV-5) em exemplares de lebre-ibérica em Portugal (8), frequentemente associado a coinfecção com a mixomatose, embora esta associação possa ter resultado da amostragem dos animais durante um surto epidémico de mixomatose. No entanto, a presença de vírus com presença de lesões cutâneas (vesículas e vesículo-pústulas), subcutâneas (edema) e reprodutivas (inflamação e necrose dos órgãos genitais externos) só foi verificada em animais co-infetados com o vírus da mixomatose, provavelmente devido a imunossupressão. O LeHV-5 (Figura 3) foi caracterizado como um Rhadinovirus, sendo provável que se trate de um vírus de persistência insidiosa na espécie, com capacidade de latência em células do sistema imunitário, constituindo por isso uma ameaça contínua, sobretudo em situações de imunossupressão decorrentes de carências alimentares, de esforço metabólico acrescido (ex. época reprodutiva, lactação) ou de coinfecções com outros vírus, parasitas ou bactérias.
Figura

Cisticercose

A cisticercose é uma doença parasitária causada pela forma larvar da *Taenia pisiformis*, cujo parasita adulto ocorre no intestino dos carnívoros selvagens e domésticos, nomeadamente do cão doméstico. Os leporídeosinfetam-se ao ingerir os ovos presentes no solo e alimentos contaminados com as fezes de carnívoros.
Em geral, a cisticercose ocorre em formas pouco evidentes nos leporídeos, com presença na cavidade abdominal de algumas vesículas com conteúdo líquido transparente e uma estrutura branca em forma de bago de arroz, medindo poucos milímetros de diâmetro. Contudo, em alguns animais as cargas parasitárias são muito elevadas levando à destruição de órgãos como o fígado, e em último caso à morte (Figura X). De forma a reduzir os riscos de infeção dos cães, nunca deve ser permitido que os cães se alimentem de vísceras e carnes cruas dos animais

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

caçados ou encontrados mortos. Embora não representem um risco para o homem, desaconselha-se o consumo de animais parasitados. A desparasitação frequente dos cães de caça e de outros cães que partilham o habitat com leporídeos selvagens, como é o caso dos cães de pastoreio, contribui também para o controlo desta infeção parasitária/parasitose. A desparasitação deve ocorrer pelo menos 2 duas vezes por ano e idealmente ser acompanhada por exames fecais solicitados pelo Médico Veterinário.

Tularémia

A tularémia é uma doença zoonótica infeciosa rara, causada pela bactéria *Francisella tularensis*. É transmitida por contato direto com animais infetados, por ingestão de alimentos ou água contaminados, pela inalação de aerossóis ou por picada de artrópodes hematófagos infetados (carraças, mosquitos ou moscas).

No homem, a doença é potencialmente fatal assemelhando-se muitas vezes a um quadro gripal, caracterizado por febre, dor de cabeça, calafrios, dores musculares, aumento e dor dos gânglios linfáticos, que surgem após um período de incubação de 3 a 5 dias.

A tularémia foi também detetada em lagomorfos, roedores, carnívoros, pássaros, peixes e répteis. As lebres, os coelhos e os roedores são, no entanto, considerados os principais reservatórios da bactéria na natureza. Nestes, as manifestações clínicas são variáveis, podendo estar ausentes no início da infeção. Quando surgem, os sinais de doença incluem febre alta, letargia (prostração), falta de apetite (anorexia), perda de peso, taquipneia (aumento do ritmo respiratório), taquicardia (aumento dos batimentos cardíacos) e hipertensão. A prostração e a morte advêm de septicémia e coagulação intravascular disseminada que leva à falência dos órgãos.

As lesões macroscópicas observadas consistem habitualmente no aumento do tamanho do fígado (hepatomegália) e do baço (esplenomegália), na presença de granulomas nos pulmões, no pericárdio e nos rins ou, alternativamente, na presença de lesões congestivas e hemorrágicas em vários órgãos, podendo ainda ser observados sinais de pneumonia nos pulmões. Nos casos de evolução mais arrastada da doença (infeções subagudas e crónicas), as lesões podem lembrar as de tuberculose, com aparecimento de granulomas crónicos no fígado, baço, rim e pulmão. Certos grupos de atividade, nomeadamente caçadores, agricultores, médicos veterinários, taxidermistas e técnicos de laboratório que manipulam carne crua não controlada, têm maior risco de contrair a doença pelo contato com a bactéria ou com os seus hospedeiros e vetores.

Colibacilose

A colibacilose é uma doença causada pela bactéria ubiquitária *Escherichia coli*, cujas estirpes infetam todas as espécies animais. No coelho, causa habitualmente diarreias embora as estirpes enteropatogénicas, como os serotipos O103, O15:H, O109:H2, originem formas clínicas diferentes, de acordo com a idade do animal. Os coelhos jovens, com 1 a 2 semanas de idade, desenvolvem uma diarreia profusa amarelada que geralmente culmina com a morte. Em coelhos em desmame, verifica-se geralmente um quadro semelhante à enterotoxémia (uma doença causada por outra bactéria pertencente ao género Clostridium), com enchimento do intestino por conteúdo fluidificado com petéquias hemorrágicas na serosa, podendo também confundir-se com a doença de Tyzzer (também causada por uma bactéria do género Clostridium) (11).

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Brucelose

A Brucella spp. é também um agente bacteriano zoonótico, infetando uma grande gama de espécies domésticas e selvagens, incluindo espécies marinhas (12). Esta bactéria tem potencial de transmissão venérea, ocular e oro-nasal e transplacentária. Pode transmitir-se ao homem em áreas onde a doença é endémica, através do contacto com animais infetados ou por ingestão dos seus produtos, como o leite e derivados.

As espécies selvagens portadoras de *Brucella spp*. representam um grande risco de manutenção da doença. São o caso da lebre-europeia, da rena, do bisão e de algumas espécies de roedores (13). A lebre-ibérica mostrou suscetibilidade à infeção por *Brucella suis* biovars 1 e 2, representando para esta última biovar, um reservatório importante tal como o javali (14). Contudo, a biovar 1 é aquela que apresenta maior risco para o homem, por ser altamente patogénica e provocar doença severa, ao contrário da B.suis biovar 2, raramente patogénica para o homem (15), tendo contudo grande impacto nos suínos e gado doméstico.

Curiosamente, a infeção nesta espécie é muitas vezes latente ou caracterizada por inflamação e aparecimento de abcessos no aparelho reprodutivo, nos gânglios linfáticos, fígado, baço, rins, bexiga, articulações ou cérebro (16). A doença ocorre sobretudo em animais adultos, geralmente em formas crónicas, ocorrendo transmissão durante a reprodução. Pensa-se que esta patologia tenha pouco impacto na mortalidade das lebres (17).

Pasteurelose

A Pasteurelose compreende um conjunto de afeções do trato respiratório dos coelhos, causadas pela bactéria *Pasteurella multocida*, que surge geralmente em associação com outras bactérias (*Escherichia coli, Bordetella bronchiseptica, Haemophilus spp., Streptococcus* spp. ou *Staphylococcu*s spp.), ou que ocorre secundariamente à infeção por vírus. A *P. multocida* é frequentemente encontrada nos seios paranasais de coelhos saudáveis, pelo que os animais portadores constituem fontes de infeção.

Os sinais clínicos incluem dificuldade respiratória (dispneia), descargas nasais e espirros, torcicolo ou alterações decorrentes de infeções genitais. O quadro lesional pode incluir rinite aguda, otite média, conjuntivite, broncopneumonia com evolução para pneumonia lobar, pleurisia, pericardite, focos necróticos no ouvido, piómetra (infeção do útero), orquite (infeção dos testículos), aparecimento de abcessos subcutâneos ou em órgãos internos, septicémia e morte. No entanto, podem desenvolver-se quadros de septicémia aguda, com morte sem registo de quaisquer outros sinais clínicos.

Leptospirose

Tem como agente etiológico, a *Leptospira* spp., uma bactéria endémica com potencial zoonótico, detetada em várias espécies animais, domésticas e selvagens, sendo a urina a fonte principal de disseminação. De acordo com o nosso conhecimento, esta bactéria nunca foi reportada nos leporídeos da Península Ibérica. No entanto, a dispersão deste agente por diversas espécies selvagens, nomeadamente roedores que vivem em simpatria com a lebre-ibérica e o coelho-bravo, tornam, contudo, plausível que ocorra infeção dos leporídeos. Um estudo realizado em França a 28 espécies com potencial reservatório de *Leptospira* patogénica para o homem, encontrou uma prevalência desta bactéria no coelho-europeu de 0,3 e 1,4%,

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

mais baixa do que a verificada no ouriço-cacheiro (37,5%) e em mustelídeos como a marta e a doninha (15 a 20%).

Leishmaniose

O agente etiológico desta doença é um protozoário do género *Leishmania* (Família Trypanosomatidae), também zoonótico. A doença é habitualmente conhecida pela doença que causa no cão doméstico, sendo endémica em Espanha e Portugal, e bastante frequente no Algarve, Lisboa e Setúbal.

Existem cerca de 53 espécies de Leishmania, das quais cerca de 20 são patogénicas para o Homem. No nosso país, a transmissão ocorre principalmente pela picada de pequenos insetos fêmeas do género Phlebotomus (também conhecidos por mosca-da-areia) (11).

A infeção por este parasita intracelular foi já documentada em várias espécies selvagens, incluindo carnívoros, primatas, marsupiais, morcegos, roedores e lagomorfos.

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) é também apontada como um importante reservatório de *L. infantum*, tendo sido comprovada a capacidade de transmissão do parasita de lebres infetadas, mas aparentemente saudáveis, para o *Phlebotomus perniciosus* (19). O coelho-bravo pode representar um importante reservatório, tendo sido relatada uma prevalência de L. infantum através de técnicas de serologia e de biologia molecular de 82.6% em populações selvagens da comunidade de Madrid (21).

Coccidiose

Trata-se de uma parasitose altamente contagiosa em coelhos por via fecal-oral, causada por várias espécies de parasitas protozoários do género Eimeria e pode apresentar-se na forma intestinal ou na forma hepática. Esta parasitose não tem impacto na saúde pública, mas pode provocar elevada mortalidade em coelhos. Tanto os coelhos como as lebres saudáveis podem ser portadores assintomáticos de Eimeria. Os oocistos (forma de transmissão) de *Eimeria spp*., eliminados pelas fezes, contaminam o ambiente. Ao serem ingeridos os oocistos esporulados, presentes na vegetação, os animais infestam-se, perpetuando o ciclo de vida destes parasitas.

A forma intestinal de coccidiose afeta principalmente os animais jovens (6 semanas a 5 meses), sendo sobretudo observada em coelhos jovens recém-desmamados, embora também seja encontrada em idades mais avançadas. Os adultos podem desenvolver infeções subclínicas que passam geralmente despercebidas, mas muitos ficam portadores assintomáticos e continuam a contaminar o ambiente.

A coccidiose hepática afeta coelhos de todas as idades e leva a apatia, polidipsia e distensão abdominal. Na coccidiose hepática, se a morte não ocorrer em poucos dias, a doença pode evoluir para a forma crónica. A mortalidade é baixa nos adultos.

Cenurose

É causada por um parasita da classe dos céstodes, e é uma doença rara. No homem causa uma doença grave denominada Cenurose. O parasita adulto (ténia) vive o intestino delgado do hospedeiro definitivo, carnívoros domésticos e silvestres, e a forma larvar desenvolve-se no tecido conjuntivo subcutâneo e intramuscular, no caso da forma larvar *Coenurus serialis* da *T.serialis* (23) ou no cérebro no caso do *Coenurus cerebralis*, forma larvar da *T.multiceps*. Estas formas larvares parasitam o hospedeiro intermediário (coelhos, lebres, roedores, cavalos, pequenos ruminantes e até primatas).

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

Sarnas

As sarnas são causadas por ectoparasitas denominados ácaros da sarna. Os mais frequentes nos leporídeos, são o *Psoroptes cuniculi* e o *Chorioptes cuniculi*. Ocorrem principalmente no canal auditivo levando muitas vezes a otites, ou em casos mais graves, alterações de equilíbrio, torcicolo ou morte. Observam-se estas situações patológicas, pela constatação de inflamação e secreção espessa ou serosa amarelada no ouvido. Trata-se de uma doença muito contagiosa entre animais, não apresentando risco para o homem. É contudo de notar, que outras sarnas menos frequentes, causadas pelo ácaro *Sarcoptes scabiei* são zoonóticas, e portanto apresentam risco para o Homem.

Encefalitozoonose

A encefalitozoonose é causada pelo fungo intracelular, o *Encephalitozoon cuniculi*, que é eliminado pela urina e transmitido entre animais atraves ingestão dos esporos que permanecem viáveis na vegetação, solo e água. A infeção geralmente ocorre na forma sub-clinica (latente), não se observando sinais clínicos. No entanto, em infeções severas, podem verificar-se sinais neurológicos (torcicolo, convulsões, tremores, paresia posterior) e edema. Nos casos graves, os rins estão aumentados de volume (hipertrofiados). As lesões macroscópicas são mais frequentes nas formas crónicas e incluem áreas multifocais, pontiagudas e brancas na superfície dos rins.

Parasitismo intestinal por Nemátodes e Céstodes

Existem muitas espécies de parasitas dos leporídeos, sendo a sua diversidade e frequência muito variável entre regiões geográficas. Apesar de muitos leporídeos se encontrarem parasitados, existe um equilíbrio entre o hospedeiro e as populações destes parasitas. No entanto, podem ocorrer desequilíbrios se as cargas parasitárias aumentarem substancialmente, causando então doença.

Estas situações podem ser despoletadas por carências nutricionais ou por infeção concomitante com outros agentes patogénicos. As elevadas densidades populacionais facilitam a perpetuação dos ciclos de infeção, dado o maior contacto entre os animais facilitador da transmissão. Os lagomorfos podem ser hospedeiros definitivos (das formas adultas dos parasitas) ou intermediários (das formas larvares) de outras espécies de parasitas com potencial impacto na condição corporal dos animais.

Fungos

O fungo do género Trichophyton mentagrophytes é o mais frequente nos coelhos, embora outros como o Microsporum canis também o possam afetar. Este tipo de micoses ou dermatofitoses, leva ao aparecimento de lesões circulares, crostosas, eritematosas e com alopécia (perda de pêlo), e são geralmente pruriginosas. Aparecem primordialmente em zonas mais sujeitas a grooming (limpeza pelo próprio animal usando a boca) como as patas e a própria zona do focinho.

Não são doenças frequentes e aparecem normalmente associadas a fatores de *stress* como doenças concomitantes, nutrição deficitária ou manipulação excessiva pelo homem. Estas micoses são em alguns casos transmissíveis ao Homem, mas tal como nos animais, constituem maior risco em pessoas imunodeprimidas.

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

6.2. Gestão de habitat: medidas de disponibilização de abrigo

O coelho-bravo seleciona o seu habitat com base, sobretudo, na disponibilidade de alimento e refúgio. A distribuição de coelho-bravo em diferentes paisagens é influenciada pela topografia, altitude, dureza do solo, condições climatéricas e estrutura de habitat, bem como pelas práticas agrícolas.

Os habitats em mosaico mediterrânico são considerados mais favoráveis ao coelho-bravo, alternando entrezonas de mato denso e vegetação herbácea, que proporcionam recursos alimentares adequados, refúgio e proteção contra predadores.



Figura x. Coberto arbustivo favorável à proteção de coelho-bravo dos predadores terrestres e aéreos.

A existência de territórios em mosaico, compostos por cerca de 40% de cobertura vegetal arbustiva ou arbórea, 40% por pastagens e cerca de 20% por orlas entre pastagens e matagal, potenciam a ocorrência natural de coelho-bravo.

A conectividade da paisagem e o mosaico típico dos sistemas agro-silvo-pastoris mediterrânicos, em que alternam pastagens perenes (pousios), sistemas agrícolas com culturas de cereal de sequeiro (trigo, aveia, centeio), restolhos, campos de leguminosas, manchas florestais e matos, favorecem coletivamente a dinâmica populacional da espécie.

As condições ideais que o habitat de coelho-bravo deve reunir, são:

- **altitude média-baixa;**
- **solos relativamente brandos, profundos e não inundáveis;**
- **relevos suaves (terrenos planos ou levemente ondulados);**
- **coberto arbustivo com altura e porte suficientes para oferecer proteção, ocupando entre 25% a 50% dos solos nas áreas de vegetação natural não destinadas à alimentação;**
- **coberturas inferiores compatíveis com elevadas densidades de coelho-bravo, sempre que exista abundância de tocas;**
- **disponibilidade de alimento.**

Confidencial. Documento de trabalho não finalizado

Embora o **coelho-bravo** prefira um clima quente e seco, a ocorrência de pontos de água e as margens dos rios são um habitat particularmente preferido, sobretudo em zonas agrícolas, onde habitualmente retêm alguma vegetação natural que proporciona refúgio.

A inadequação do solo para a construção de tocas pelo coelho-bravo e a escassez de refúgios naturais expõe os animais à predação, pelo que o incremento do número de refúgios, por exemplo com a instalação de marouços, pode revelar-se essencial para fomentar ou recuperar a espécie.



Figura x. Tocas de coelho-bravo em terrenos arenosos

Em algumas áreas onde o refúgio é limitante, pode recorrer-se à construção de tocas artificiais - **morouços**, estruturas destinadas a proporcionar abrigo e cuja finalidade é favorecer, a médio e longo prazo, a construção de tocas pelos próprios coelhos. Os morouços podem ser construídos nas margens dos campos de cultivo, amontoando árvores velhas e ocas de tamanho adequado, terra e vegetação, ramas, cepos, raízes, pedras (de tamanho suficiente para permitir que os coelhos penetrem nos buracos) ou, excecionalmente, construídas com estruturas artificiais mais complexas.

Documento de trabalho

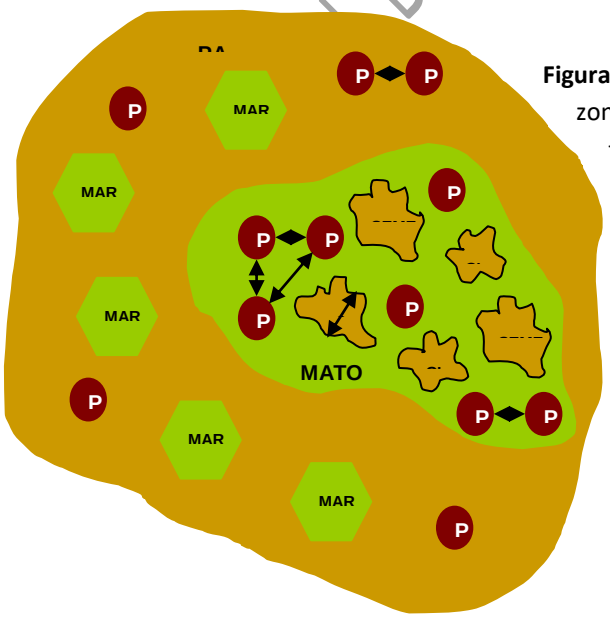


Figura x. Esquema ilustrativo de uma área constituída por zonas abertas (pasto) e por zonas fechadas (mato) e dos tipos de gestão de habitat mais adequados para restabelecer a ligação entre os diferentes núcleos populacionais de coelho-bravo (P) existentes no local. Adaptado de Ferreira e Alves (2006).

Recomendações para a construção de morouços

Na construção dos morouços devem ser evitados materiais que dificultem a escavação pelos coelhos (placas de cimento, redes metálicas, chapas metálicas), que favoreçam a acumulação de humidade em excesso ou que facilmente entrem em decomposição e fermentem (fardos de palha).

Conteúdo de trabalho não finalizado

Figura x. Maquete de construção de abrigos



Figura x. Esquema de abrigo artificial – marouço (adaptado de ONCFS)



Figura x. Aspecto de morouços construídos para coelho-bravo com troncos e pedras.

A localização do morouço é importante para garantir a sua finalidade, devendo os locais de implementação reunir as seguintes condições:

- **Estar próximo ou localizado em zonas de vegetação natural e próximo das zonas de alimentação (distancia inferior a 10-20 metros);**
- **Estar sobre solos facilmente escaváveis ou, se os solos não reunirem essa condição, antes de construir o morouço, remover a terra com uma escavadora ou trazer terra de outras zonas;**
- **Em searas onde se pratique rotação, o morouço deve localizar-se nos limites das parcelas, de tal forma que não esteja a mais de 50 metros de cada uma, o que assegura maior êxito reprodutivo anual;**
- **O local escolhido não deve ser suscetível de inundação e deve ter solo drenável.**

Confidencial. Documento não finalizado

Os habitats favoráveis à lebre-ibérica são constituídos por espaços abertos, mas com algum coberto arbustivo e presença de pedras que, juntamente com a capacidade de camuflagem da espécie, fornecem proteção contra predadores. A diversidade paisagística e a presença de elementos naturais na paisagem são importantes para a lebre-ibérica, que prefere campos de cultivo, de preferência variados, alternados com prados e bosques.

A seleção do habitat pela lebre-ibérica depende e varia, contudo, com a época do ano. São comumente encontradas em regiões agrícolas, onde se alimentam de cereais, e em áreas florestais, onde se alimentam de brotos e cascas, especialmente no inverno. Nesta época fria, a lebre-ibérica prefere, porém, as áreas cerealíferas, enquanto na Primavera procuram pastagens que apresentem vegetação espontânea. Nas áreas agrícolas, a lebre-ibérica responde às alterações cíclicas decorrentes da produção agrícola, deslocando-se de zonas menos favoráveis para as mais favoráveis.

As áreas vitais ocupadas pelas lebres são variáveis (10 a 300 ha/indivíduo), podendo existir alguma sobreposição de domínios vitais de diferentes indivíduos em zonas de alimentação abundante.

As condições ideais básicas que o habitat de lebre-ibérica deve reunir são:

- **Espaços abertos com cobertos arbustivos e presença de pedras que facilitem a sua camuflagem;**
- **Campos de cultivo, de preferência variados, alternados com prados e bosques;**
- **Proximidade com culturas que proporcionam fonte de proteína (ex: leguminosas);**

Para ambas as espécies, devem também ser criadas áreas de refúgio (santuários) dentro das propriedades e zonas de caça, para permitir manter um núcleo reprodutor. Estas áreas de refúgio e de reprodução devem estar corretamente identificadas, prevenindo perturbação causada pelos caçadores por desconhecimento dos seus limites. Durante as jornadas de caça deve evitar-se a sua travessia, nomeadamente por cães de caça.

As densidades de lebre-ibérica são geralmente inferiores às de coelho-bravo. No entanto, a sua distribuição é mais uniforme, uma vez que a do coelho-bravo, que forma colónias, pode atingir densidades muito elevadas a nível local.

A construção de **cercados de reprodução** de coelho-bravo, com indivíduos autóctones destinados a formar um núcleo de reprodução, pode ser importante para a realização de repovoamentos dentro da própria zona de caça.

e trabalho não finalizado



Figura x. Centro de reprodução de coelho-bravo, onde se pode identificar a zona de reprodução (com marouco) e zona de alimentação (pastagem).

6.3 Gestão de habitat: medidas de disponibilização de alimento

Em grande parte do território nacional, a gestão cinegética está vocacionada para a caça menor. Durante períodos de escassez de recursos alimentares, como no verão, ou durante a seca, os pontos de alimentação suplementar e de água disponibilizados nos terrenos cinegéticos, podem ser especialmente importantes para a sobrevivência das espécies silvestres, incluindo o coelho-bravo e a lebre-ibérica. As soluções naturais de água e de alimentação são preferíveis a soluções artificiais. No entanto a suplementação no terreno, de uma forma estratégica nas épocas de reprodução e de escassez pode contribuir para a recuperação e fomento das populações. Estas medidas são ainda mais importantes no atual contexto de alterações climáticas, podendo mitigando os efeitos da seca.

O coelho-bravo é pouco exigente na alimentação que necessita para sobreviver, no entanto, a qualidade desta, sobretudo ao nível do conteúdo proteico, é essencial para garantir a reprodução. A quantidade de proteína na dieta determina em larga medida o sucesso reprodutor e o número de ninhadas produzidas.

A lebre-ibérica é mais seletiva nos seus hábitos alimentares. Por possuírem áreas vitais grandes, podem efetuar deslocações maiores, usufruindo de zonas de características diferentes para complementar a sua dieta. As gramíneas constituem a base da sua alimentação.

As leguminosas, pelo seu elevado conteúdo proteíco, são o alimento chave durante a época reprodutora para ambas as espécies:

- **A existência de parcelas semeadas próximas das zonas de refúgio aumenta consideravelmente a capacidade de suporte do habitat;**
- **Os cereais, especialmente aveia, trigo e cevada, são um alimento complementar importante, durante o período reprodutor (Inverno-Primavera);**
- **São aconselháveis parcelas com cerca de 50 metros de largura, de forma sinuosa, ao longo das orlas das zonas de refúgio, de forma a potenciar a área de aproveitamento pelo coelho;**
- **A influência destas parcelas é de cerca de 100 metros à volta das mesmas, pelo que a sua distribuição espacial deve ter em conta este efeito;**
- **É importante que disponham de vegetação em crescimento todos os anos, pelo que devem ser privilegiados as pastagens plurianuais de leguminosas;**
- **O fornecimento complementar artificial de alimento pode contribuir para a recuperação do coelho-bravo e da lebre-ibérica, no entanto é uma opção secundária à instalação de pastagens naturais;**
- **Se necessário, instalar uma rede de locais adequados (de alimentadores/comedouros) para disponibilização de um alimento complementar adaptado ao coelho-bravo selvagem, para, aumentar a produtividade e diminuir a mortalidade em períodos de maior escassez;**
- **Disponibilizar o suplemento alimentar através da utilização de comedouros simples e funcionais desenvolvidos para o efeito, que limitem o acesso por parte das outras espécies, nomeadamente ruminantes domésticos e silvestres, e que protejam o alimento de condições climatéricas adversas, como a chuva, humidade e sol;**

Documento de trabalho não finalizado

- **Garantir a higiene dos alimentadores e comedouros artificiais para minimizar os efeitos sanitários negativos da agregação dos animais;**
- **A administração de alimento sob a forma granulada é adequada à suplementação em contexto de vida livre.**



Figura x. Vários tipos de comedouros utilizados para reforçar a alimentação de coelho-bravo.

No âmbito do projeto +Coelho, foi produzido um **alimento composto não medicamentoso especificamente formulado para as populações selvagens de coelho-bravo**, incorporando aromatizantes específicos que o tornam altamente apetecível para a espécie, mesmo em condições de abundância de outros alimentos; A sua composição foi harmonizada entre os fabricantes de alimentos compostos aderentes ao projeto, por forma a **satisfazer as necessidades do coelho-bravo em termos de aporte calórico, fibra, e oligoelementos (vitaminas e minerais)**;

Ainda no âmbito do Projeto +Coelho, foram concebidos e desenvolvidos comedouros para disponibilização de ração no campo.

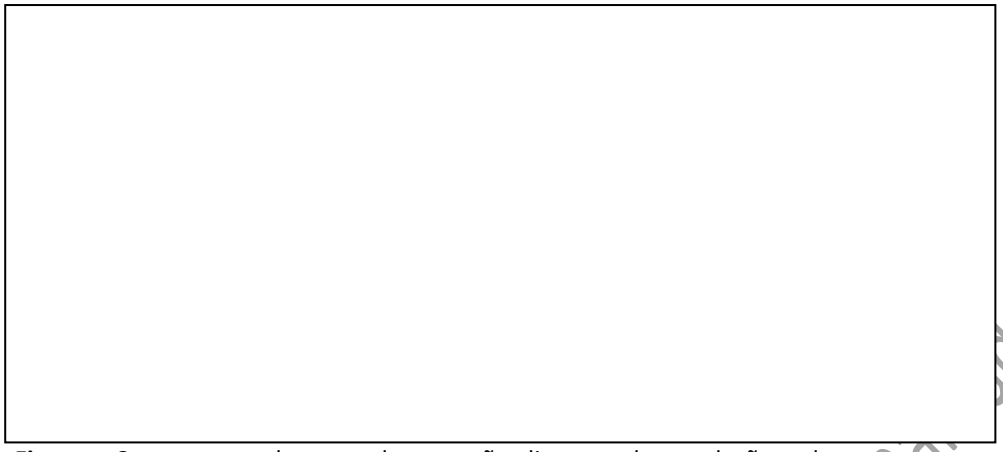


Figura x. Campo semeado ara suplementação alimentar de populações selvagens

6.4 Gestão de habitat: medidas de disponibilização de água

Durante a maior parte do ano, a água presente no alimento natural é suficiente para assegurar as necessidades dos coelhos-bravos. No entanto, a escassez de água pode ser um fator limitante no verão, particularmente para os juvenis das ninhadas mais tardias.

Recomendações para o abeberamento artificial

- **Os pontos de água naturais são preferíveis aos artificiais e só quando a rede de pontos de abeberamento naturais for insuficiente ou inexistente é que se deverá recorrer à suplementação com bebedouros artificiais;**
- **O acesso a charcas, pegos e pequenas barragens deverá manter-se livre, sem o acesso vedado;**
- **A rede de pontos de abeberamento deve ser concebida tendo em conta as distâncias percorridas pelo coelho-bravo (pelo menos um em cada 100 ha, contabilizando todos os locais disponíveis), em particular nos períodos secos;**
- **Para que os locais de abeberamento mantenham água em boas condições ao longo de todo o verão, é importante evitar o acesso de espécies pecuárias para abeberamento direto;**
- **Os pontos de abeberamento devem ser distribuídos homogeneamente pela área da reserva/ zona de caça, para evitar uma grande concentração de bebedouros num local e ausência em outras áreas.**
- **Quando for estritamente necessária a instalação de bebedouros artificiais, é essencial garantir a sua higiene através de limpezas periódicas.**

documento de trabalho não finalizado



Figura x. Disponibilidade de água natural

Figura 18. Bebedouro artificial

6.5 Gestão de habitat: medidas de controlo de predação

A predação é um processo natural necessário na regulação e seleção natural das populações de quaisquer espécies, não sendo exceção o coelho-bravo nem a lebre-ibérica. Os predadores têm um papel sanitário muito importante ao eliminar rapidamente os espécimes velhos e doentes, e promovendo a sobrevivência dos exemplares mais aptos.

No entanto, em situações excecionais, a desproporcionalidade nas abundâncias relativas entre algumas espécies de predadores oportunistas e as espécies-presa (como o coelho-bravo e a lebre-ibérica), pode originar um processo denominado de "poço de predação", através do qual a população de presas pode manter-se suprimida devido ao excesso de predação. Estas situações são pontuais e são causadas por espécies de predadores generalistas e oportunistas (ex: raposas ou sacarrabos), sem capacidade de auto-regulação. Quando inequivocamente identificadas, estas situações podem justificar a implementação de ações pontuais de controlo de predação no sentido de permitir ao coelho-bravo ultrapassar o limiar de auto-sustentabilidade populacional.Javalis, raposas e sacarrabos são os predadores generalistas que podem ser sujeitos a ações de correção de densidades.

Confiden não finalizado



Figura 19. Raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) são espécies predadoras de coelho-bravo e de lebre-ibérica.

No âmbito da gestão das populações em zonas de caça pode ser necessário:

a) Motivar a promoção de programas relacionados com o controlo de cães e gatos assilvestrados, em articulação com as entidades competentes (câmaras municipais);
b) Corrigiras densidades de alguns predadores generalistas, tais como a raposa e o sacarrabos, somente e quando as suas populações se identificam inequivocamente como sobre-abundantes;
c) Favorecer o equilíbrio entre os diversos predadores presentes na comunidade local.

Os métodos utilizados no controle direto da predação são os autorizados pela legislação em vigor:

- **A raposa e o sacarrabos são predadores generalistas cuja correção de densidade é permitido pela a legislação em vigor (Decreto-Lei n.º 202/2004, artigo 94º)**
- **A correção de densidades de javalis está prevista na Portaria n.º 105/2018 de 18 de abril;**
- **A pega-rabuda (*Pica pica*) é um predador de caça menor, cujo controlo está previsto na Portaria n.º 105/2018 de 18 de abril;**

A desvantagem do método direto resulta dos seus efeitos perdurarem apenas enquanto se mantiver o controlo dos predadores, obrigando a um esforço anual constante, com a única finalidade de reduzir a mortalidade por predação.

O uso de venenos para controlo de predadores e de cães e gatos assilvestrados é ilegal. Esta prática é uma das principais causas de mortalidade não natural, afetando também muitas espécies silvestres ameaçadas, nomeadamente aves necrófagas. Para além das espécies silvestres, esta prática ilegal afeta animais domésticos, incluindo os cães de caça, e pode atingir o Homem. O uso de venenos constitui ainda um grave problema de saúde pública, pela permanência no meio ambiente de substâncias tóxicas, nomeadamente na água e nos solos, com efeitos a jusante. As organizações do setor da caça devem ter um papel chave na sensibilização dos caçadores, das entidades gestoras e dos agricultores contra o uso ilegal de veneno e na recomendação de soluções alternativas de controlo de predação e de animais assilvestrados.

O **controle indireto da predação** pode obter-se através de ações no habitat:

- A estrutura do habitat constitui um dos principais fatores que condicionam o impacto da predação, já que em habitats favoráveis os próprios coelhos e lebres têm mais possibilidades de evitar os predadores.

Confidencial. Documento de trabalho não finalizado

Alguns exemplos de medidas eficazes para reduzir a predação, incluem:

- **O incremento da cobertura vegetal natural, de forma irregular e dimensão generosa, para minimizar a deteção dos coelhos-bravos e de lebres-ibéricas pelos predadores; No caso da lebre-ibérica, a camuflagem proporciona-lhe grande capacidade de se evadir à predação;**
- **A melhoria da qualidade do habitat do coelho-bravo e da lebre-ibérica, nomeadamente pela construção de refúgios artificiais;**
- **A diminuição da distância entre as zonas de refúgio e de alimentação, para evitar que os coelhos percorram grandes distâncias de forma mais exposta quando em busca de alimento;**
- **Adequação da distribuição de alimento e de água, de modo a evitar elevadas concentrações de animais;**
- **Proporcionar zonas propícias ao refúgio e reprodução, com sistemas que garantam a exclusão de predadores;**
- **Eliminação de ações que favorecem a sobrevivência dos predadores, tais como abandono de subprodutos de caça e manutenção de focos de alimentação artificial utilizados por gatos e cães assilvestrados;**

Estas medidas são mais vantajosas por comparação com o controlo direto dos predadores, por serem mais duradouras e socialmente aceitáveis, empregando-se o mesmo esforço. Consegue-se ainda reduzir o impacto da predação melhorando o habitat ideal para a reprodução dos leporídeos.

Confidencial, Documento de traba

6.6 Adequação Da Pressão Cinegética

O período venatório do coelho-bravo e da lebre-ibérica em Portugal está definido no Decreto-Lei nº 201/2005, e pode decorrer entre de 1 de setembro a 31 de dezembro e de 1 de setembro a final de fevereiro, respetivamente.

A atividade cinegética pode desempenhar um papel crucial na conservação do coelho-bravo e da lebre-ibérica, através da implementação de medidas de gestão de habitat, regulação da pressão cinegética e disponibilização de alimento e água. A exploração cinegética sustentável, ajustada à dinâmica e tamanho das populações, não só é determinante no ordenamento do território e na fixação das populações ao mundo rural, como o seu exercício em sistemas de silvo-pastorícia contribui, determinantemente, para a prevenção de incêndios e a manutenção de habitats favoráveis a várias outras espécies silvestres, fomentando a conservação da biodiversidade local.



Figura 1. Agro-silvo-pastorícia numa zona de caça turística, permitindo em simultâneo a exploração em regime semi-extensivo de ovinos, e a exploração cinegética do coelho-bravo.

A atividade cinegética é, assim, considerada uma peça-chave na manutenção e recuperação de habitats e uma ferramenta de gestão da fauna silvestre que, respeitando as necessidades ecológicas das espécies e os seus equilíbrios biológicos, potencia a sua conservação em articulação com o desenvolvimento socioeconómico do meio rural. Nesse sentido, as organizações do setor da caça, os clubes de caçadores, os proprietários rurais e as entidades gestoras das zonas de caça devem promover o importante papel dos caçadores na conservação da natureza e no bem-estar geral da sociedade.



Figura x. Caçador em ato venatório dirigido a espécies de caça menor.

Todas as entidades relacionadas com a atividade cinegética, de cariz particular, coletivo ou associativo, devem exercer, e exigir que seja exercido de forma responsável e ética, o ato

cinegético e as suas atividades conexas. Devem, ainda, divulgar de forma clara e eficaz os efeitos positivos que resultam das suas ações, de forma a contribuir para um conhecimento social mais amplo e realista dos valores históricos, culturais, sociais, económicos e ecológicos da atividade e gestão cinegética.

Os comportamentos ecológicos inadequados e ilegais, as práticas agrícolas e cinegéticas prejudiciais à qualidade dos habitats e à manutenção das populações silvestres, devem ser repudiados,denunciados, diferenciando-os da atividade cinegética regulada.

O conhecimento e integral cumprimento do período venatório das espécies cinegéticas são essenciais para a promoção de tendências demográficas positivas das populações naturais, uma vez que este período é estabelecido em função dos ritmos biológicos das espécies e tem em conta aspetos essenciais, nomeadamente a sua reprodução. O número previsto de jornadas de caça e os limites diários de abate devem ser rigorosamente definidos, respeitados e adequadamente divulgados. Toda esta regulamentação deve acompanhar o mais recente conhecimento científico e ecológico de forma a acompanhar a evolução da realidade.

O esforço de caça deve, contudo, estar relacionado com a abundância de coelho-bravo e da lebre-ibérica em cada zona de caça e deverá ser sempre inferior à taxa de crescimento das populações locais.

Para tal, é necessário definir com rigor:

- Os quantitativos anuais de abate;
- O número de jornadas de caça por período venatório;
- O número de caçadores por dia;
- O número máximo de exemplares caçados por dia e por caçador;
- Eventuais áreas de proteção.

Para estabelecer um esforço de caça ajustado, é aconselhável conhecer algumas das principais características demográficas das populações, tais como:

- Distribuição - localização dos animais;
- Densidade - n.º de animais por hectare;
- Produtividade - n.º de juvenis que, por ano, são recrutados para a população;
- Estrutura da população - grupos de classes de idade (juvenis e adultos) e de sexo (machos e fêmeas).

A definição das medidas a tomar para assegurar a viabilidade e exploração sustentável das populações de coelho-bravo e da lebre-ibérica (ex: o número de efetivos a extrair durante o período venatório ou o controlo da predação) deve basear-se em decisões sustentadas com informação precisas tanto possível sobre o estado e dinâmica das populações. Por outro lado, a tomada de decisões sustentadas implicam um conhecimento sobre esses parâmetros, que pode ser adquirida através da monitorização regular e contínua das populaçõess de coelho-bravo e da lebre-ibérica na zona de caça.

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

6.7 Repovoamentos De Coelho-Bravo e De Lebre-Ibérica

Os **repovoamentos de coelho-bravo e de lebre-ibérica,** apenas devem ser utilizados como último recurso, quando de facto as populações locais são muito exíguas, e após criadas as condições apropriadas de habitat, refúgio e alimentação. Devem ser sempre asseguradas a certificação genética e sanitária dos animais translocados.

Os repovoamentos com animais de outras proveniências serão sempre de evitar, uma vez que estes poderão não estar adaptados ao clima e habitat disponível, bem como pode introduzir agentes patogénicos na população local. Deverá sempre ser considerada a utilização de animais de zonas vizinhas, sempre que nesta se verifiquem condições propícias, e estimular o crescimento da sua população, de acordo com a legislação em vigor.

Os repovoamentos com lebre-ibérica só podem ser efetuados a partir de centros de criação de Espanha que certifiquem a condição sanitária e genética dos animais, já que não existem atualmente em Portugal centros de reprodução de lebre-ibérica. Assim, a entrada no país destes exemplares deve ser acompanhada de uma guia de transporte, emitida pelos serviços de controlo na fronteira. Dentro de Portugal, são permitidas translocações para caça a corrição (confirmar).

Quando tiver que recorrer a repovoamentos de coelho-bravo, tenha sempre em atenção o seguinte:

1. Relativamente ao local onde os animais são largados:
• **Criar áreas de refúgio** • **Garantir a existência de tocas naturais ou artificiais** • **Disponibilizar alimento e água** • **Reduzir a predação e pressão de caça**
2. Relativamente aos animais que são introduzidos:
• **Serem obrigatoriamente da subespécie *Oryctolagus cuniculus algirus*, e de proveniência próxima do local a repovoar, por forma a respeitar a base genética das populações locais;** • **Garantir a pureza genética dos animais introduzidos através da utilização de animais com certificado genético de origem controlada;** • **Garantir o estado sanitário dos animais introduzidos através da utilização de animais com certificado sanitário;** • **Cumprir um período de quarentena em cercados de adaptação ao local;**
3. Os animais introduzidos poderão:
• **Ser sujeitos a vacinação contra a mixomatose e a doença hemorrágica viral (nova variante), antes de largados, embora a vacinação seja um tema controverso e não suportado por alguns trabalhos científicos.**

Confidencial – Documento de trabalho não finalizado

7. Importância do conhecimento demográfico e sanitário das populações na Gestão Cinegética de Leporideos

A monitorizacao regular das populações permite obter informação sobre a parâmetros importantes como distribuição (i.e., área ocupada), a abundância (i.e. número de animais), a proporção entre sexos (i.e. machos/fêmeas), a estrutura etária e a condição corporal, entre outros aspetos. Existem vários métodos de monitorização disponíveis, cada um com as suas vantagens e desvantagens. Não está no âmbito deste manual a descrição das vantagens e desvantagens de cada um dos métodos disponíveis. No entanto pode ser consultada a revisão por Monterroso et al., 2016.

Entre os métodos de monitorização com melhor relação qualidade-esforço e facildade de implementacão encontram-se as contagens diretas de animais e as contagens de excrementos, ambos implementados pelo projeto +Coelho.

No entanto, é importante reconhecer que as contagens obtidas durante a recolha de dados de campo não se traduzem diretamente no valor de abundância ou densidade dos animais existentes na zona de caça. Existem factores importantes relacionados com a detetabilidade (ex: as variações dos comportamento e atividade dos animais com o habitat, condicões atmosféricas ou fase do ciclo reprodutivo), que podem afetar de forma significativa as estimativas e conduzir a decisões de gestão desajustadas, com consequências negativas para as populações que se pretendem conservar. Assim, é importante que a monitorização e subsequente análise da informação seja apoiada por técnicos especializados e com conhecimento sobre as ferramentas estatísticas aplicadas à avaliação de processos populacionais, para que as estimativas obtidas retratem adequadamente os parametros reais.

mento de trabalho não finalizado

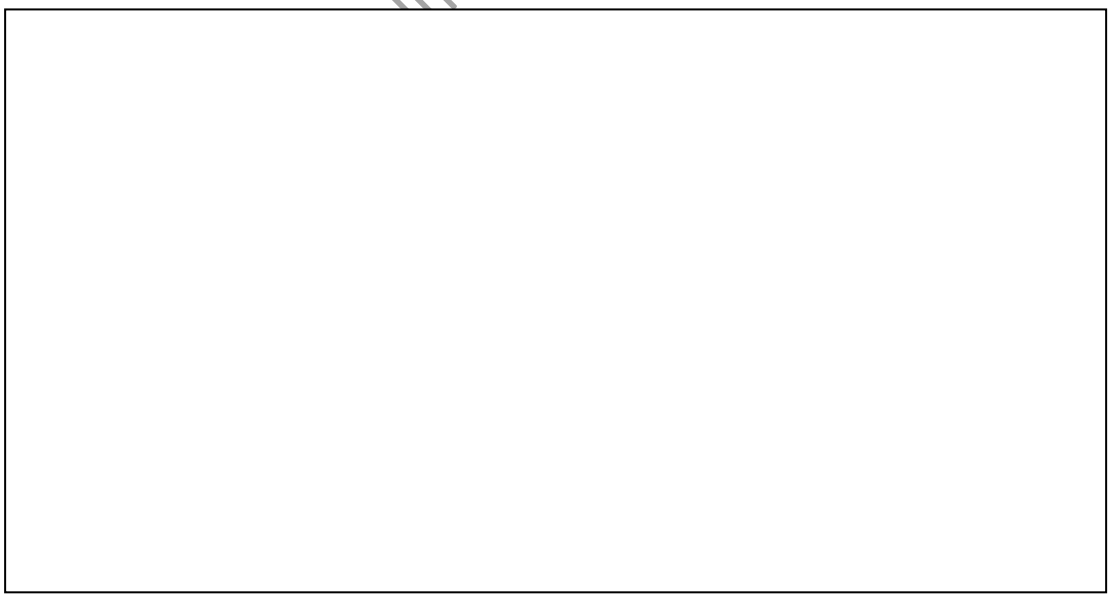


Figura 22. Contagens diretas

A integração da informação da dinâmica populacional com a informação epidemiológica num período suficientemente alargado (análise longitudinal), e a sua relação com fatores bióticos (ex: densidade de predadores, tipos de culturas, etc) e abióticos (temperatura, precipitação, etc.) dos ecossistemas, podem permitir avaliar as variáveis que efetivamente contribuem para a maior ou menor densidade de leporídeos e, a médio ou longo prazo, contribuir para uma gestão mais adequada das populações à diversidade do nosso território.

não finalizado







Figura x. Latrina de coelho (esquerda) e fezes de lebre (direita).





Figura x. Instalação de grelhas para contagem de excrementos com vista à avaliação populacional por métodos indiretos.

As épocas mais frequentemente utilizadas para calcular a densidade das populações são a pré- e a pós-reprodução, o que permite ainda obter dados sobre a produtividade das populações.

8.Considerações finais

O crescimento populacional e a consequente intensificação das atividades humanas, nomeadamente a industrialização, automatização e intensificação das atividades rurais, entre outros factores, aumentaram e tornaram crónico, o impacto negativo do Homem nos ecossistemas, incluindo os mediterrâneos onde se inserem o ceolho-bravo e a lebre-ibérica.

Com efeito, o impacto das atividades humanas faz-se sentir mesmo nos ecossistemas mais remotos, ainda considerados "totalmente selvagens", através da poluição das águas por plásticos e outros contaminantes, e naturalmente fruto do aquecimento global.
Assim, é crucial para o futuro da biodiversidade mundial, que os decisores políticos sejam sensibilizados para a importância da constante monitorização das espécies, populações e ecossistemas e para a contínua avaliação do impacto das atividades humanas sobre a sua preservação.

A nível local, a gestão cinegética, a par de outras estratégias de monitorização dos ecossistemas (guardas florestais, equipas de Medicina da Conservação e Biologia, entre outras) deve ser interpretada como uma medida essencial e extremamente positiva no contexto atual, permindo o contínuo acompanhamento do estado das populações das espécies cinegéticas e de outras (ex: abetardas, linces, aves de rapina, etc), a sinalização de mortalidade e o apoio à implementação de medidas de monitorização, controlo, mitigação, em estreita articulação com a comunidade científica.

Confidencial, Documento de trabalho não fin

9. Legislação Aplicável

- **Despacho n.º 4757/2017,** Diário da República n.º 105/2017, Série II de 2017-05-31
- Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural - Gabinete do Ministro
- **Portaria n.º 105/2018** Diário da República n.º 76/2018, Série I de 2018-04-18, Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- **Decreto-Lei n.º 202/2004**, de 18 de agosto, na redação do Decreto-Lei n.º 2/2011, de 6 de janeiro (Regulamenta a Lei n.º 173/99, de 21 de setembro - Lei de Bases Gerais da Caça.
- **Decreto-Lei n.º 24/2018 -** Diário da República n.º 71/2018, Série I de 2018-04-11 Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- **Portaria 181/2018 - Diário da República n.º 119/2018, Série I de 2018-06-22** Finanças e Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- **Portaria 148/2018 -** Diário da República n. 98/2018, Série I de 2018-05-22 Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- **Portaria 104/2018 -** Diário da República n.º 76/2018, Série I de 2018-04-18 Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- **Decreto-Lei n.º 167/2015 - Diário da República n.º 163/2015,** Série I de 2015-08-21 Ministério da Agricultura e do Mar
- **Decreto-Lei n.º 2/2011, D.R. n.º 4, Série I de 2011-01-06** Presidência do Conselho de Ministros
- **Decreto Lei n.º 173/99 de 21 de Setembro**

10. Referências Bibliográficas

1. Ferreira, C. & Alves, P.C. (2006). *Gestão de populações de Coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus)*. Federação Alentejana de Caçadores, Beja.188pp
2. Ferreira C., Rodrigues T., Leitão M., Paupério J., Gonçalves D. & **Alves P.C.** (2012). *Gestão de Recursos Cinegéticos no Arquipélago dos Açores – O Coelho-bravo*. CIBIO-UP e Direcção Regional dos Recursos Florestais, Porto.
3. Monterroso, P., Queirós, J., Santos, N., Rodrigues, T.M., Rodrigues, M.M., Santos, E., Gonçalves, D. & **Alves, P.C.** (2016) Boas práticas na gestão cinegética. CIBIO/InBIO, ICNF & Câmara Municipal de Mértola.
4. Monterroso P, Garrote G, Serronha A, Santos E, Delibes-Mateos M, Abrantes J, Perez de Ayala R, Silvestre F, Carvalho J, Vasco I, Lopes A, Maio E, Magalhães M, Mills LS, Esteves PJ, Simón MA, **Alves PC.** (2016). Disease-mediated bottom-up regulation: An emergent virus affects a keystone prey, and alters the dynamics of trophic webs. *Scientific Reports*, 6: 36072 doi:10.1038/srep36072
5. Ferreira C, Castro F, Piorno V, Barrio I, Delibes-Mateos M, Rouco C. Mínguez LE, Aparicio F, Blanco-Aguiar JA, Ramírez E, Iriarte C, Ríos-Saldaña CA, Cañadilla J, Arias de Reyna L, Ferreras P, **Alves PC**, & Villafuerte R (2015). Biometrics reveals major

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

differences between the two European rabbit subspecies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 116: 106-116.

6. **Alves, P.C.**, Gonçalves & H., Rocha, A. (2002). Reproductive biology of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, in Portugal. *Mammalian Biology* 67:358-371.
7. Gonçalves, H., **Alves, P.C.** & Rocha, A. (2002). Seasonal variation on the reproductive activity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) in a Mediterranean ecosystem. *Wildlife Research* 29:165-173.
8. **Alves, P.C**. & Rocha, A. (2003). Environmental factors have little influence on the reproductive activity of the Iberian hare, *Lepus granatensis*. *Wildlife Research* 30:639-647**.**
9. The Health and Future of the Six Hare Species in Europe: A Closer Look at the Iberian Hare DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91876.
10. A importância dos leporídeos no equilíbrio das cadeias tróficas e na biodiversidade ibérica. Carina Carvalho, Fábio A. Santos, Jéssica Monteiro, Margarida Duarte, Paulo Célio Alves, Ana Hora e Gonçalo Lopes. Vida Rural. Julho/Agosto 2020.
11. "As principais ameaças infeciosas à saúde dos leporídeos selvagens de Portugal", Revista Veterinária Atual, Nº143, novembro de 2020.
12. "First cases of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Portugal", Carina Luísa Carvalho, F.A. Abade dos Santos, M. Monteiro, P. Carvalho, P. Mendonça, M. D. Duarte, Vet Rec Case Rep: [12 April 2020].
13. "First description of a herpesvirus infection in genus Lepus", F. A. Abade dos Santos,M. Monteiro, A. Pinto, C. L. Carvalho, M. C. Peleteiro, P. Carvalho, P. Mendonça, T. Carvalho, M. D. Duarte, PLoS One. 2020; 15(5): e0233799.21 May 2020.
14. Detection of recombinant Hare Myxoma Virus in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus)*. Abade Dos Santos F. A., Carvalho C. L., Pinto A., Rai R., Monteiro M., Carvalho P., Mendonça P., Peleteiro M. C., Parra F., Duarte M. D. Viruses. 2020 Oct 5;12(10):1127. doi: 10.3390/v12101127.PMID: 33028004 Free PMC article.
15. "Recombinant myxoma virus infection associated with high mortality in rabbit farming (*Oryctolagus cuniculus*)", Fábio A. Abade dos Santos, Carina L. Carvalho, Madalena Monteiro, Paulo Carvalho, Paula Mendonça, Maria da Conceição Peleteiro, Margarida D. Duarte. First published: 29 October 2020 https://doi.org/10.1111/tbed.13899
16. P. Monterroso et al., Sci. Rep. 6, 36072 (2016).
17. P. T. S. Margarida D. Duarte, Carina L. Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Jéssica Monteiro, Madalena Monteiro, Paulo Melo Carvalho, Paula Mendonça, P. C. Melo, in Lagomorphs (IntechOpen (in press), 2020).
18. OIE, Myxomatosis (2020), (available at https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Myxomatosis/).
19. A. S. Neimanis et al., 1–12 (2018).
20. R. N. Hall et al., Vet. Rec. 180, 121 (2017).
21. G. Puggioni et al., Vet. Res. 44, 1–7 (2013).
22. A. Camarda et al., Res. Vet. Sci. 97, 642–645 (2014).
23. C. Carvalho, S. Núncio, I. L. De Carvalho, 16–18 (2015).

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

24. J. SEABRA Seabra et al., in Abstracts of the Prevention and Control of Zoonoses, U. 2002 O. 21-23. C. (Wales); Cardiff, Wales, Ed. (Health Protection Agency, 2002), p. Abstract 110.
25. I. L. De Carvalho et al., Emerg. Infect. Dis. 13, 666–667 (2007).
26. J. Mayer, Bacterial and Mycotic Diseases of Rabbits. MSD Vet. Man. (2015), (available at https://www.msdvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/rabbits/bacterial-and-mycotic-diseases-of-rabbits).
27. C. N. Tsokana et al., 1–15 (2020).
28. M. M. Zheludkov, L. E. Tsirelson, 37, 709–715 (2010).
29. M. Fort et al., 156, 439–442 (2012).
30. N. I. Paton, N. W. Tee, C. K. Vu, T. Teo, 1, 129–130 (2001).
31. J. Godfroid, in Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe, Gavier-Widén, J. P. Duff, A. Meredith, Eds. (Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012), pp. 318–328.
32. R. Winkelmayer, M. Vodnansky, P. Paulsen, A. Gansterer, F. Treml, 92, 131–135 (2005).
33. S. Zanet, in 12 th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), A. Schumann, G. Wibbelt, A. D. Greenwood, H. Hofer, Eds. (2016), pp. 2–4.
34. R. Molina et al., Vet. Parasitol. 190, 268–271 (2012).
35. F. Ruiz-Fons, E. Ferroglio, C. Gortázar, 1–5 (2013).
36. N. García et al., Biomed Res. Int. 2014 (2014), doi:10.1155/2014/318254.
37. J. Millán, E. Ferroglio, L. Solano-gallego, 2005–2014 (2014).
38. X. Y. Zhang, Y. N. Jian, L. Q. Ma, X. P. Li, P. Karanis, Korean J. Parasitol. 56, 195–198 (2018).

SITES DE INTERESSE

NACIONAIS

INTERNACIONAIS

Confidencial, Documento de trabalho não finalizado

LOGOS No FINAL

Anexo VII-C

Flyers

3. COMO COLABORAR? (cont.)

Convidam-se todos os agentes do campo (Proprietários rurais, Gestores e Caçadores) a colaborar na vigilância das populações de lebre, e a adotar medidas que evitem ou reduzam a contaminação ambiental e a disseminação de agentes infecto-contagiosos.

5. Desinfetar semanalmente os bebedouros com hipoclorito de sódio (0.5 %), se existentes;Desinfetar as solas das botas, equipamentos robustos e rodas dos veículos, através de pedilúvios ou rodilúvios, com hipoclorito de sódio (0.5 %), antes da saída da zona de caça afetada, tendo em conta a possibilidade de transporte mecânico do vírus através de cães, pessoas, equipamentos e veículos contaminados;
6. Desinfetar as entradas das tocas com cal viva e controlar vetores (moscas, mosquitos, etc), uma vez que estes podem ser veículos de variadas doenças;
7. As áreas reconhecidamente afetadas devem ser as últimas a ser percorridas na zona de caça. Neste caso, todos os animais caçados deverão ser amostrados e as amostras biológicas respetivas, enviadas para o INIAV, através dos pontos de recolha;
8. Realizar a evisceração dos animais em ato venatório sobre um plástico, por forma a evitar pingos de sangue no chão;
9. Enterrar as vísceras de lebres das áreas afetadas em vala revestida com cal, que também deve ser aplicada sobre as vísceras, antes de cobrir com camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v), alínea a), artigo 8º do Reg. CE n.º 1069/2009].
10. Alternativamente, encaminhar os subprodutos para empresa de tratamento.



Projeto **+COELHO 2**: "Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal"

ICNF Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

LEBRE-IBÉRICA
(*Lepus granatensis*)

Na sequência do **Despacho n.º 4757/2017, de 31 de maio**, está em curso um **Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral do Coelho-bravo** (*Oryctolagus cuniculus*), considerado uma das espécies cinegéticas principais no quadro venatório Nacional e Ibérico. Desde a sua conceção e implementação, este Plano de Ação dedica-se igualmente à lebre-ibérica (um mamífero também pertencente à ordem *Lagomorpha*, mas ao género *Lepus*), pela sua idêntica importância. A lebre-ibéria está atualmente classificada pelo IUCN como "pouco preocupante", mas avaliações recentes efetuadas em Espanha e em Portugal apontam para uma redução extremamente preocupante das populações, na ordem dos 55 a 75%.

IMPORTÂNCIA DA LEBRE-IBÉRICA

1. Única espécie de lebre existente em Portugal (*Lepus granatensis*). O seu território é limitado a parte da Península Ibérica.
2. Juntamente com o coelho-bravo, a lebre-ibérica é uma espécie chave na preservação dos ecossistemas mediterrânicos.
3. É presa importante para vários carnívoros terrestres e aéreos (Raposa, Lince-ibérico, Águia-de-bonelli, Águia-imperial-ibérica, Bufo-real, etc.)

AMEAÇAS

As populações de lebre-ibérica encontram-se em redução progressiva desde a década de 80, acompanhando as reduções do coelho-bravo.

1. Perda progressiva de habitat fruto do abandono das práticas tradicionais do uso da terra;
2. Aumento da pressão de predação, fruto essencialmente da redução do coelho-bravo e da perdiz-vermelha;
3. Pressão cinegética excessiva face à reduzidas dimensões das populações;
4. Doenças entre as quais a mixomatose (que emergiu 2018) e a cisticercose.

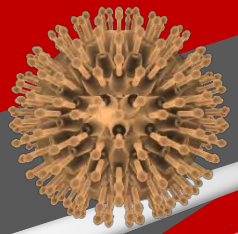
Para mais informações:
maiscoelho@iniav.pt

ALERTA SOBRE A CIRCULAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS (**LeHV-5**) NAS POPULAÇÕES DE LEBRE-IBÉRICA



REPÚBLICA PORTUGUESA
AGRICULTURA
iniav
ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas
dgav Direção Geral de Alimentação e Veterinária
iBET Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica
CIBIO InBIO em Biodiversidade e Biologia Evolutiva
Ordem dos Médicos Veterinários
FENCAÇA
CNCP
anpc

1. O QUE É O LEHV-5?



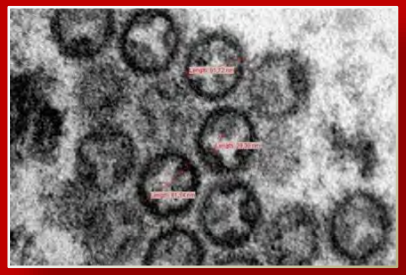
O ***gamaherpesvirus* 5 dos leporídeos (LeHV-5)** foi detetado recentemente (2019) pela primeira vez, no âmbito vigilância sanitária (eixo de intervenção I) do **Projeto +Coelho 2** que põe em prática o Plano de Ação.

Este vírus, pertencente à subfamília *Gammaherpesvirinae*, foi inicialmente detetado em lebres co-infectadas com o vírus da mixomatose, onde foram observadas lesões características dos dois vírus. Estes animais foram recolhidos dos distritos de Setúbal, Portalegre, Beja e Évora.

O vírus foi também detetado em lebres aparentemente saudáveis, sugerindo que, à semelhança de muitos outros herpesvírus de outras espécies animais, incluindo de humanos, o LeHV-5 circule de forma assintomática nas populações selvagens.

São necessárias mais investigações para determinar o verdadeiro impacto deste vírus. No entanto, os dados preliminares sugerem que a doença se faça sentir sobretudo em animais imunodeprimidos, como é o caso dos animais infetados pelo vírus da mixomatose, ou com outras doenças debilitantes, como a cisticercose, ou ainda em animais subnutridos ou sujeitos a pressão ambiental excessiva.

Esta descoberta foi publicada em 2020 na Revista internacional PLoS One , 15(5): e0233799.21 May 2020, com o título - "*First description of a herpesvirus infection in genus Lepus*", e está disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795



Microscopia Electrónica do LeHV-5

2. QUE LESÕES SE ENCONTRAM NAS LEBRES INFECTADAS POR ESTE VÍRUS?

As lesões observadas incluem edema e necrose dos genitais, nomeadamente dos testículos, pénis e vulva. É possível observar vesículas e vesiculo-pústulas na pele e mucosas, nomeadamente nos lábios, nariz e língua.



Lebre com LeHV-5 exibindo vesículas nos lábios e focinho, em diferentes fases de desenvolvimento, algumas contendo líquido



Pénis de lebre-ibérica adulta com LeHV-5, apresentando necrose extensa



Aspecto normal do pénis de lebre-ibérica adulta saudável.

As lesões microscópicas confirmam a presença de um herpesvírus com tropismo para as células da derme e epiderme que terão inevitavelmente impacto no bem-estar, reprodução e nutrição dos animais afetados.

Desconhecemos ainda as vias **transmissão do vírus** a animais saudáveis. Contudo, as lesões induzidas apontam para que a transmissão possa ocorrer por **contacto sexual** com animais infetados, por via oral, nasal ou conjuntival ou por **contacto indireto com outras fontes de infeção**.

3. COMO COLABORAR?

Convidam-se todos os agentes do campo (Proprietários rurais, Gestores e Caçadores) a colaborar na vigilância das populações de lebre, e a adotar medidas que evitem ou reduzam a contaminação ambiental e a disseminação de agentes infecto-contagiosos.

COLABORE! O NOSSO TRABALHO DEPENDE DE SI...

1. No caso de serem visualizadas lesões características do LeHV-5 em lebres, por favor contactar rapidamente o Laboratório de Virologia do INIAV, por telefone (+351) 214403500 ou através do endereço de e-mail: **maiscoelho@iniav.pt**, para se organizar a recolha destes animais;
2. Interromper a caça à lebre (como tem vindo a ser feito por muitas zonas de caça), ou a sua redução, de acordo com o número dos efetivos e censos;
3. Recomenda-se ainda um conjunto de medidas generalistas, cujo efeito é benéfico para todas as patologias nomeadamente:
   - Intensificar a prospeção no campo de cadáveres de lebres, e a recolha dos animais mortos ou moribundos. Todos os cadáveres deverão ser mantidos refrigerados ou congelados e enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do Plano de Ação: (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_pontosdeentrega.pdf);
4. Para a recolha de cadáveres durante todo o ano, o INIAV disponibiliza kits de colheita e fichas para identificação das amostras, estando o protocolo de colheita de amostras e os locais para entrega dos mesmos disponíveis no site do INIAV (www.iniav.pt), em suporte de papel e em vídeo de demonstração.



Foto: Emidio Machado

Anexo VII-D

Alertas e Recomendações

Informações das atividades do GT +Coelho

Número 57
15 novembro 2018

Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico laboratorial da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados.

A vigilância sanitária de coelho-bravos e lebres, caçados e encontrados mortos, desenvolvida no âmbito do Projeto +Coelho, tem especial enfoque na doença hemorrágica viral (DHV) e na mixomatose, não obstante a realização de análises bacteriológicas e parasitológicas, particularmente dos animais encontrados mortos, para uma compreensão mais alargada do estatuto sanitário das populações.

Durante o primeiro ano do projeto, foi detectado o vírus da mixomatose em coelhos caçados e encontrados mortos, com percentagens de prevalência amostral de 4,95% e 7,69%, respetivamente (Notícia 53).

Nenhuma das 79 lebres caçadas amostradas na época venatória 2017/2018 foi, contudo, positiva a mixomatose ou a DHV.

No entanto, no decorrer da avaliação sanitária efetuada desde o início da época venatória 2018/2019, detectaram-se, à data, duas lebres positivas a mixomatose (um exemplar caçado e outro encontrado morto).

Nas populações domésticas e nas populações selvagens de coelho europeu, a mixomatose pode apresentar-se em duas formas clínicas. A **forma nodular** é reconhecida pela formação de tumores cutâneos, designados mixomas. Neste tumores, o vírus está presente em grandes quantidades, constituindo o material ideal para diagnóstico.

A mixomatose pode, no entanto, apresentar-se numa **forma respiratória** ou amixomatosa, na qual os tumores cutâneos não estão presentes. Para o diagnóstico desta forma respiratória, caracterizada por dificuldade respiratória devido a edema (acumulação de liquidos) do pulmão, mas na qual também se

Necessidade de colheita de pulmão para o diagnóstico da forma respiratória de mixomatose - Atualização do protocolo de colheita de material biológico de leporídeos caçados.

pode observar edema das pálpebras, cabeça e orelhas, bem como infeção dos seios nasais (rinite) e da conjuntiva ocular (blefaroconjuntivite), **o pulmão constitui a matriz de eleição para o diagnóstico laboratorial**.

Por esta razão, solicitamos que, **durante a colheita de material biológico de animais caçados, passe também a ser recolhido um fragmento de pulmão, tanto em coelho-bravo, como em lebre, para que a forma respiratória da mixomatose possa vir a ser detectada com maior probabilidade**. Para utilização dos kits que já estão distribuidos nas OSCs, o fragmento de pulmão pode ser recolhido para o tubo destinado a baço e figado, que passa assim a conter fragmentos de 3 orgãos distintos. No futuro, será incluido nos "kits caixa" um tubo adicional para recolha de pulmão.

Aproveitamos para informar que, em função da necessidade de matriz adicional para diagnóstico (pulmão), o **protocolo de colheita foi atualizado** nos pontos assinalados a amarelo:



PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS

PROTOCOLO DE RECOLHA DE MATERIAL PARA EXAME VIROLÓGICO E SEROLÓGICO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS LEPORÍDEOS

1 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Todas as amostras (cadáveres, órgãos e sangue) deverão ser acompanhadas pela respetiva ficha de identificação preenchida.

2 RECOLHA DE ANIMAIS ENCONTRADOS MORTOS

2.1. Abrir o saco de plástico transparente;
2.2. Calçar uma luva;
2.3. Pegar no cadáver com a mão protegida pela luva e colocá-lo dentro do saco de plástico transparente. Introduzir também a luva suja (virada do avesso) e fechar o saco com o elástico;
2.4. Colocar este saco com o cadáver dentro do saco de plástico vermelho;
2.5. Introduzir a ficha de identificação do material (preenchida, dobrada e colocada dentro da boina), também dentro do saco vermelho e fechar com nó;
2.6. Entregar o cadáver num dos pontos de recolha assinalados no verso desta folha.

Nota: caso não efetue a entrega de imediato, se possível, congelar o cadáver (-20ºC) até à sua entrega;

3 COLHEITA DE SANGUE e ORGÃOS (FÍGADO, BAÇO E INTESTINO/FEZES) DE COELHOS APARENTEMENTE SAUDÁVEIS, CAÇADOS EM ÉPOCA VENATÓRIA

3.1. Calçar luvas;
3.2. Colocar o animal sobre uma superfície lisa em cima de um saco de plástico;
3.3. Deitar o animal sobre o dorso;
3.4. COLHEITA DE FÍGADO, BAÇO E PULMÃO:
3.4.1. Com um bisturi, fazer uma incisão na região abdominal, cortando a pele e o músculo, de modo a que permita visualizar o estômago, o fígado e as intestinos; remover um fragmento de fígado do tamanho de uma avelã e colocar no tubo de plástico respetivo;
3.4.2. Fedar o estômago para localizar o baço, cortar um fragmento (1 cm) e introduzi-lo no mesmo tubo;
3.4.3. Perfurar o diafragma e colher um pedaço de pulmão (1 cm) e introduzi-lo no respetivo tubo
3.5. COLHEITA DE SANGUE POR PUNÇÃO CARDÍACA OU RECOLHA DO COÁGULO INTRACARDÍACO
Punção cardíaca:
3.5.1. Contar o 3º espaço entre as costelas inferiores a partir do esterno (aprox. 0,5 cm).
3.5.2. Posicionar entre as costelas, perfurar o coração e aspirar o sangue; se necessário subir lentamente a agulha e ir aspirando;
3.5.3. Retirar a agulha da seringa, embainhá-la e despejar lentamente o sangue para a parede do tubo.
Recolha do coágulo intracardíaco:
3.5.4. Alternativamente à punção cardíaca, abrir o coração e recolher sangue ou coágulo para tubo;
3.5.5. Colocar as amostras biológicas dentro de caixa juntamente com a ficha de identificação preenchida.
3.6. COLHEITA DE DUODENO OU FEZES:
3.6.1. Fezes: o estômago e localizar a porção intestinal contigua, cortar com bisturi uma porção de 1 cm. Colocar dentro de tubo de plástico;
3.6.1. Fezes: se não for possível colher duodeno, colher fezes;
3.7. Preencher a ficha de identificação do material (retirá-la na bolsa) e as etiquetas (colá-las aos tubos);
3.8. Entregar o material num dos pontos de recolha assinalados no verso do documento.

4 COLHEITA DE ECTOPARASITAS | PARASITAS INTERNOS

4.1. Colher os ectoparasitas (carraças, pulgas, etc) para o microtubo.
4.2 Colher os parasitas do trato gastro-intestinal (ex. tenias, cisticercos) para tubo.

PRECAUÇÕES IMPORTANTES:
- Na colheita de órgãos siga a sequência: exterior, fígado, baço, intestino ate e evitar contaminar o fígado e baço com fezes.
- Recomenda-se a relativa cautela ao "reviramento" e ao uso e o bisturi.
- Recolher todo o material descartável utilizado na colheita (seringa, agulha entomológica etc) para o interior do saco de lixo, de preferência para o interior de uma luva virada do avesso. Todo o material no fim deve ser devolvido à casa, não retirando nada no campo.
- Se possível, o caso o material não seja entregue de imediato, congelar (-20ºC) o material até ao seu envio para o ponto de recolha.

KIT para animal caçado: Luvas, 3 frascos de rosca (1 para fígado/baço, 1 para fezes/duodeno, 1 para sangue/coágulo), 1 microtubo para ectoparasitas, cartaz, agulha, bisturi, etiquetas, fita, marc, ficha de identificação do material, protocolo de colheita.
KIT para animal encontrado morto: Luvas, saco de cores diferentes, ficha de identificação, protocolo de colheita, mina, elástico.

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

|Número 31
7 maio 2018

Informações das atividades do GT +Coelho

Circulação do Vírus da Doença Hemorrágica Viral em coelhos domésticos e em coelhos-bravos selvagens na Ilha da Madeira

As estirpes clássicas do vírus da doença hemorrágica dos coelhos (tipo 1, RHDV) circularam no arquipélago da Madeira, nomeadamente nas ilhas da Madeira e Porto Santo, até 2011 e finais de 2012, respetivamente, tendo a doença sido controlada na altura por vacinação.

O novo vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (tipo 2, RHDV2) foi detetado no Porto Santo em outubro de 2016, e subsequentemente, em janeiro de 2017, também na ilha da Madeira, afetando inicialmente populações selvagens e, posteriormente, animais domésticos de ambas as ilhas. Esse estudo foi conduzido pelo INIAV IP em parceria com a Direção Regional para a Administração Pública do Porto Santo (DRAPS), o Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar da Direção Regional de Agricultura (DRA) da Região Autónoma da Madeira, e a Universidade de Évora [Carvalho et al. (2017) *Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016-2017)*, Virus Genes]. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11262-017-1483-6.pdf

Na sequência destes surtos, a 17 de fevereiro de 2017, foi publicado o edital nº1/SRAP/DRA/DSAV sobre a doença hemorrágica viral dos coelhos (em baixo).

Durante os meses subsequentes de 2017, não se reportaram outros casos de doença no Arquipélago. Contudo, em Janeiro de 2018, registou-se de novo mortalidade compatível com RHDV2 em coelhos domésticos, estendendo-se posteriormente, no final de fevereiro e inicio de março, aos coelhos-bravos selvagens.

No âmbito da vigilância sanitária das populações de coelho-bravo, enquadrada no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio) e no projeto *"+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da*

Circulação do Vírus da Doença Hemorrágica Viral em coelhos domésticos e em coelhos-bravos selvagens na Ilha da Madeira

Doença Hemorrágica Viral", foi confirmada a circulação de RHDV2 por diagnóstico laboratorial, numa exploração caseira situada ao pé da montanha do Pico Ruivo, onde se registou uma elevada mortalidade (95,5%; 21/22). Os animais foram necropsiados por Margarida Costa e Paz Gouveia (médicas veterinárias) que reportaram epistaxis (perda de sangue pelas narinas) e congestão pulmonar. Os animais apresentavam boa condição corporal.
Foi também, posteriormente, detetado RHDV2 em coelhos-bravos encontrados mortos junto ao Campo de Golfe, no sitio das Marinhas.

Na sequência deste resultado, salienta-se a importância de se reforçar as medidas de biossegurança (ver Edital anexo), face à elevada resistência do vírus no meio ambiente. A vacinação dos animais domésticos é importante para se minimizar a propagação do vírus às populações selvagens, naquela e noutras áreas geográficas.

Recomenda-se ainda a intensificação da prospeção de mortalidade e remoção sistemática dos cadáveres encontrados, para diminuição da transmissão. Os cadáveres deverão ser enviados para o Laboratório Regional da Madeira, que encaminharão os materiais para o INIAV e o Grupo de trabalho +Coelho, a fim de se efetuar o diagnóstico virológico.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

S. R.
REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA
GOVERNO REGIONAL
SECRETARIA REGIONAL DE AGRICULTURA E PESCAS
DIREÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA

EDITAL Nº 1/SRAP/DRA/DSAV

António Paulo Sousa Franco Santos, Diretor Regional de Agricultura, na qualidade de Autoridade Sanitária Veterinária Regional, torna público que:

A Doença Hemorrágica Viral é uma doença causada por um agente viral do género Calicivirus. A sua presença é regularmente relatada em Portugal Continental assim como no arquipélago da Madeira.

A Doença Hemorrágica Viral afeta apenas os leporídeos, não existindo perigo para qualquer outra espécie animal nem para a Saúde Pública.

Os sintomas podem variar, desde a falta de apetite e apatia, à morte súbita com saída de sangue pelas narinas (epistáxis), antecedida de agitação, vocalização e convulsões.

Após análises laboratoriais foi confirmada a presença do vírus da Doença Hemorrágica Viral, mais especificamente o RHDV2, na Ilha da Madeira

Assim, ao abrigo do disposto no art.º 4, do Decreto-Lei n.º 39.209, de 14 de Maio de 1953, determino o seguinte:

1. É proibida a saída de qualquer coelho e seus produtos derivados da Ilha da Madeira para qualquer destino.
2. É proibida qualquer movimentação de coelhos entre detentores da Ilha da Madeira a menos que devidamente autorizada pela Direção Regional de Agricultura.
3. É proibida a comercialização e exposição de coelhos em mercados, feiras e outros eventos culturais da Ilha da Madeira exceto se devidamente autorizadas pela Direção Regional de Agricultura.

A propagação da doença faz-se essencialmente pelo contacto direto entre animais doentes com os sãos e também pelas pessoas que contactam diretamente com os animais doentes, na sua própria exploração ou noutras, pelo que se recomenda:

a. Melhorar as condições de higiene dos alojamentos dos coelhos. Todos os materiais e utensílios que tenham contactado com animais doentes, deverão ser imediatamente lavados, desinfetados e armazenados em local próprio e isolado de

Av. Arriaga nº 21 A – Edifício Golden Gate 3º Andar | 9000-060 Funchal | T. +351 291 204200 F. +351 291 225708
www.madeira.gov.pt dra.srap@gov-madeira.pt | NIF 600086615

modo a evitarem-se, tanto quanto possível, quaisquer contaminações;

b. Havendo suspeita de doença separar os animais sãos dos animais doentes;
c. Isolar os coelhos doentes;
d. Proceder ao enterramento profundo dos cadáveres com deposição de uma camada de cal viva, antes de tapá-los com terra;
e. Nunca soltar os coelhos doentes ou abandoná-los, nomeadamente nas serras, terrenos agrícolas ou baldios;
f. Não permitir a visita de pessoas estranhas à sua exploração e não introduzir novos animais na sua coelheira;
g. Promover todas as medidas de biossegurança possíveis de modo a conter a propagação do vírus;
h. Proceder à vacinação dos coelhos.

4. Qualquer caso de suspeita de doença deverá ser comunicado à Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária, sita na Avenida do Mar e das Comunidades Madeirenses, n.º23, 2.ºandar.
5. A Guarda Nacional Republicana, a Polícia de Segurança Pública e a Polícia Florestal devem fiscalizar o cumprimento das condições impostas pelo presente edital.
6. O incumprimento das disposições deste Edital, acarreta as penalidades previstas no art.º 14.º do Decreto-Lei n.º 39.209, de 14 de maio de 1953 e suas alterações, bem como, a demais legislação aplicável.
7. Este Edital entra imediatamente em vigor solicitando-se a todas as autoridades policiais e administrativas e seus Agentes, que fiscalizem o seu integral cumprimento.
8. O levantamento das medidas impostas, será comunicado por novo Edital.

Funchal, 10 de Fevereiro de 2017

O Diretor Regional de Agricultura

António Paulo de Sousa Franco Santos

Av. Arriaga nº 21 A – Edifício Golden Gate 3º Andar | 9000-060 Funchal | T. +351 291 204200 F. +351 291 225708
www.madeira.gov.pt dra.srap@gov-madeira.pt | NIF 600086615

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 5
8 novembro 2017

Deteção da Circulação do Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos e Recomendações para as Áreas Afetadas

No passado dia 3 de novembro, o grupo +Coelho detetou, por métodos moleculares, a presença da nova variante do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) num cadáver de coelho-bravo. As análises efetuadas a este animal enquadram-se na vigilância sanitária das populações de coelho-bravo, prevista no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio) e no projeto "*+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral*". Desde o início da época venatória de 2017/2018, foram testadas, à data, para a presença da nova variante, amostras de 100 leporídeos caçados e 7 cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo. Neste conjunto das amostras testadas, incluindo coelhos e lebres, este é o primeiro animal positivo a RHDV2. O coelho-bravo em causa foi encontrado no dia 26 de outubro de 2017, por prospeção ativa, na zona de caça associativa de Arazede (ZC nº 2168), Montemor-o-Velho, indiciando a circulação do vírus na área. O animal, de condição corporal média (1 kg), apresentava sinais de necrofagia, e epistaxis (perda de sangue pelas narinas).

Foi remetido pela Federação de Caçadores Portugueses da Beira Litoral, chegando aos Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal do INIAV, em Oeiras, no dia 30 de outubro de 2017.



Cadáver de coelho-bravo congelado, Sala de Necrópsias do Laboratório de Patologia, UEISPSA, INIAV, OEiras

Recomendações para as áreas afetadas pelo Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Na sequência deste resultado, o grupo +Coelho entende ser relevante divulgar informação sobre as vias de disseminação e infeção do vírus e recomendar o reforço de medidas de biossegurança, face à elevada resistência do vírus e consequente persistência no meio ambiente por longos períodos, por forma a minimizar a propagação a outros animais e áreas geográficas.

Recorda-se que o vírus pode ser excretado na urina, fezes e secreções nasais dos animais infetados, sendo as principais vias de infeção a oro-nasal e a conjuntival. Assim, os animais saudáveis podem infetar-se pelo contato direto com animais infetados assintomáticos ou doentes, mas também com cadáveres ou com fluidos (sangue, urina, etc) contendo o vírus, presentes no meio ambiente.

Para evitar a contaminação ambiental e a disseminação de RHDV2, listam-se algumas recomendações para as áreas onde seja confirmada a sua circulação:

1) Intensificação da prospeção de mortalidade e remoção sistemática dos cadáveres encontrados, para diminuição da transmissão; todos os cadáveres deverão ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do plano de ação: http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_pontosdeentrega.pdf
2) Desinfeção semanal com desinfetantes aprovados dos bebedouros, se existentes;
3) Interrupção da suplementação de alimento, por forma a desfavorecer a proximidade entre animais;
4) Evisceração dos animais em ato venatório sobre um plástico, por forma a evitar pingos de sangue no chão;
5) Desinfeção das solas das botas, equipamentos robustos e rodas dos veículos através de pedilúvios ou rodilúvios, com desinfetantes aprovados, antes da saída da Zona de Caça afetada, tendo em conta a possibilidade de transporte mecânico do vírus através de cães, pessoas, equipamentos e veículos contaminados;
6) Controlo de vetores nas aberturas das tocas, uma vez que o vírus pode ser disseminado mecanicamente por insetos;

Recomendações para as áreas afetadas pelo Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

7) As áreas conhecidas como afetadas devem ser as últimas a ser percorridas na jornada de caça. Neste caso, todos os animais caçados deverão ser amostrados e as amostras biológicas respetivas enviadas para o INIAV, através dos pontos de recolha.
8) Para reduzir a contaminação ambiental, importa proceder ao enterramento das vísceras de coelhos e lebres das áreas afetadas, em vala, previamente revestida com cal em pó ou hidratada, que também deve ser aplicada sobre os subprodutos, antes de serem cobertos por uma camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v) da alínea a) do artigo 8º do Reg. CE n.º 1069/2009] ou através de encaminhamento para empresa de tratamento de subprodutos.



REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 8
4 dezembro 2017

Vírus da Mixomatose detectado em populações de coelho-bravo de vários concelhos

No âmbito da vigilância sanitária das populações de coelho-bravo desenvolvida no seio do Projeto +Coelho, foram testadas, desde setembro de 2017, mais de 200 amostras de leporídeos recolhidas pelos técnicos das Organizações do Setor da Caça (FENCAÇA, ANPC e CNCP). As análises têm sido realizadas nos Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal do INIAV (Oeiras), a instituição que coordena o projeto.

Neste rastreio, cujo enfoque principal é a doença hemorrágica dos coelhos causada pela nova variante (RHDV2), têm vindo a ser testados outros agentes patogénicos que afetam os leporídeos, entre os quais o vírus da mixomatose, conhecido pela sua capacidade de induzir a formação de tumores cutâneos, designados mixomas, e ricos em vírus infecioso. A mixomatose pode, no entanto, apresentar-se numa outra forma clínica, de expressão respiratória, sem indução de tumores cutâneos, muito embora se possa verificar edema das pálpebras, cabeça e orelhas, e ocorrer infeção dos seios nasais (rinite) e olhos (blefaroconjuntivite). As duas formas de doença foram já reportadas em coelhos-bravos.



Até ao presente, foram testadas, para a presença do vírus da mixomatose, 237 amostras de coelho bravo, das quais 16 correspondem a cadáveres encontrados no campo e 221 a animais caçados durante esta época de caça. Testaram-se também

11 lebres. Detetou-se, por métodos moleculares, a circulação do vírus da mixomatose em 25 dos coelhos-bravos caçados (11.3%), provenientes dos concelhos de Penafiel (n=3), Montemor-o-Velho (n=3), Abrantes (n=1), Montemor-o-Novo (n=1), Mértola (n=9), Olhão (n=5), e Silves (n=3). Apenas uma pequena proporção destes animais apresentava lesões evidentes de mixomatose (mixomas ou edema das pálpebras e genitais).



A deteção de genoma viral exclusivamente em animais caçados sugere a circulação de vírus de patogenicidade baixa ou moderada (estirpes atenuadas), já que as estirpes mais virulentas provocam uma infeção letal no decurso de poucos dias.

A transmissão do vírus a animais saudáveis acontece por contato direto com animais ou cadáveres infetados, mas também por picada de artrópodes (como a pulga do coelho e mosquitos), que promovem a transmissão mecânica após alimentação em animais infetados.

Assim, por forma a reduzir fontes de infeção e minimizar a disseminação do vírus a outros animais e áreas geográficas, recomenda-se a prospecção ativa de cadáveres, a sua recolha e o envio para as instalações do INIAV Oeiras.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

|Número 49
23 outubro 2018

Informações das atividades do GT +Coelho

Esclarecimentos sobre o artigo publicado no Correio da Manhã a 22 de outubro, anunciando a criação de coelhos geneticamente modificados, resistentes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

O Grupo +Coelho foi repetidamente contactado para esclarecimentos relativamente ao conteúdo de um artigo publicado ontem (22 de outubro de 2018, diário Correio da Manhã) dando conta que as autoridades sanitárias da ilha de Maiorca (Baleares), em Espanha, divulgaram a libertação e consequente sobrevivência de 200 coelhos-bravos **geneticamente modificados** para serem **resistentes à febre hemorrágica viral dos coelhos (DHV)**.
De acordo com esta notícia, o património genético destes animais teria sido manipulado por investigadores espanhóis, por forma a apresentarem uma elevada taxa de sobrevivência à infeção pelo vírus.

Paulo Célio Alves, investigador do CIBIO-InBIO/Universidade do Porto e Parceiro do Projeto +Coelho, especialista em Ecologia Molecular, Genética e Gestão de Mamíferos, contactou diretamente **Rafael Villafuerte Fernandez**, investigador do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e do Instituto de Estudios Sociales Avanzados (IESA-CSIC), que colabora nos projetos que vêm sendo realizados na recuperação das populações de coelho-bravo em Maiorca (Ilhas Baleares).

O investigador Espanhol esclareceu que a **notícia não corresponde ao que está a ser realizado em Espanha e que terá resultado de uma interpretação errada da informação transmitida.** Desde logo, a notícia sobre as Baleares não foi difundida pelas autoridades sanitárias, uma vez que se trata de um estudo realizado pelo Serviço de Caça de Maiorca. Acresce que não foram "manipulados", nem "criados", coelhos geneticamente imunes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos mas, na verdade, **utilizados animais com elevados títulos de anticorpos, provenientes de populações de elevada**

Esclarecimentos sobre o artigo publicado no Correio da Manhã a 22 de outubro anunciando a criação de coelhos geneticamente modificados, resistentes à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

densidade, resultantes da criação e manutenção de núcleos de elevada densidade, em condições controladas. A proteção imunológica de grande parte da população resultou naturalmente numa maior taxa de sobrevivência à infeção. Esta medida de gestão proposta pelo grupo liderado por este investigador tem sido aplicada em numerosas regiões de Espanha desde 2000.

Esclarecemos, portanto, que a notícia publicada no Correio da Manhã não reproduz o que está a ser feito em Espanha.

Os dados obtidos demonstram, porém, a importância de se avaliar os níveis de imunidade das populações naturais de coelho-bravo, bem como a manutenção de núcleos populacionais de elevada densidade, como forma de otimização da gestão.

A noticia refere ainda que, em Portugal, a doença está presente em cerca de 10 a 20% dos coelhos-bravos, nos distritos de Lisboa, Setúbal, Évora e Santarém, segundo o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Esclarecemos que estes **valores de prevalência do vírus da DHV não foram providenciados por investigadores ou técnicos do INIAV,** conforme se lê na notícia. Com efeito, nas suas inúmeras intervenções e na informação disponibilizada no *site* do INIAV, o Grupo de Trabalho +Coelho tem revelado as percentagens de imunidade das populações amostradas ao RHDV2, bem como as percentagens de positividade a RHDV2 e ao vírus da mixomatose **nas amostragens de coelhos caçados e nos cadáveres encontrados no campo**. Ou seja, esta trata-se de uma percentagem de positividade **aparente**, condicionada a uma amostragem oportunística, limitada por vários fatores (tais como mortalidade nas tocas, necrofagia, não deteção dos cadáveres nas prospeções ativas devido à vegetação, recolha e disponibilização limitada dos cadáveres para análise sanitária, etc.), e, por isso, não aleatória. Acresce que, uma vez que **não há informação sobre as densidades populacionais de coelho-bravo na grande maioria dos distritos de Portugal e que a deteção de animais mortos é condicionada por vários fatores, não é possível inferir-se ainda com precisão a percentagem de positividade real (prevalência real)** dos vírus da mixomatose e da DHV na população de leporídeos, quer à escala regional, quer à escala nacional.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 54
8 novembro 2018

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

No âmbito do Projeto +Coelho e do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos foi constituída, no último trimestre de 2017, uma rede de epidemiovigilância e uma rede de recolha de material biológico de coelho e lebre com distribuição nacional.

A **epidemiovigilância ativa e passiva**, que assenta na colheita de amostras de animais caçados e na recolha de animais encontrados mortos no campo para diagnóstico laboratorial, é essencial para se conhecer o **estado sanitário das populações de coelho-bravo e de lebre**, para monitorizar a incidência da nova variante do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) e do vírus da mixomatose, para **mapear a distribuição destes agentes no território nacional**, bem como para estimar a mortalidade de leporídeos associada à infeção por agentes patogénicos virais. Esta vigilância sanitária é essencial para se conhecer e caracterizar a situação no terreno e para que se possam adotar medidas de controlo sanitário, imunoprofiláticas (vacinação, em particular em centros de reprodução) e de biossegurança, adequadas às zonas onde estes vírus circulam.



Colheita de material biológico de coelho após ato venatório

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

Aproveitando a época venatória 2018/2019 para a colheita de material biológico de leporídeos em ato venatório e reforçando a necessidade de se proceder à recolha de cadáveres encontrados no campo, disponibilizamos por esta via (no final desta notícia), uma vez mais, o **protocolo de colheita de material biológico** e o **mapa do território continental com os locais onde podem ser entregues as amostras**. Nos 19 centros de recolha atualmente disponíveis, os espécimes são congelados até à sua entrega nos Laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal, no INIAV.

As **amostras de baço, fígado, sangue e duodeno de coelho e lebre deverão ser recolhidas seguindo os procedimentos de higiene e biossegurança**, de acordo com a metodologia publicada e utilizando-se para o efeito os **kits preparados e disponibilizados pelo INIAV** às Organizações do setor da Caça de 1º nível e as Federações regionais. Os kits de recolha também podem ser solicitados diretamente ao INIAV.



Kits de recolha de material de animal caçado (em cima e em baixo, à esquerda) e de cadáver (em baixo, à direita) distribuídos no âmbito do Projeto +Coelho.

Intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória, sobretudo no que diz respeito à prospeção no terreno de cadáveres de coelho-bravo e lebre

No que se refere aos cadáveres encontrados no campo, e caso não existam disponíveis kits de recolha do Projeto +Coelho, deve proteger-se a mão usando uma luva descartável (ou um saco de plástico), e recolher-se o cadáver para o interior de um saco de plástico. Este deverá ser encerrado com um nó e colocado dentro de um outro saco, juntamente com a luva ou com o saco que serviu de luva, e uma ficha de identificação da amostra, descarregada previamente do site do INIAV e devidamente preenchida. Na impossibilidade de descarregar essa ficha, a informação relevante (data e local da recolha, nome e contacto da pessoa) deve ser registada num papel.

A **observação de animais doentes ou cadáveres deve ser reportada de imediato** ao Grupo de Trabalho +Coelho **(maiscoelho@iniav.pt)**. Os cadáveres devem ser sempre recolhidos por forma a não constituírem fonte de infeção para outros animais.

Em Zonas de Caça **onde se verifique mortalidade, é essencial que não se movimentem animais** (quer por capturas, translocações ou repovoamentos), mesmo que aparentemente saudáveis, por forma a evitar-se uma possível propagação do(s) agente(s) responsável(eis) por doença transmissível em coelhos e lebres.

Considerando as notícias recentes de intensificação da circulação destes agentes virais em coelho e, agora, também em lebre, adverte-se para a necessidade efetiva de **intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça durante esta época venatória**, sobretudo no que diz respeito à **prospeção de animais doentes e de cadáveres** no terreno.

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

5 PONTOS DE ENTREGA (dias úteis)



1 – Oeiras - INIAV - Sede - *Campus* Oeiras
Av. da República, Quinta do Marquês | 2780 - 157 OEIRAS
Tel.: 214 403 500
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: maiscoelho@iniav.pt ; margarida.duarte@iniav.pt

2 – Vairão - INIAV- Laboratório Nacional de Referência de Segurança Alimentar
Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena
4485-655 Vairão - VILA DO CONDE | Tel.: 252 660 600
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: zulmira.lopes@iniav.pt; monica.cunha@iniav.pt

3 – Évora - Laboratório de Veterinária de Évora
Quinta do Pomarinho - Estrada das Alcaçovas, Km9
7000-090 ÉVORA | Tel.: 266 752 028
Contacto: patricio.nuncio@iniav.pt

4- Coruche - FENCAÇA
Rua 25 de Abril, Lote 20, Cave B, 2100-126 CORUCHE| Tel.:243675519
Contactos: sede@fencaca.pt; presidente@fencaca.pt

5 - Terras de Bouro –ICNF- Parque Nacional da Peneda Gerês
Centro de Educação Ambiental do Vidoeiro, Lugar do Vidoeiro, 99
4845-081 GERÊS | Tel.: 253 390 110
Horário: preferencialmente entre as 10:00 – 17:00
Contacto: lino.goncalves@icnf.pt

6 - Vila Real – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Norte
Centro de Informação e Interpretação do Parque Natural do Alvão
Largo dos Freitas | 5000-528 VILA REAL | Tel.: 259 302 830
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contactos: albertina.rosa@icnf.pt ; paula.duarte@icnf.pt

7 - Bragança – ICNF-Sede do Parque Natural de Montesinho
Parque Florestal | 5300-000 BRAGANÇA | Tel.: 273 329 135
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: jose.rosa@icnf.pt

8 - Bragança –ICNF- Delegação do Parque Natural do Douro Internacional
Av. Do Sabor, 49-1º | 5200-204 Mogadouro |Tel.: 279 341 596
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: susana.marques@icnf.pt

9- Viseu-ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Quinta do Soqueiro, Rua Cónego António Barreiros | 3500-093 VISEU
Tel.: 232 427 510
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: isabel.rodrigues@icnf.pt

10 - Manteigas –ICNF- Parque Natural da Serra da Estrela
Rua 1.º de Maio, 2 | 6260-101 MANTEIGAS |Tel.: 275 980 060
Fax: 275 980 069
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: antonio.borges@icnf.pt

11 - Sabugal – ICNF-Reserva Natural da Serra da Malcata
Centro de Educação Ambiental da Sra. da Graça,
Bairro da Sra. da Graça | 6320-052 Aldeia de Sto. António – SABUGAL
Tel.: 271 754 425 | Fax: 271 752 825
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: laura.saloio@icnf.pt

12 - Coimbra –ICNF- Mata Nacional do Choupal
3000-611 COIMBRA | Tel.: 239 855 660 | Fax: 239 855 699
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: pedro.ramalheira@icnf.pt

13 - Castelo Branco – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Av. do Empresário, Praça NERCAB | 6000-767 CASTELO BRANCO
Tel.: 272 348 140 | Fax: 272 000 503
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: celia.teixeira@icnf.pt

14 - Santarém – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas de Lisboa e Vale do Tejo
Cnema, Quinta das Cegonhas, Aparatado 59 | 2001-901 Santarém
Tel.: 243 306 530
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: luis.silva@icnf.pt

15- Portalegre- ICNF- Sede do Parque Natural da Serra de São Mamede
Rua Augusto César de Oliveira Tavares, 23-r/c| 7300-126 PORTALEGRE
Tel.: 245 309 189
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: rui.correia@icnf.pt

16 - Vila Nova de Santo André – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Passeio da Fraternidade, Bairro Azul, Coletiva C4, r/c Dto. - Apartado 98 | 7500-100 VILA NOVA DE SANTO ANDRÉ
Tel.: 269 708 400
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contacto: duarte.nuno@icnf.pt

17 – Beja – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
R. de S. Sebastião - Apartado 6121 | 7801-908 BEJA
Tel.: 284 311 500 - Fax: 284 389 544
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: raquel.ventura@icnf.pt

18 - Mértola –ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Parque Natural do Vale do Guadiana, R. D. Sancho II, 15 | 7750-350 MÉRTOLA
Tel.: 286 612 016 | Fax: 286 610 099
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: teresa.silva@icnf.pt

19- Olhão - Quelfes – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Algarve
Centro de Educação Ambiental de Marim – Quelfes | 8700-194 OLHÃO |Tel.: 289 700 210
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: nuno.grade@icnf.pt

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS EM PORTUGAL
(Despacho nº 4757/2017 de 31 de Maio)

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA PARA EXAME VIROLÓGICO E SEROLÓGICO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS LEPORÍDEOS

REMETENTE

Nome:

Contacto (telefone/telemóvel): E-mail:

Caçador: Gestor: Guarda: Outro:

LOCAL

Localidade:

Freguesia: Concelho: Distrito:

Coordenadas GPS: Latitude Longitude

Zona de Caça: Número Nome

Tipo de Zona de Caça: Associativa Municipal Turística Nacional Outro local:

INFORMAÇÃO SOBRE O CADÁVER ENCONTRADO / ANIMAL CAÇADO

Data de recolha da amostra:

Identificação do cadáver (Código da Zona de Caça | Número de cadáver):

Espécie: Coelho-bravo Coelho doméstico Lebre

Género: Macho Fêmea Faixa Etária: Adulto Juvenil

Ocorrência: Encontrado Morto Caçado Atropelado Outra situação:

Material colhido: Cadáver Caçado: Fígado Baço Sangue Duodeno Fezes

Presença de: Sangue nos orifícios naturais Sinais de mixomatose (edema, mixomas)

Presença de Parasitas: Pulgas Carraças Ténias Cisticercos (vesículas na cavidade abdominal)

Nemátodos (lombrigas) Manchas brancas no fígado Manchas brancas na superfície do intestino

Observou a presença de outros cadáveres? Não Sim Quantos?

Outras observações:

Data de preenchimento do formulário:

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 36
1 agosto 2018

Morte de Lebres em Espanha com suspeita de Mixomatose (Provincias da Andalucía e Castilla-La Mancha, julho 2018).

A mixomatose é uma doença de origem viral que afeta o coelho, induzindo frequentemente mixomas cutâneos, mas podendo também causar morte antes do aparecimento de quaiquer sinais clínicos. Em Portugal, o virus da mixomatose tem vindo a ser detetado tanto em cadáveres de coelho-bravo encontrados no campo, como em coelhos caçados na última época venatória 2017/2018, sendo esta monitorização efetuada no âmbito da vigilância sanitária das populações de coelho-bravo enquadrada no projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral".

Os surtos de mixomatose são frequentemente sazonais, associados à maior abundância de insetos hematófagos que transmitem o virus de forma mecânica.

Até agora, a mixomatose só tinha sido reportada muito exporadicamente em lebres (França, Irlanda e Grã-Bretanha), sendo considerada uma doença de coelhos.

De acordo com a notícia recentemente publicada na Revista espanhola *JARA Y SEDAL*, intitulada "Confirmado: as análises confirmam que as lebres estão a morrer de mixomatose", o Serviço de Vigilância Epidemiológica do Ministério do Meio Ambiente da Junta de Andaluzia, divulgou os resultados das primeiras duas amostras de lebres vitimizadas com sinais clínicos de mixomatose. As lebres foram positivas para o vírus da doença de mixomatose pesquisado por metodologias moleculares (PCR), embora não seja excluída a possibilidade da morte destes animais ser causada por um agente tóxico ainda não identificado.

Esta mortalidade inesperada em lebres tem sido verificada nas comunidades autónomas da Andalucía (Províncias de Córdoba e Jaén) e Castilla-La-Mancha, no decurso da última quinzena de julho, em locais agrícolas diversificados

Morte de Lebres em Espanha com suspeita de Mixomatose (Provincias da Andalucía e Castilla-La Mancha, julho 2018).

(olival, amendoal, cultura de melões, vinha) de várias zonas de caça, sempre acompanhada de sinais de cegueira e fraqueza.

Contudo, as autoridades espanholas advertiram que estes resultados são ainda provisórios, estando ainda em curso outras análises laboratoriais, assim como a recolha e investigação dos dados epidemiológicos, a fim de ser determinada a causa da mortalidade dessa espécie nas áreas afetadas.

As lesões e sinais reportados nas lebres incluem lesões oculares, edema ou inflamação das pálpebras, conjuntivite e inflamação da região perianal.



Imagem retirada de artigo da revista "Jara y Sedal", 30/7/2018 | Redacción JyS

.

Embora à data não tenha sido reportada mortalidade em lebres em Portugal, a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), autoridade nacional em saúde animal e o grupo +Coelho, do qual é parceira, entendem ser importante disponibilizar algumas recomendações, caso se verifique mortalidade em lebres no nosso território:

- Deve ser reportada ao Grupo de Trabalho +Coelho (maiscoelho@iniav.pt) a presença de lebres doentes ou cadáveres. Os cidadãos sem formação não devem manipular os animais;
- Estes animais não devem ser consumidos em quaisquer circunstâncias;
- Evitar o contacto dos animais suspeitos com cursos de água naturais ou pontos de abeberamento;
- Os cadáveres deverão ser recolhidos seguindo procedimentos de higiene e biossegurança, de acordo com a metodologia disponibilizada no *banner* +Coelho (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_colheita.pdf e http://www.iniav.pt/gca/?id=1822), utilizando-se para isso os kits disponibilizados pelo INIAV e a rede de recolha e conservação, consultável no site do Projeto +Coelho. Caso não tenha disponíveis kits

Morte de Lebres em Espanha com suspeita de Mixomatose (Provincias da Andalucía e Castilla-La Mancha, julho 2018).

de recolha, recolher o cadáver para um saco de plástico e colocar esse dentro de outro, utilizando sempre luvas descartáveis (podem ser luvas de cozinha ou outras, que depois devem ser eliminadas através de colocação dentro do segundo saco); manter o cadáver refrigerado (evitar congelação);

- Solicitar ao INIAV o envio de kits para eventuais recolhas posteriores;
- Nos Centros de recolha, os espécimes devem ser refrigerados até à sua entrega nos Laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal no INIAV;
- Se a(s) lebre(s) estiver(em) ainda viva(s), deve(m) ser capturada(s) [colocada(s) dentro de uma caixa (de preferência, caixa de plástico com arejamento, para que possa ser convenientemente limpa e desinfetada)], com vista ao seu envio rápido para os Laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal no INIAV; neste caso, o INIAV deve ser imediatamente contactado telefonicamente (214403500);
- Em Zonas de Caça onde se verifique mortalidade de lebres, é essencial que **não se movimentem animais** (captura, translocação, repovoamento), mesmo que aparentemente saudáveis, por forma a evitar-se uma possível propagação do(s) agente responsável(eis) por doença em lebres.

Adverte-se para a necessidade de intensificação da vigilância ativa das Zonas de Caça ainda antes do início da época venatória, através da prospeção e recolha de cadáveres no campo, cumprindo os procedimentos de higiene e biossegurança recomendados.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 84
6 setembro 2019

Recomendações práticas para a redução da transmissão da mixomatose em lebre-ibérica

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, constante na lista da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE). O seu agente causal, o vírus da mixomatose, infeta apenas leporídeos não constituindo, por isso, uma ameaça à saúde pública.

Por esta razão, **a recolha dos animais mortos (coelhos e lebres) encontrados no campo não constitui um risco para o operador**, devendo, no entanto, ser sempre acautelado o **cumprimento de cuidados básicos**, descritos no Protocolo disponibilizado no Banner +Coelho (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**).

Estes cuidados incluem a utilização de uma luva (ou saco de plástico onde a mão é enfiada, em alternativa) para a manipulação do cadáver, aquando da sua colocação em outro saco, para evitar o contato direto com o animal. Relembramos que a anotação do local e dia da recolha é fundamental para a subsequente utilização dos dados sanitários no seu contexto epidemiológico (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf**).
Desde outubro de 2018, verifica-se mortalidade crescente em lebres provenientes de todos os distritos localizados a sul do Tejo, devido a infeção pelo vírus da mixomatose, um vírus geneticamente diferente do que circula em coelhos.

Uma vez que as medidas de biosegurança que se podem implementar no campo ficam muito aquém daquelas que permitem o controlo da doença na indústria, **apela-se a todos os caçadores, gestores, proprietários rurais e demais interlocutores para reforçarem os seus esforços no que toca à implementação de um conjunto de medidas de boas práticas**, que, em conjunto, contribuirão

para desacelerar a transmissão deste vírus entre os animais e reduzir a sua disseminação pelos territórios ainda não afetados.

MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES

1. Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;

2. Recolha dos cadáveres de lebres, segundo procedimento (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**) adequado e seu envio para os pontos de recolha (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/pontos_entrega_22nov2018.pdf**), que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho;

3. Eliminação dos exemplares que não possam ser enviados para o laboratório, através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

4. Adoção de medidas de higiene, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, nas zonas de caça afetadas;

5. Limpeza e desinfeção periódica dos bebedouros;

6. Evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico, para evitar contaminação de solos, e subsequente eliminação dos subprodutos através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

7. Controlo de vetores (através de armadilhas para insetos), quando possível;

8. Não movimentação (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de áreas afetadas (link para notícia 81);

9. Não introdução no território nacional de coelhos-bravos e de lebres oriundas de outros Estados Membros sem a respetiva certificação sanitária.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos Leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 84
6 setembro 2019

Recomendações práticas para a redução da transmissão da mixomatose em lebre-ibérica

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, constante na lista da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE). O seu agente causal, o vírus da mixomatose, infeta apenas leporídeos não constituindo, por isso, uma ameaça à saúde pública.

Por esta razão, **a recolha dos animais mortos (coelhos e lebres) encontrados no campo não constitui um risco para o operador**, devendo, no entanto, ser sempre acautelado o **cumprimento de cuidados básicos**, descritos no Protocolo disponibilizado no Banner +Coelho (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**).

Estes cuidados incluem a utilização de uma luva (ou saco de plástico onde a mão é enfiada, em alternativa) para a manipulação do cadáver, aquando da sua colocação em outro saco, para evitar o contato direto com o animal. Relembramos que a anotação do local e dia da recolha é fundamental para a subsequente utilização dos dados sanitários no seu contexto epidemiológico (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf**).
Desde outubro de 2018, verifica-se mortalidade crescente em lebres provenientes de todos os distritos localizados a sul do Tejo, devido a infeção pelo vírus da mixomatose, um vírus geneticamente diferente do que circula em coelhos.

Uma vez que as medidas de biosegurança que se podem implementar no campo ficam muito aquém daquelas que permitem o controlo da doença na indústria, **apela-se a todos os caçadores, gestores, proprietários rurais e demais interlocutores para reforçarem os seus esforços no que toca à implementação de um conjunto de medidas de boas práticas**, que, em conjunto, contribuirão

para desacelerar a transmissão deste vírus entre os animais e reduzir a sua disseminação pelos territórios ainda não afetados.

MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES

1. Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;

2. Recolha dos cadáveres de lebres, segundo procedimento (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf**) adequado e seu envio para os pontos de recolha (**http://www.iniav.pt/fotos/editor2/pontos_entrega_22nov2018.pdf**), que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho;

3. Eliminação dos exemplares que não possam ser enviados para o laboratório, através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

4. Adoção de medidas de higiene, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, nas zonas de caça afetadas;

5. Limpeza e desinfeção periódica dos bebedouros;

6. Evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico, para evitar contaminação de solos, e subsequente eliminação dos subprodutos através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

7. Controlo de vetores (através de armadilhas para insetos), quando possível;

8. Não movimentação (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de áreas afetadas (link para notícia 81);

9. Não introdução no território nacional de coelhos-bravos e de lebres oriundas de outros Estados Membros sem a respetiva certificação sanitária.

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos Leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

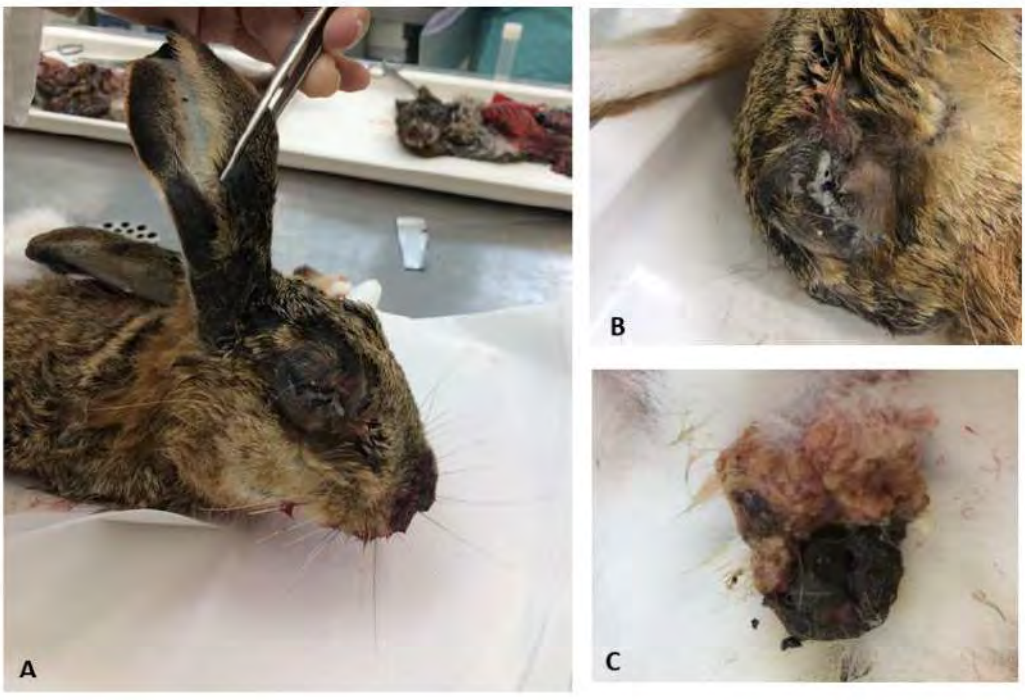
Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 55
8 novembro 2018

Detetado o primeiro caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

No âmbito da vigilância sanitária do Projeto +Coelho, que decorre desde agosto de 2017, foi ontem confirmado no **Laboratório de Virologia do INIAV I.P.**, em Oeiras, por testes moleculares, o diagnóstico de **mixomatose numa lebre caçada** no dia 28 de Outubro de 2018, em zona de caça do concelho de Évora.
Durante essa jornada, foram também caçadas duas lebres aparentemente saudáveis.

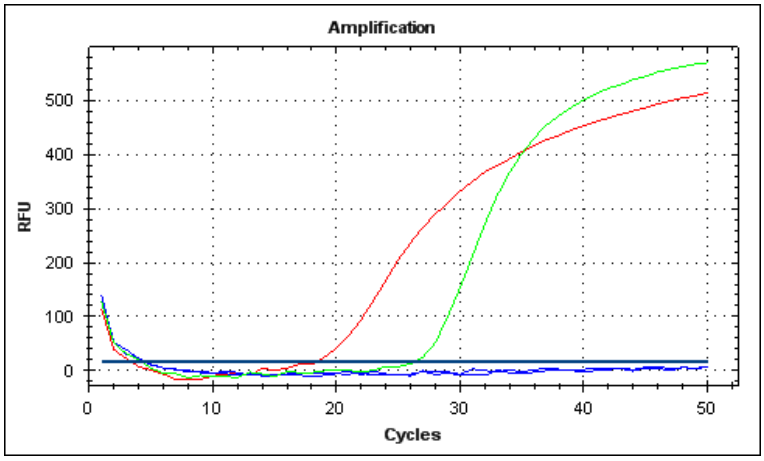
O animal em causa, uma fêmea adulta com boa condição corporal, apresentava conjuntivite purulenta, edema das pálpebras e das regiões anal e vulvar.



Necrópsia da lebre Ibérica recolhida em Évora, realizada na sala de anatomopatologia do INIAV I.P., em Oeiras. **A** e **B** - edema das pálpebras e conjuntivite purulenta bilaterais. **C** - edema da região perineal

Detetado o primeiro caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

O diagnóstico laboratorial, baseado na amplificação de um gene localizado em ambos os extremos do genoma viral (*M0005R/L*), unicamente presente no vírus da mixomatose, permitiu confirmar as suspeitas de doença que as lesões macroscópicas sugeriam.



Traçado do PCR em tempo real do diagnóstico molecular de mixomatose, realizado nos mixomas da lebre Ibérica (curva a vermelho). As curvas a verde e a azul correspondem, respetivamente, ao controlo positivo e aos controlos negativos do ensaio.

Trata-se, pois, do primeiro caso de mixomatose em lebre Ibérica (*Lepus granatensis*) em Portugal, confirmado em laboratório. A doença já tinha sido amplamente reportada em lebre Ibérica, em Espanha, e em lebre Europeia (*Lepus europaeus*), no Reino Unido.

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, que não tem importância para a saúde pública. A doença nesta lebre foi notificada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), autoridade nacional para as doenças dos animais.

O Grupo de trabalho +Coelho e a DGAV recomendam, na sequência deste caso, o **reforço das medidas de vigilância, nomedamente a propeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nas zonas de caça do concelho de Évora**.

Os **cadáveres de lebres devem ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do projeto +Coelho** ou devem **ser eliminados através de enterramento**, após cobertura com **cal viva**, ou encaminhados para **unidade de tratamento de subprodutos** aprovada.

Detetado o primeiro caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

Importa ainda reforçar a adoção de medidas de higiene e de prevenção da transmissão desta doença, nomeadamente a **desinfeção do calçado, dos equipamentos (incluindo bebedouros) e das rodas dos veículos** nas zonas de caça, bem como a evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico para evitar contaminação de solos.

Aconselha-se ainda, sempre que possível, **o controlo de vetores**, sendo neste momento **desaconselhada a suplementação de alimento**, como forma de desfavorecer a proximidade entre animais.

É também **desaconselhada a movimentação** (largadas, captura, translocação, repovoamento) de **lebres e de coelho-bravo provenientes da área afetada** (concelho de Évora).

O Grupo de Trabalho +Coelho e a DGAV alertam ainda para a importância de não se introduzir no território nacional coelhos-bravos e lebres oriundas de outros Estados Membros, sem a respetiva certificação sanitária.



REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 48
19 Outubro 2018

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido



Fotografia de Russel Savory, publicada no Halestead Gazette, a 18 de outubro de 2018.

No passado **dia 1 de agosto** divulgámos o registo de mortalidade, verificada durante o mês de julho 2018 (Notícia 36) em **Lebres**, nas comunidades autónomas da Andaluzia e Castilla-La Mancha, localizadas respetivamente na região no sul e centro de Espanha.
As Lebres (pertencentes à espécie *Lepus granatensis*) encontradas mortas, apresentavam lesões compatíveis com mixomatose mas, na altura, não foi excluído que outras causas, por exemplo tóxicas, pudessem ter coadjuvado na morte desses animais.

Mais recentemente, **a 14 de outubro**, foi publicado, no Jornal ***Independent*** do Reino Unido, um artigo intitulado "*Brown Hares could face extinction after*

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido

mysterious deaths indentified as myxomatosis" (Lebre Castanha em perigo de extinção depois de mortes misteriosas atribuídas a mixomatose).
Esta publicação sucedeu a outras sobre a mesma matéria, publicadas na **BBC News**, no **The Telegraph** e no **East Anglia Daily Times**, reportando avistamentos de lebres doentes ou mortas especialmente na região de Bungay, no distrito de Suffolk, na costa leste de Inglaterra.

Embora as publicações anteriores referissem a mixomatose e a doença hemorrágica dos coelhos como possiveis causas de mortalidade no Reino Unido, acautelavam a necessidade de confirmação laboratórial para um diagnóstico definitivo.

O Jornal *Independent* divulga agora que as lesões macroscópicas, evidenciadas nas fotografias enviadas para a *Universidade of East Anglia*, sugerem que os animais mortos tenham sido vitimizados pelo **vírus da mixomatose**.

A revista Halestead Gazette reportou também, a **18 de outubro**, o primeiro caso de mortalidade de Lebre Castanha Europeia (*Lepus europaeus*) verificada perto da cidade de Halstead (condado de Essex, localizado a sul do condado de Suffolk), atribuído também a mixomatose.
O potencial impacto deste surto nas populações de lebres da costa oriental de Inglaterra é visto com grande apreensão uma vez que estas populações são atualmente residuais, comparativamente às densidades que se verificaram no passado. Qualquer epizootia grave pode, portanto, levar ao desaparecimento rápido da Lebre Europeia naquelas regiões.

A Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos e a Mixomatose são doenças de Declaração Obrigatória para OIE (Organização Mundial para a Saúde Animal). Enquanto se aguardam os resultados laboratoriais oficiais, os dados epidemiológicos preliminares e as lesões macroscópicas observadas pelos operadores no terreno, e registadas em fotografias, apontam para que a mortalidade de Lebres em Inglaterra seja também devida a mixomatose.

Morte de Lebres em Espanha e no Reino Unido

A confirmar-se, a ocorrência de mortalidade notória em **Lebre** causada por mixomatose, em dois países geograficamente separados (Espanha e Reino Unido), num intervalo temporal relativamente curto (4 meses), sugerem a que o vírus da mixomatose **possa ter alargado o seu espectro de hospedeiros**, adquirindo a capacidade de infetar duas espécies de Lebre (*Lepus granatensis e Lepus europaeus*) com a facilidade com que infeta o coelho. Estes registos recentes contrastam com a rara observação de mixomatose em Lebres, desde a sua emergência no final do século IXX.

Enquanto as causas de mortalidade de Lebres são definitivamente esclarecidas, reforçamos a importância do cumprimento das recomendações, listadas na Notícia 36.

Entre elas, destacamos a necessidade de **intensificação da vigilância ativa** das Zonas de Caça, através da **prospeção de lebres e coelhos-bravos doentes, moribundos ou já cadáver**, a **recolha** destes animais para que não constituam fontes de infeção para animais saudáveis (sempre no cumprindo os procedimentos de higiene e biossegurança recomendados), e o seu **envio** para os Laboratórios de Referência do INIAV (Oeiras).

Reforçamos o pedido de **alerta imediato ao Grupo de Trabalho +Coelho** (maiscoelho@iniav.pt) sempre que houver evidências de presença de lebres e coelhos doentes ou mortos no campo e agradecemos desde já a todos o esforço acrescido que possam dispensar a este assunto.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES

Face à mortalidade elevada que se tem verificado em lebre-ibérica desde outubro de 2018, solicita-se a melhor colaboração de gestores, caçadores, proprietários rurais e demais utilizadores dos territórios rurais, para a adoção de um conjunto de medidas abaixo identificadas que, coletivamente, contrubiem para a redução da disseminação da doença e seu controlo.



Lebre com mixomatose (20 set 2019
Fotografia de Fábio Abade Santos)

1) Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo **aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres** e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;

2) **Recolha dos cadáveres de lebres**, utilizando *Kit Envelope* (disponibilizado pelas Organizações do Setor da Caça ou solicitado ao INIAV);

Procedimento:
- Abrir o saco de plástico transparente;
- Calçar uma luva;
- Pegar no cadáver com a mão protegida pela luva e colocá-lo dentro do saco de plástico transparente. Introduzir também a luva suja (virada do avesso) e fechar o saco com o elástico;
- Colocar este saco com o cadáver dentro do saco de plástico colorido (amarelo ou vermelho);
- Introduzir a Ficha de Identificação do material preenchida, dobrada e colocada dentro da bolsa, também dentro do saco vermelho e fechar com nó;



Kit Envelope para colheita de cadáver

Esta recolha pode também ser efetuada utilizando-se *sacos de plástico* e uma folha de papel, na indisponibilidade de Kit Envelope;

Procedimento alternativo:
- Abrir um saco de plástico 1 (interior);
- Introduzir a mão num outro saco de plástico que funciona como luva;
- Pegar no cadáver com a mão protegida e colocá-lo dentro do saco de plástico 1. Nele introduzir também a o saco "luva" e fechá-lo com um nó;
- Colocar este saco com o cadáver dentro de um outro saco de plástico 2 (exterior);
- Introduzir uma folha com a Identificação do material (dia e local de colheita, Zona de Caça, Distrito, nome e email do operador) também dentro do saco 2, e fechá-lo com nó. Pode ser feito o download da ficha de ID em http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf;

A **entrega dos cadáveres** deve ser feita nos **pontos de recolha** que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho, assinalados no verso desta folha. Caso não efetue a entrega de imediato, se possível, congelar o cadáver (-20ºC) até à sua entrega;

3) **Eliminação dos exemplares** que não possam ser enviados para o laboratório, através de **enterramento, após cobertura com cal viva**, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

4) Adoção de **medidas de higiene**, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, aquando da saída das zonas de caça;

5. **Limpeza e desinfeção** periódica dos **bebedouros**;

MEDIDAS PRÁTICAS PARA REDUZIR A TRANSMISSÃO DA MIXOMATOSE ENTRE LEBRES

6. **Evisceração de animais** em ato venatório **sobre um plástico**, para evitar contaminação de solos, e subsequente **eliminação dos subprodutos** através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

7. **Controlo de vetores** (através de armadilhas para insetos), quando possível;

8. **Não movimentação** (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de **áreas afetadas**;

9. **Não introdução** no território nacional de coelhos-bravos e de lebres oriundas de **outros Estados Membros** sem a respetiva certificação sanitária.

PONTOS DE ENTREGA DE MATERIAL BIOLÓGICO

1 – Oeiras - INIAV - Sede - *Campus* Oeiras
Av. da República, Quinta do Marquês | 2780 - 157 OEIRAS
Tel.: 214 403 500
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: maiscoelho@iniav.pt ; margarida.duarte@iniav.pt

2 – Vairão - INIAV- Laboratório Nacional de Referência de Segurança Alimentar
Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena
4485-655 Vairão - VILA DO CONDE | Tel.: 252 660 600
Horário: 9:00 – 16:00
Contacto: zulmira.lopes@iniav.pt;

3 – Évora - Laboratório de Veterinária de Évora
Quinta do Pomarinho - Estrada das Alcaçovas, Km9
7000-090 ÉVORA | Tel.: 266 752 028
Contacto: patricio.nuncio@iniav.pt

4- Coruche - FENCAÇA
Rua 25 de Abril, Lote 20, Cave B, 2100-126 CORUCHE| Tel.:243675519
Contactos: sede@fencaca.pt; presidente@fencaca.pt

5 - Terras de Bouro –ICNF- Parque Nacional da Peneda Gerês
Centro de Educação Ambiental do Vidoeiro, Lugar do Vidoeiro, 99
4845-081 GERÊS | Tel.: 253 390 110
Horário: preferencialmente entre as 10:00 – 17:00
Contacto: lino.goncalves@icnf.pt

6 - Vila Real – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Norte
Centro de Informação e Interpretação do Parque Natural do Alvão
Largo dos Freitas | 5000-528 VILA REAL | Tel.: 259 302 830
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contactos: albertina.rosa@icnf.pt ; paula.duarte@icnf.pt

7 - Bragança – ICNF-Sede do Parque Natural de Montesinho
Parque Florestal | 5300-000 BRAGANÇA | Tel.: 273 329 135
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: jose.rosa@icnf.pt

8 - Bragança –ICNF- Delegação do Parque Natural do Douro Internacional
Av. Do Sabor, 49-1º | 5200-204 Mogadouro |Tel.: 279 341 596
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: susana.marques@icnf.pt

9- Viseu-ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Quinta do Soqueiro, Rua Cónego António Barreiros | 3500-093 VISEU
Tel.: 232 427 510
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: isabel.rodrigues@icnf.pt

10 - Manteigas –ICNF- Parque Natural da Serra da Estrela
Rua 1.º de Maio, 2 | 6260-101 MANTEIGAS |Tel.: 275 980 060
Fax: 275 980 069
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: antonio.borges@icnf.pt

11 - Sabugal – ICNF-Reserva Natural da Serra da Malcata
Centro de Educação Ambiental da Sra. da Graça,
Bairro da Sra. da Graça | 6320-052 Aldeia de Sto. António – SABUGAL
Tel.: 271 754 425 | Fax: 271 752 825
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: laura.saloio@icnf.pt

12 - Coimbra –ICNF- Mata Nacional do Choupal
3000-611 COIMBRA | Tel.: 239 855 660 | Fax: 239 855 699
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: pedro.ramalheira@icnf.pt

13 - Castelo Branco – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Centro
Av. do Empresário, Praça NERCAB | 6000-767 CASTELO BRANCO
Tel.: 272 348 140 | Fax: 272 000 503
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: celia.teixeira@icnf.pt

14 - Santarém – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas de Lisboa e Vale do Tejo
Cnema, Quinta das Cegonhas, Aparatado 59 | 2001-901 Santarém
Tel.: 243 306 530
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: luis.silva@icnf.pt

15- Portalegre- ICNF- Sede do Parque Natural da Serra de São Mamede
Rua Augusto César de Oliveira Tavares, 23-r/c| 7300-126 PORTALEGRE Tel.: 245 309 189
Horário: 10:00 - 12:00 e das 14:00 - 16:00
Contacto: rui.correia@icnf.pt

16 - Vila Nova de Santo André – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Passeio da Fraternidade, Bairro Azul, Coletiva C4, r/c Dto. - Apartado 98 | 7500-100 VILA NOVA DE SANTO ANDRÉ
Tel.: 269 708 400
Horário: 9:00 - 12:30 e das 14:00 - 17:00
Contacto: duarte.nuno@icnf.pt

17 – Beja – ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
R. de S. Sebastião - Apartado 6121 | 7801-908 BEJA
Tel.: 284 311 500 - Fax: 284 389 544
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: raquel.ventura@icnf.pt

18 - Mértola –ICNF- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo
Parque Natural do Vale do Guadiana, R. D. Sancho II, 15 | 7750-350 MÉRTOLA
Tel.: 286 612 016 | Fax: 286 610 099
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: teresa.silva@icnf.pt

19- Olhão - Quelfes – ICNF-Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Algarve
Centro de Educação Ambiental de Marim – Quelfes | 8700-194 OLHÃO |Tel.: 289 700 210
Horário: 9:00 - 13:00 e das 14:00 - 17:30
Contacto: nuno.grade@icnf.pt

O Grupo de Trabalho +Coelho agradeça a colaboração de todos para a preservação desta espécie (Lepus granatensis) tão icónica do nosso país.

18 de setembro de 2019

Projeto "+COELHO2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos Leporídeos silvestres em Portugal", financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 7
21 novembro 2017

Deteção da Circulação do Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos em Almeirim

No âmbito da vigilância sanitária das populações de coelho-bravo, prevista no Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio) e no projeto *"+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral"*, o grupo +Coelho detetou, por métodos moleculares, a presença da nova variante do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) num cadáver de coelho-bravo encontrado na Zona de Caça Municipal das Freguesias de Fazendas de Almeirim, Raposa e Alpiarça, concelho de Almeirim, distrito de Santarém, indiciando a circulação do vírus na área. O cadáver foi remetido pela Fencaça, chegando aos Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal do INIAV, em Oeiras, no dia 9 de novembro de 2017. O exame anatomopatológico indicou boa condição corporal (1,3 kg), sinais de congestão pulmonar e descoloração hepática ligeira.

Faz-se notar que o vírus pode ser excretado na urina, fezes e secreções nasais dos animais infetados, sendo as principais vias de infeção a oro-nasal e a conjuntival. Assim, os animais saudáveis podem infetar-se pelo contato direto com animais infetados assintomáticos ou doentes, mas também com cadáveres ou com fluidos (sangue, urina, etc) contendo o vírus, presentes no meio ambiente.

Recomendações para as áreas afetadas pelo Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Na sequência destes resultados, o grupo +Coelho recomenda, uma vez mais, o reforço de medidas de biossegurança (listadas na página seguinte), face à elevada resistência do vírus e consequente persistência no meio ambiente por longos períodos, por forma a minimizar a propagação a outros animais e áreas geográficas.

Recomendações para as áreas afetadas pelo Vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Para evitar a contaminação ambiental e a disseminação de RHDV2, listam-se algumas recomendações para as áreas onde seja confirmada a sua circulação:

1) Intensificação da prospeção de mortalidade e remoção sistemática dos cadáveres encontrados, para diminuição da transmissão; todos os cadáveres deverão ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do plano de ação: http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_pontosdeentrega.pdf
2) Desinfeção semanal com desinfetantes aprovados dos bebedouros, se existentes;
3) Interrupção da suplementação de alimento, por forma a desfavorecer a proximidade entre animais;
4) Evisceração dos animais em ato venatório sobre um plástico, por forma a evitar pingos de sangue no chão;
5) Desinfeção das solas das botas, equipamentos robustos e rodas dos veículos através de pedilúvios ou rodilúvios, com desinfetantes aprovados, antes da saída da Zona de Caça afetada, tendo em conta a possibilidade de transporte mecânico do vírus através de cães, pessoas, equipamentos e veículos contaminados;
6) Controlo de vetores nas aberturas das tocas, uma vez que o vírus pode ser disseminado mecanicamente por insetos;
7) As áreas conhecidas como afetadas devem ser as últimas a ser percorridas na jornada de caça. Neste caso, todos os animais caçados deverão ser amostrados e as amostras biológicas respetivas enviadas para o INIAV, através dos pontos de recolha.
8) Para reduzir a contaminação ambiental, importa proceder ao enterramento das vísceras de coelhos e lebres das áreas afetadas, em vala, previamente revestida com cal em pó ou hidratada, que também deve ser aplicada sobre os subprodutos, antes de serem cobertos por uma camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v) da alínea a) do artigo 8º do Reg. CE n.º 1069/2009] ou através de encaminhamento para empresa de tratamento de subprodutos.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Informações das atividades do GT +Coelho

|Número 56
14 novembro 2018

Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

Confirmámos recentemente o **diagnóstico positivo a mixomatose numa lebre encontrada morta**, em zona de caça do concelho de Beja, no dia 3 de novembro de 2018.

O macho adulto, com boa condição corporal, apresentava conjuntivite e lesões nodulares nas pálpebras e focinho.



Exame externo de um exemplar da lebre Ibérica recolhido em Beja. **A-** Edema dos lábios e focinho **B** - Edema e inflamação das pálpebras

Este é o segundo caso de mixomatose em lebre Ibérica (*Lepus granatensis*) em Portugal, confirmado no laboratório de Referência para a Saúde Animal (INIAV, I.P.). A doença tinha sido recentemente diagnosticada pela primeira vez numa lebre caçada em zona de caça do concelho de Évora.

A mixomatose é uma doença de declaração obrigatória, que não tem importância para a saúde pública. A doença nestas duas lebres foi já notificada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), autoridade nacional para as doenças dos animais.

Detetado o segundo caso de Mixomatose em lebre Ibérica em Portugal, confirmado por análise laboratorial

O Grupo de trabalho +Coelho e a DGAV recomendam, na sequência destes casos, o **reforço das medidas de vigilância, nomedamente a propeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nas zonas de caça do concelho de Évora e de Beja**.

Os **cadáveres de lebres devem ser enviados para os pontos de recolha definidos no âmbito do projeto +Coelho** ou devem **ser eliminados através de enterramento**, após cobertura com **cal viva**, ou encaminhados para **unidade de tratamento de subprodutos** aprovada.

Importa ainda reforçar a adoção de medidas de higiene e de prevenção da transmissão desta doença, nomeadamente a **desinfeção do calçado, dos equipamentos (incluindo bebedouros) e das rodas dos veículos** nas zonas de caça, bem como a evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico para evitar contaminação de solos.

Aconselha-se ainda, sempre que possível, **o controlo de vetores**, sendo neste momento **desaconselhada a suplementação de alimento**, como forma de desfavorecer a proximidade entre animais.

É também **desaconselhada a movimentação** (largadas, captura, translocação, repovoamento) de **lebres e de coelho-bravo provenientes das áreas afetadas** (concelhos de Évora e Beja).

O Grupo de Trabalho +Coelho e a DGAV relembram que qualquer introdução em **território nacional de coelhos-bravos ou lebres oriundos de outros Estados Membros** deve obrigatoriamente ser **acompanhada da respetiva certificação sanitária**.

REPÚBLICA PORTUGUESA

+COELHO

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

Anexo VII-E

Comunicações Orais e em Póster em Congressos Científicos

Mixomatose, considerada uma doença de coelhos, emerge recentemente em lebre-ibérica: o que nos revela a histopatologia nestas duas espécies?

Fábio Abade dos Santos1,2*, Carina L. Carvalho1*, Madalena Monteiro1*, Paulo Carvalho1, Paula Mendonça1, Conceição Peleteiro2, Andreia Pinto3, Tânia Carvalho3, Jacinto Gomes1, Teresa Albuquerque1, Margarida D. Duarte1,2

*Equivalent contribution

1Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

2CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477

Lisboa

3Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa Av.

Professor Egas Moniz 1649-028 Lisboa Portugal.

A presença do vírus da mixomatose (MYXV) em lebres-ibéricas (*Lepus granatensis*) foi recentemente comprovada em laboratorio, confirmando-se as suspeitas face os sinais clínicos (edemas) observados.

Embora existissem já registos documentais de casos pontuais de mixomatose em lebre-europeia, e alguns testemunhos de avistamentos de lebre-ibérica com lesões sugestivas de mixomatose, este trata-se do primeiro grande surto verificado em lebre-ibérica.

A doença, associada mortalidade elevada, afeta atualmente vários distritos do sul do nosso país e mais de 15 Províncias de Espanha.

O diagnóstico laboratorial dos casos registados em Portugal é efetuado no Laboratório Nacional de Referência-INIAV, no âmbito da avaliação sanitária que decorre à escala nacional desde 2017 (Projeto +Coelho).

A ausência de mixomas cutâneos apresentou-se como a principal diferença relativamente à forma nodular de doença no coelho. A histopatologia revelou a presença de aspetos sobreponíveis aos observados no coelho, nomeadamente hiperplasia epidérmica moderada, degenerescência balonizante das células epiteliais, proliferação de células fusiformes e estelares circundadas por extensa matriz extracelular. No entanto,

verificaram-se evidências de maior malignidade das lesões histopatológicas em relação ao coelho, pela presença de células fusiformes adjacentes à epiderme ulcerada, com pleomorfismo moderado, núcleos grandes e cromatina densa. Constatou-se também extensa infiltração de células heterofílicas na derme.

O envolvimento do MYXV no desenvolvimento destas lesões está a ser esclarecido por hibridização in situ e imunohistoquímica.

A maior severidade da doença e das lesões induzidas em lebre pode estar relacionada com a passagem recente de barreira de espécie (coelho-lebre), contrapondo a uma co- evolução vírus-coelho com mais de 60 anos.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

Projeto +Coelho: Aproximação entre a comunidade científica e o sector da caça

Margarida Duarte*[1], Carina Carvalho[1], Fábio Santos[1], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Teresa Albuquerque[1], Teresa Fagulha[1], Pedro Esteves[2], Joana Abrantes [2], Ana Lopes[2], Pedro Monterroso[2], Nuno Santos[2], Ana Serronha[2], João Queirós[2], Paulo Célio Alves[2], Yolanda Vaz[3], Rita Amador[3], Patrícia Tavares Santos[3], Ana Hora[4], Gonçalo Lopes[4], Jacinto Amaro[5], Fernando Castanheira Pinto[6], João Carvalho[7], António Paula Soares[7], Mónica Cunha[1] & Nuno Canada[1]

[1]*Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), Oeiras, Portugal.*
[2]*CIBIO, Universidade do Porto, Vairão, Portugal.*
[3]*Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Lisboa, Portugal.*
[4]*Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Lisboa, Portugal.*
[5]*Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Coruche, Portugal.*
[6]*Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP). Macedo de Cavaleiros, Portugal.*
[7]*Assoc. Nac. Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Lisboa, Portugal.*
E-mail: margarida.duarte@iniav.pt

Palavras chave: coelho-bravo, lebre-ibérica, recuperação de populações, Plano Nacional.

O Ministério da Agricultura, Floresta e Desenvolvimento Rural determinou a constituição de uma parceria de 9 instituições para implementar uma estratégia de abordagem integrativa que contrariasse o efeito do vírus da doença hemorrágica do coelho 2 (RHDV2) no declínio abrupto das populações de coelhos selvagens em Portugal (despacho 4757/2017, 31 de maio). Este plano, intitulado *Plano de Ação para o Controlo do Vírus da Doença Hemorrágica de Coelho*, foi desenvolvido pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV IP), pela Autoridade Nacional de Saúde Veterinária (DGAV), pelo Instituto Nacional para Conservação (ICNF), dois institutos privados (CIBIO, OMV) e por organizações nacionais do sector da caça (FENCAÇA, ANPC e CNCP). O plano envolveu também a vigilância de DHC e mixomatose em coelhos e lebres. Os eixos do plano são 1) programa de Pesquisa, 2) práticas de gestão e 3) vigilância sanitária. Entre as linhas de investigação consta a identificação de espécimes naturalmente resistentes, a produção de uma vacina oral baseada em partículas de tipo viral visando aumentar a imunidade de populações selvagens à infeção por RHDV2 e o desenvolvimento de uma plataforma pública, informativa e interativa, com cartografia e informação estatística relacionada com os leporídeos disponibilizada em tempo real. Doze meses após a formulação do plano, estão a ser preparadas para implementação imediata, medidas práticas, nomeadamente, a suplementação nutricional com ração formulada para coelho-bravo em reservas de caça onde a comida natural seja escassa, a desparasitação de animais em áreas afetadas por altas cargas parasitárias, a identificação de populações resistentes com altos títulos de anticorpos para RHDV2 e a criação de santuários genéticos. O plano tem sido financiado pelo Fundo Florestal Permanente através de projetos anuais (http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos). O projeto +Coelho constitui um exemplo de interações produtivas e dinâmicas entre a comunidade científica e o setor da caça, e inspirou a criação do Centro de Competências para a Pesquisa e Sustentabilidade das Espécies Cinegéticas e Biodiversidade.

PLANO DE AÇÃO PARA O CONTROLO DA
DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DOS COELHOS

(Despacho nº 4757/2017, de 31 de maio do MAFDR)

REPÚBLICA PORTUGUESA



www.iniav.pt

Projeto +COELHO 1:
Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral (DHV)

Projeto +COELHO 2:
Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal

Financiados pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE:

FUNDO FLORESTAL PERMANENTE

O QUE É?

A **Doença Hemorrágica Viral (DHV)** é uma doença de origem viral causada por um Lagovirus da família ***Caliciviridae*** (**RHDV2**), altamente contagiosa, normalmente de evolução aguda e de desfecho fatal, que afeta os coelhos domésticos e selvagens. A DHV aguda causa a morte súbita, normalmente acompanhada por sangramento nasal, enquanto a doença de evolução sub-aguda ou crónica se caracteriza por icterícia generalizada e descoloração das orelhas, conjuntiva e mucosas, perda de peso e letargia.

As lesões observadas incluem alterações do fígado e hemorragia generalizada, com presença de sangue na cavidade abdominal.

A nova variante do vírus (RHDV2, também designado RHDVb ou GI.2) foi reportada em França em 2010 e em Portugal em 2012, estendendo-se a quase todo o território Português, causando elevada morbilidade e mortalidade.

O período de incubação pode variar de 1 a 5 dias, afetando animais de todas as faixas etárias.

A elevada resistência do vírus no meio ambiente e a facilidade com que é disseminado por vetores mecânicos e biológicos tornam o seu controlo extremamente difícil, apenas possível com uma abordagem multidisciplinar e integrada.

OBJETIVOS DO PLANO

1. Conhecer, monitorizar e controlar a mortalidade associada à Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos
2. Fomentar populações viáveis e autossustentáveis de coelho-bravo
3. Contribuir para o incremento das populações de coelho-bravo através de práticas de gestão adequadas e integradas
4. Aumentar a consciência social sobre a importância das boas práticas de gestão

EIXOS DE INTERVENÇÃO

Programa de Investigação → Medidas de Gestão → Vigilância Sanitária → Plano de Comunicação

ÁREAS DE INTERVENÇÃO



- MODELOS INTERATIVOS
- VACINA EM ISCO
- MELHORIA DA CONDIÇÃO GERAL DOS ANIMAIS (SUPLEMENTAÇÃO E DESPARASITAÇÃO)
- INSTRUMENTOS DE COMUNICAÇÃO, SENSIBILIZAÇÃO E DIVULGAÇÃO

CRIAÇÃO DE RESERVAS GENÉTICAS DAS ESPÉCIES AUTÓCTONES DE LEPORÍDEOS
- NÚCLEO DE COELHO-BRAVO
- NÚCLEO DE LEBRE-IBÉRICA
- CERCADOS DE REPRODUÇÃO MODELO

PREVISÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES MEDIDAS DE CONTROLO

SELEÇÃO DE SUB-POPULAÇÕES RESISTENTES
- IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA
- IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURALMENTE IMUNIZADAS

INCREMENTO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA Á INFEÇÃO

MANEIO| | GESTÃO
- DISPONIBILIZAÇÃO DE ABRIGO| ALIMENTAÇÃO
- CONTROLO DA PREDAÇÃO
- AÇÕES DE FISCALIZAÇÃO
- CERTIFICAÇÃO GENÉTICA
- DESENVOLVIMENTO DE RAÇÃO ESPECIFICAMENTE FORMULADA PARA COELHO-BRAVO

AUMENTO DA CONSCIÊNCIA SOCIAL DO SETOR E DA SOCIEDADE CIVIL

VIGILÂNCIA SANITÁRIA
- CERTIFICAÇÃO SANITÁRIA
- MONITORIZAÇÃO CONTINUA



GRUPO DE TRABALHO
+COELHO

EM AÇÃO DESDE AGOSTO DE 2017
ATIVIDADES E RESULTADOS CONSUNTÁVEIS EM:
http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos

Margarida Duarte [1], Carina Carvalho [1], Fábio Santos [1], Madalena Monteiro [1], Paulo Carvalho [1], Paula Mendonça [1], Teresa Albuquerque [1], Teresa Fagulha [1], Pedro Esteves [2], Joana Abrantes [2], Ana Lopes [2], Pedro Monterroso [2], Nuno Santos [2], Ana Serronha2 [2], João Queirós [2], Paulo Célio Alves [2], Yolanda Vaz [3], Rita Amador [3], Patrícia Tavares Santos [3], Ana Hora [4], Gonçalo Lopes [4], Jacinto Amaro [5], Fernando Castanheira Pinto [6], João Carvalho [7], António Paula Soares [7], Mónica Cunha [1] & Nuno Canada [1]

[1] *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. Oeiras, Portugal.* [2] *CIBIO, Universidade do Porto, Vairão, Portugal.*
[3] *Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Lisboa, Portugal.* [4] *Instituto da Conservação da Natureza e Florestas, Lisboa, Portugal.*
[5] *Federação Portuguesa de Caça, Coruche, Portugal.* [6] *Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses. Macedo de Cavaleiros, Portugal.*
[7] *Assoc. Nac. Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Lisboa, Portugal.*

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

Mixomatose emerge em lebre-ibérica após quase sete décadas a afetar várias espécies de coelho: as diferenças histopatológicas mais relevantes das lesões

***Fábio Abade dos Santos*[1,2*], Carina L. Carvalho[1*], Madalena Monteiro[1*], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Conceição Peleteiro[2], Andreia Pinto[3], Tânia Carvalho[3], Jacinto Gomes[1], Teresa Albuquerque[1] & Margarida D. Duarte[1,2]**

[1]*Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.*
[2]*CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*
[3]*Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*
**Contribuição equivalente*
E-mail: fabio.santos@ul.pt

Palavras chave: vírus da mixomatose, lebre ibérica, histopatologia, vida selvagem, barreira de espécie.

Surgiu recentemente, em agosto de 2018, um surto de mortalidade em lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) em Espanha e em outubro seguinte, em Portugal. Confirmou-se, no Laboratório Nacional de Referência-INIAV, por recurso a técnicas de biologia molecular, que o agente etiológico envolvido era o vírus da mixomatose (MYXV). Este rasteiro decorre no âmbito da avaliação sanitária que decorre à escala nacional desde 2017 (projeto +Coelho). A especificidade do MYXV para várias espécies de coelho, é conhecida há décadas, embora existam registos muito pontuais de doença na lebre-europeia. Associada a mortalidade elevada e morbilidade desconhecida, a doença afeta atualmente vários distritos do sul do nosso país e mais de 15 províncias de Espanha. Ao exame macroscópico, a ausência de mixomas cutâneos apresentou-se como a principal diferença relativamente à forma nodular de doença no coelho. A histopatologia revelou a presença de aspetos sobreponíveis aos observados no coelho, nomeadamente hiperplasia epidérmica moderada, degenerescência balonizante das células epiteliais, proliferação de células fusiformes e estelares circundadas por extensa matriz extracelular. No entanto, verificaram-se evidências de maior malignidade das lesões histopatológicas em relação ao coelho, pela presença de células fusiformes adjacentes à epiderme ulcerada, com pleomorfismo moderado, núcleos grandes e cromatina densa. Constatou-se também extensa infiltração de células heterofílicas na derme. No entanto está a ser esclarecido o eventual contributo neste quadro lesional de outros agentes patogénicos, nomeadamente bacterianos, através de técnicas como hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Os dados epidemiológicos e histopatológicos sugerem que a severidade da doença é maior na lebre-ibérica o que poderá estar relacionado com a passagem recente de barreira de espécie, que contrapõe, no caso do coelho a uma longa co-evolução e a uma tendência geral de diminuição da virulência. O trabalho laboratorial e de campo foram financiados pela FCT (Grant SFRH/BD/137067/2018), CIISA, FMV-UL (Project UID/CVT/00276/2013), e pelo projeto +Coelho (Fundo Florestal Permanente, Portugal; Dispatch no. 4757/2017 of 31 May).

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

A IMPORTÂNCIA RELATIVA DO JAVALI E DO VEADO COMO HOSPEDEIROS DE TUBERCULOSE EM PORTUGAL: RESULTADOS PRELIMINARES

Nuno Santos [1], ***João Queirós***[1], ***Eliana Fonseca***[2], ***Ana Valente*** [3,4], ***Rita T. Torres*** [3], ***Carlos Fonseca***[3] ***& Paulo Célio Alves*** [1]

[1] *CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal.*

[2] *ICNF-DCNFN, Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas I.P., Braga, Portugal*

[3] *Departmento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal*

[4]*Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (UCLM-CSIC-JCCM), Ronda de Toledo 12, 13071 Ciudad Real, Spain*

E-mail: nuno.santos@cibio.up.pt

Palavras chave: tuberculose animal, javali, veado, hospedeiro de manutenção, epidemiologia.

Resumo:
A tuberculose animal é uma zoonose relevante para a gestão cinegética, que na Península Ibérica se mantém num sistema envolvendo múltiplos hospedeiros. O javali e o veado são os hospedeiros de manutenção mais relevantes na comunidade de ungulados selvagens, no entanto a sua importância relativa é desconhecida. O objetivo deste estudo é quantificar a contribuição de javalis e veados para a manutenção da tuberculose animal em cinco zonas de estudo em Portugal (municípios de Bragança, Idanha a Nova, Castelo de Vide, Moura-Barrancos e Serpa).
Para cada uma das espécies estimou-se o seu R_0 em cada uma das zonas de estudo, num enquadramento bayesiano. Os resultados preliminares sugerem que o veado é o hospedeiro de manutenção em Idanha a Nova (R_0=3,2 IC_{50} 1,1-8,6), Bragança (R_0=19,6 IC_{50} 4,7-80) e Serpa (R_0=5,1 IC50 1,1-21), e o javali é o hospedeiro de manutenção em Moura-Barrancos (R_0=1,9 IC_{50} 0,7-5,8) e em Castelo de Vide (R_0=30,9 IC_{50} 9,0-124). A probabilidade de ambas as espécies serem hospedeiros de manutenção varia entre 30% em Castelo de Vide e <1% em Bragança.
A importância relativa do javali e do veado na manutenção da tuberculose em comunidades de ungulados selvagens apresenta variabilidade espacial, cujas causas são ainda desconhecidas. Os resultados preliminares da quantificação da contribuição relativa de javali e veado para a manutenção da tuberculose contribuem para o conhecimento da epidemiologia desta doença, bem como para a avaliação de estratégias de controlo na fauna selvagem.

Preferência de comunicação: poster.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

A IMPORTÂNCIA RELATIVA DO JAVALI E DO VEADO COMO HOSPEDEIROS DE TUBERCULOSE EM PORTUGAL: RESULTADOS PRELIMINARES

Nuno Santos [1], João Queirós[1], Eliana Fonseca[2], Ana Valente [3,4], Rita T. Torres [3], Carlos Fonseca[3] & Paulo Célio Alves [1]

[1] CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal.
[2] ICNF-DRCNFN, Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas I.P., Braga, Portugal
[3] Department de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal
[4] Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (UCLM-CSIC-JCCM), Ronda de Toledo 12, 13071 Ciudad Real, Spain
E-mail: nuno_santos@cibio.up.pt

Introdução

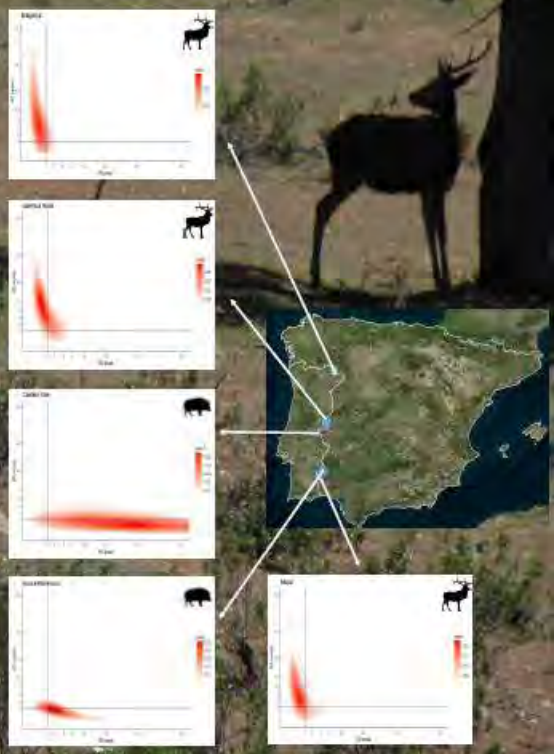
A tuberculose animal (TB) é uma zoonose relevante para a gestão cinegética que, na Península Ibérica, se mantém num sistema envolvendo múltiplas espécies de hospedeiros. O javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) são os hospedeiros de manutenção mais relevantes na comunidade de ungulados selvagens[1], no entanto a sua importância relativa na transmissão de TB é desconhecida. O número básico reprodutivo (R_0) de uma doença é o número de infeções secundárias causadas por um hospedeiro infetado típico, numa população inteiramente suscetível à infeção[2].

O objetivo deste estudo é quantificar a contribuição de javalis e veados para a manutenção da TB em cinco zonas de estudo em Portugal (municípios de Bragança, Idanha a Nova, Castelo de Vide, Moura-Barrancos e Serpa), estimando o seu número básico reprodutivo (R_0).

Métodos

Para cada uma das zonas de estudo, e para cada uma das espécies, estimou-se o seu R_0 num enquadramento bayesiano [3].

A abundância dos hospedeiros foi estimada a partir do número de animais caçados [4] e proporção da população que é caçada [5-11], exceto no veado em Bragança, em que se baseou em estimativas de densidade por *distance sampling* [12]. A prevalência real foi estimada a partir da prevalência aparente, sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico, utilizando a package "prevalence" [13] em R. A excreção de *M. bovis* foi quantificada com base em [14]. Para a importância relativa da transmissão intra- e inter-específica foi utilizado o *prior* não informativo dunif(0,1).



Resultados

Os resultados preliminares sugerem que o veado é o principal hospedeiro de manutenção em Idanha a Nova (R_0=3,2 IC_{50} 1,1-8,6), Bragança (R_0=19,6 IC_{50} 4,7-80) e Serpa (R_0=5,1 IC_{50} 1,1-21), e o javali é o principal hospedeiro de manutenção em Moura-Barrancos (R_0=1,9 IC_{50} 0,7-5,8) e Castelo de Vide (R_0=30,9 IC_{50} 9,0-124). A probabilidade de ambas as espécies serem hospedeiros de manutenção varia entre 30% em Castelo de Vide e 1,5% em Bragança.

Discussão

A importância relativa do javali e do veado na manutenção da tuberculose em comunidades de ungulados selvagens apresenta uma variabilidade espacial, cujas causas são ainda desconhecidas. Os resultados preliminares da quantificação da contribuição relativa de javali e veado para a manutenção da tuberculose contribuem para o conhecimento da epidemiologia desta doença, bem como para a avaliação de estratégias de controlo na fauna selvagem.

Referências

1 Gortazar, C. et al. (2012) Mammal Review, 42(3), 193-206.
2 Diekmann, O. et al. (1990) J Math Biol, 28(4), 365-382
3 Fenton, A. et al. (2012) The Am Nat, 186(5), 610-622.
4 ICNF (2016) Hunting statistics, Portugal.
5 Barasona, J. A. et al. (2016) Emerg Infect Dis, 22(12), 2178.
6 Keuling, O. et al. (2013) Eur J Wildl Res, 59(6), 805-814.
7 Merli, E. et al. (2017) J Zool, 303(2), 155-164.
8 Tolgo, E. et al. (2008) J Wildl Manag, 72(7), 1532-1539.
9 Burbaite, L., Csányi, S. (2010) Acta Zool Lit, 20(4), 179-188.
10 Langvatn, R., & Loison, A. (1999) Wildl Biol, 5(4), 213-223.
11 Torres-Porras, J. et al. (2014) Eur J Wildl Res, 60(2), 351-357.
12 Valente, A. M. (2019) PhD thesis, Aveiro University. (unpublished).
13 Devleesschauwer, B. et al. (2014) R package version 0.4.0.
14 Santos, N. (2015) Vet. Res., 46(1): 129.

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real

Quadro estratégico FIGHT-TWO – Desenvolvimento de uma vacina edível para o controlo do vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) no coelho-bravo

***Carina L. Carvalho*[1], *Madalena Monteiro*[1], *Paulo Carvalho*[1], *Paula Mendonça*[1], *Jorge Correia*[2], *Berta São Brás*[2], *Conceição Peleteiro*[2], *Elsa Duarte*[3], *António Mira*[3], *Sandra Branco*[3], *António Roldão*[4] & *Margarida D. Duarte*[1,3]**

[1]*INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.*
[2]*CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*
[3] *ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Instituto de Formação e Investigação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal.*
[4] *IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal.*
E-mail: carina.carvalho@iniav.pt

Palavras chave: *Oryctolagus cuniculus algirus*, coelho-bravo, RHDV2, vacina oral, VP60-VLPs.

A doença hemorrágica viral (DHV) é uma infeção sistémica altamente contagiosa, frequentemente letal, do coelho Europeu (*Oryctolagus cuniculus*), e um dos principais fatores subjacentes ao declínio da espécie, afetando predadores ameaçados que dela dependem. Atualmente, a afeção é causada pelo vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2), que emergiu em 2010 e substituiu os genogrupos do vírus clássico (RHDV, G1-G6). As vacinas comerciais disponíveis para RHDV2 são inativadas, obtidas de extratos de fígado de animais infetados, e de administração subcutânea. Além dos riscos de inativação incompleta do vírus, estas vacinas são inadequadas para coelho bravo, exigindo manipulação dos animais. A imunidade é curta e a proteção transitória. As vacinas comerciais para RHDV não conferem proteção cruzada contra RHDV2. O quadro estratégico FIGHT-TWO (PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020) é o desenvolvimento e produção de uma vacina oral e segura contra RHDV2 para ser distribuída no campo como isco ou em ração seca. Tem o potencial de proteger uma ampla proporção das populações silvestres, sendo crucial para reduzir a transmissão do vírus e controlar a infeção, evitando a captura e manipulação dos animais. A vacina baseada em partículas de tipo viral será produzida em sistema de vetores de expressão de células de inseto-baculovírus (IC-BEVS) e atualizada de acordo com a evolução do vírus (sistema aberto). A parceria do projeto inclui o INIAV, laboratório de referência para doenças dos animais, duas Universidades Portuguesas de Veterinária (Évora e Lisboa) e o IBET, um instituto privado com vasta experiência no campo da produção de vacinas. O FIGHT-TWO permitirá prosseguir com uma das 12 medidas especificadas num Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral do Coelho em Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio, Ministério da Agricultura), apoiando políticas de gestão mais generalistas que alavancam a recuperação das densidades populacionais de coelho-bravo, o controlo da DHV, a recuperação dos ecossistemas onde o coelho é essencial e a reativação da caça em Portugal.

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL NO CONTROLO DAS DOENÇAS DA FAUNA SELVAGEM E NO APOIO À GESTÃO CINEGÉTICA: O EXEMPLO DO PROJECTO + COELHO

AUTORES

Margarida Duarte[1], Carina Carvalho[1], Fábio Santos[1], Madalena Monteiro[1], Paulo Carvalho[1], Paula Mendonça[1], Teresa Albuquerque[1], Teresa Fagulha[1], Pedro Esteves[2], Joana Abrantes [2], Ana Lopes [2], Pedro Monterroso[2]; Nuno Santos[2], Ana Serronha[2], João Queirós[2], Paulo Célio Alves[2], Yolanda Vaz[3], Rita Amador[3], Patrícia Tavares Santos[3], Ana Hora[4], Gonçalo Lopes[4], Jacinto Amaro[5], Fernando Castanheira Pinto[6], João Carvalho[7], António Paula Soares[7], Mónica V. Cunha[1], Nuno Canada[1]

1.Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.), Avenida da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal. margarida.duarte@iniav.pt; carina.carvalho@iniav.pt; fabio.santos@ul.pt; madalena.monteiro@iniav.pt; paulo.carvalho@iniav.pt; paula.mendonça@iniav.pt; teresa.albuquerque@iniav.pt; teresa.fagulha@iniav.pt; monica.cunha@iniav.pt; nuno.canada@iniav.pt

2. Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Universidade do Porto, Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, nº7, 4485-661 Vairão, Portugal. pjesteves@cibio.up.pt; analopes@cibio.up.pt; nuno.santos@cibio.up.pt; joao.queiros@cibio.up.pt; anaserronha@cibio.up.pt; pmonterroso@cibio.up.pt; pcalves@fc.up.pt; jabrantes@cibio.up.pt;

3. Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Campo Grande, nº50, 1700-093 Lisboa, Portugal yolanda.vaz@dgav.pt; psantos@dgav.pt; ramador@dgav.pt

4. Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Av da República, nº16, 1050-191 Lisboa, Portugal.
ana.hora@icnf.pt; goncalo.lopes@icnf.pt

5. Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Rua 25 de Abril, lote 20-C/V B, 2100-123 Coruche, Portugal. presidente@fencaca.pt;

6. Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP). Rua Dr António Oliveira Cruz, nº18, 5340-238 Macedo de Cavaleiros, Portugal. presidente@cncp.pt;

7. Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Rua Mestre Lima de Freitas, nº1, 5º, 1549-012 Lisboa, Portugal. jc@anpc.pt; antoniopsoares@anpc.pt

RESUMO

O Projeto +Coelho, através do financiamento do Fundo Florestal Permanente, tem vindo a pôr em prática o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, determinado pelo Despacho nº 4757/2017 de 31 de maio (MAFDR). O objetivo deste plano inclui o conhecimento do estatuto sanitário dos leporídeos (coelho-bravo e lebre) no território nacional e do risco epidemiológico associado às doenças virais, nomeadamente ao vírus da doença hemorrágica viral de tipo 2 (RHDV2) e ao vírus da mixomatose.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos no âmbito deste Plano de Ação durante quase dois anos, em amostras das populações de leporídeos caçados provenientes de zonas de caça selecionadas e de leporídeos mortos recolhidos em todo o território nacional, estão a ser implementadas várias medidas de índole prática que pretendem acelerar a recuperação destas populações.

Entre essas medidas constam i) a suplementação de alimento em zonas onde a disponibilidade de alimento natural é escassa, com uma ração especificamente formulada para coelho-bravo, ii) a desparasitação dos animais em zonas afetadas por elevadas cargas parasitárias, iii) a identificação de

populações de coelho-bravo resistentes, com elevados títulos de anticorpos para a criação de santuários genéticos destas espécies e, iv) o desenvolvimento de uma plataforma informativa e interativa, de acesso público, onde será disponibilizada informação cartográfica, gráfica e estatística, e num futuro mais distante, um modelo para apoio à Gestão cinegética. A descodificação da informação genética das estirpes de RHDV2 tem permitido compreender melhor a epidemiologia da doença e é crucial para o desenvolvimento e atualização de uma vacina oral que será desenvolvida contra a DHV dos coelhos.

Projeto +Coelho, financiado pelo Fundo Florestal Permanente.

PALAVRAS-CHAVE

Projeto +Coelho; Coelho-bravo; lebre-ibérica; doença hemorrágica viral dos coelhos; vigilância sanitária

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

APTIDÃO DO MÉTODO DE RT-qPCR ESPECÍFICO PARA DETEÇÃO DE RHDV2: ANÁLISE *IN SILICO*

AUTORES

Carina L. Carvalho[1], Fábio Abade dos Santos[1,2], Teresa Fagulha[1], Margarida Dias Duarte[1,2]

1. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Avenida da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, carina.carvalho@iniav.pt, teresa.fagulha@iniav.pt, margarida.duarte@iniav.pt
2. Centro de Investigação Interdisciplinar e Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, faas@fmv.ulisboa.pt

RESUMO

A doença hemorrágica de coelho (DHC) é uma infeção sistémica altamente contagiosa, muitas vezes letal, do coelho Europeu (*Oryctologus cuniculus*), e um dos principais fatores do seu declínio. Atualmente, é causada pelo RHDV2 que emergiu em 2010, 28 anos após o vírus clássico, RHDV, ter sido reconhecido na Europa. Como o RHDV2 não se multiplica in vitro, o diagnóstico laboratorial depende de métodos moleculares sensíveis.

Em 2015, desenvolvemos e validámos um RT-qPCR específico para deteção de RHDV2, referenciado no manual da OIE. Foi desenhado com base em sequências de RHDV2 de estirpes de Portugal, França e Itália, disponíveis aquela data, na maioria das quais as sequências-alvo dos primers e sonda se encontravam conservadas. Nas poucas estirpes apresentando variabilidade, detetou-se apenas um mismatch por oligómero, geralmente afastado da extremidade 3, não comprometendo, por isso a hibridação.

O RHDV2 é um vírus de RNA de evolução rápida sujeito a uma variabilidade significativa que pode afetar as sequências-alvo dos oligómeros limitando a deteção das estirpes. A análise *in silico* da especificidade do sistema contra sequências de RHDV2 disponíveis a partir de 2015, confirmou que, decorridos 4 anos, o método é adequado para a deteção de estirpes recentes.

A atualização do sistema é essencial para a correta deteção e diagnóstico das estirpes. Um subconjunto destas será selecionado para integrar uma vacina contra RHDV2, comestível e segura (projeto FIGHT-TWO, PTDC / CVT-CVT / 29062/2017-PT2020). A vacina baseada em partículas de tipo viral será produzida num sistema de vetores de expressão de células de inseto-baculovírus e atualizada de acordo com a evolução do RHDV2 num sistema dinâmico aberto.

PALAVRAS-CHAVE

RT-qPCR, RHDV2, métodos moleculares, análise *in silico*

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

AMOSTRAGEM BIOLÓGICA EM VIDA NO *ORYCTOLAGUS CUNICULUS ALGIRUS* DE SANGUE DA VEIA JUGULAR EXTERNA SOB SEDAÇÃO COM MIDAZOLAM

AUTORES

Abade dos Santos, F.[1,2], Carvalho, C.L.[2], Peleteiro, M.C.[1], Gabriel, S.I.[3], Patrício, R[4], Carvalho, J. [5], Cunha, M.V.[2], Duarte, M.D.[1,2]

1. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
2. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), Laboratório de Virologia. Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal
3. Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
4. AllPets – Clínica Veterinária de Tires
5. Associação Nacional de Proprietários e Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC).

RESUMO

A amostragem em vida de coelho-bravo, uma espécie chave nos ecossistemas da Península Ibérica, é crucial para as avaliações sanitárias permitindo monitorar as populações fora do calendário de caça, limitada em Portugal a uma janela estreita de quatro meses anualmente. Devido ao declínio acentuado da espécie observado nas últimas décadas, a amostragem em vida permite obter as matrizes biológicas necessárias para análise laboratorial sem subtrair animais às populações reduzidas.
Neste método descrevemos ajustes aos protocolos de colheita de sangue da veia jugular externa (EJV) descrita para coelho doméstico para o coelho-bravo, um procedimento problemático dado o tamanho pequeno do corpo, o calibre reduzido dos vasos sanguíneos e a disposição nervosa e fragilidade.
O procedimento foi realizado em 30 animais após sedação com midazolam. Os parâmetros fisiológicos foram avaliados antes da sedação, após a sedação e antes da colheita de sangue e após a colheita de sangue, sendo que o início da sedação levou em média 7,6 ± 1,96 minuto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências respiratória e cardíaca antes e após a colheita de sangue, indicando que não houve interferência devido à venopunção. A recuperação da sedação levou em média 17,3 ± 2,17 minuto. Todos os animais foram liberados durante a primeira hora após a colheita, demonstrando que o procedimento é eficaz e seguro.

AGRADECIMENTOS

O trabalho laboratorial e de campo foi financiado pela FCT (SFRH/BD/137067/2018), CIISA, FMV-UL (UID/CVT/00276/2013), pelo projeto +Coelho (Fundo Florestal Permanente, Portugal; Dispatch no. 4757/2017 of 31st May).

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

PRESERVAÇÃO DO PATRIMÓNIO GENÉTICO DAS ESPÉCIES CINEGÉTICAS: UMA GARANTIA DE SUSTENTABILIDADE E CERTIFICAÇÃO DE QUALIDADE

AUTORES

Paulo Célio Alves[1,2,3]

1. Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, R. Campo Alegre, Porto. pcalves@fc.up.pt
2. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO/InBIO), Universidade do Porto, Campus de Vairao, 4485-661, Vairão, Vila do Conde
3. Wildlife Biology Program, Universidade de Montana, EUA

RESUMO

O património genético é o conjunto da informação presente no ADN em cada indivíduo, população ou espécie, resultante de milhares de anos de evolução e de adaptação aos ecossistemas. Esta informação genética é a responsável pelas diferentes caracteristicas morfológicas, fisiológicas e comportamentais que observamos atualmente. Além da necessidade de salvaguardar as características genéticas que definem uma população ou uma espécie, é fundamental proteger a variabilidade genética existente entre os indivíduos, de modo a assegurar a essencial capacidade de adaptação aos ecossistemas, que estão em constante modificação.

No entanto, o património genético das espécies cinegéticas encontra-se ameaçado pelo declínio generalizado das populações, como resultado da perda de habitat, predação, mortalidade associada a doenças infeciosas, bem como de situações de excessiva pressão cinegética. Outro fator importante que tem contribuído para a perda das características genéticas autóctones, e que em parte resulta do declínio das populações, é a crescente intensificação da criação de espécies cinegéticas em cativeiro e a gestão artificial dos recursos através de repovoamentos com animais exóticos e/ou domésticos. Preservar o património genético das espécies cinegéticas é, portanto, primordial para manter as características e comportamentais autócones, uma garantia de assegurar a viabilidade a médio e longo prazo das populações, e de certificação de qualidade. Serão apresentadas as metodologias moleculares existentes para a certificação genética e a detecção de hibridação em coelhos, veados, javali e perdiz, bem como exemplos da sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE

Genética, Hibridação, Certificação Genética, Características Autóctones.

WILDLIFE SUMMIT 2019
GAME MANAGEMENT

PROJETO +COELHO: UMA PLATAFORMA MODELO PARA A INVESTIGAÇÃO, GESTÃO E SUSTENTABILIDADE DE RECURSOS CINEGÉTICOS

AUTORES

Mónica V. Cunha [1], Paulo Célio Alves[2], Yolanda Vaz[3], Ana Hora[4], Jacinto Amaro[5], Fernando Castanheira Pinto[6], João Carvalho[7], António Paula Soares[7], Ricardo Romão[8], António Roldão[9], Nuno Canada[1], Margarida Duarte[1]

1. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.), Avenida da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal. monica.cunha@iniav.pt; nuno.canada@iniav.pt, margarida.duarte@iniav.pt
2. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal. pcalves@fc.up.pt
3. Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Campo Grande, nº 50, 1700-093 Lisboa, Portugal.
yolanda.vaz@dgav.pt
4. Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), Av. da República, nº 16, 1050-191 Lisboa, Portugal. ana.hora@icnf.pt
5. Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA), Rua 25 de Abril, lote 20-C/V B, 2100-123 Coruche, Portugal presidente@fencaca.pt;
6. Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP). Rua Dr. António Oliveira Cruz, nº 18, 5340-238 Macedo de Cavaleiros, Portugal. presidente@cncp.pt;
7. Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC). Rua Mestre Lima de Freitas, nº1, 5º, 1549-012 Lisboa, Portugal jc@anpc.pt; antoniopsoares@anpc.pt
8. Ordem dos Médicos Veterinários (OMV), Rua Filipe Folque, nº 10 J, 4º dto, 1050-113 Lisboa. ricardo.romao@omv.pt
9. Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), aroldão@ibet.pt

RESUMO

O Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR) determinou a constituição de uma parceria de nove membros, coordenada pelo iNIAV IP, com inclusão de entidades da administração pública, academia e organizações de caça de primeiro nível (OSCs), tendo em vista a implementação de uma estratégia multifacetada capaz de limitar os efeitos em cascata exercidos pelas epizootias nas populações de coelho-bravo (Despacho 4757/2017, 31 de maio). O Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos compreende doze medidas principais inseridas em quatro eixos de intervenção (Programa de Investigação, Boas Práticas de Gestão, Controlo Sanitário, Comunicação). Após aprovação pela Tutela, o Plano foi de imediato colocado em ação. As atividades multidisciplinares levadas a cabo incluem uma rede nacional de monitorização e epidemiovigilância para caracterizar a demografia e o estado sanitário das populações naturais de coelho bravo, a caracterização molecular dos vírus circulantes, o desenvolvimento de alimento composto suplementar e uma vacina em isco para administração a animais de vida livre. Foi também delineado um roteiro de comunicação, educação e transferência de conhecimento. Embora este projeto ainda não tenha completado dois anos, a cooperação estreita entre a comunidade científica, as organizações do setor da caça, os proprietários rurais, os gestores e caçadores já impactou positivamente na forma como os agentes do terreno interagem com as instituições de investigação e a administração. Esta plataforma de trabalho pode ser

adaptada para enfrentar desafios noutras espécies da fauna silvestre e servir como modelo para a investigação, experimentação, gestão, educação e transferência de conhecimento em recursos cinegéticos. O Projeto +Coelho é financiado pelo Fundo Florestal Permanente.

PALAVRAS-CHAVE

Projeto +Coelho; investigação em fauna silvestre; gestão cinegética; transferência de conhecimento; sustentabilidade de recursos cinegéticos.

VIRAL LOADS AND HISTOPATHOLOGICAL LESIONS INDUCED BY RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS IN VACCINATED AND NON-VACCINATED WILD RABBITS

Fábio Abade dos Santos [1], Margarida Duarte [1], Maria da Conceição Peleteiro [1]

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

Introduction

The European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) is a species originating in the Iberian Peninsula. The Portuguese territory is almost totally occupied by the subspecies *O. c. algirus* (Ferrand, 2008). After 2005, in some areas of the Iberian Peninsula, the wild populations declined abruptly, by about 95%, compared to the values in 1950 (Delibes et al., 2000). In addition to other threatening factors, Viral Haemorrhagic Disease has been markedly responsible for the sharp reduction of wild rabbits, impacting many predator species.

In 2008, the European wild rabbit was attributed the state 'near-threatened' in Europe by the International Union for Conservation of Nature (Smith & Boyer, 2008), also appearing in the Red Book of Portugal (Cabral, 2005).

Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2 or GI.2) emerged in 2010, when a recovery trend of the wild populations was being observed. The agent is a fast evolving RNA encapsulated virus belonging to the genus Lagovirus, family Caliciviridade. In Portugal, it was detected for the first time in 2012 in the mainland, but is currently disseminated throughout the continental and insular territories (Duarte et al. 2015; Carvalho et al., 2017; Abade dos Santos, et al, 2017).

The application of parenteral inactivated vaccines specifically developed for the industry to the wild populations is very limited. Furthermore, no specific schedule protocol or dose is recommended by the producer for wild rabbits.

Reproduction centres of *O. c. algirus* usually resource to vaccination to minimise the impact of RHDV2 and/or to provide short-term immunity to the animals. Vaccination failure, confirmed by laboratorial diagnosis is, however, frequent among wild rabbits.

Many aspects related to immunisation protocol, impact of stress from animal handling on the immune response, etc., remain to be clarified. We investigated the outcome of RHDV2 in vaccinated animals to explore and better understand the vaccine impact in wild rabbits.

This study aimed to establish a relation between viral loads detected in various organs (liver, spleen, duodenum, kidney, lung and heart) and faeces, deduced from the Cq values obtained in a RT-qPCR, and the histopathological lesions in RHDV2-victimised non-vaccinated wild rabbits.

M&M

Thirty-six naturally dead wild rabbits were included in this study. Fifteen were vaccinated for RHDV originating from a certified reproduction centre. Twenty one were non-vaccinated. These were obtained from hunting reserves. The cadavers were collected daily by the farms' staff and frozen up to necropsy. Estimated age ranged from one month to one year. Gender ratio was 16 females to 20 males. Necropsies and histopathological examination of various organs (liver, spleen, kidney, trachea and oesophagus, lung, heart, thymus, stomach, intestine) were performed by standard methods with formalin fixed and paraffin embedded sections stained by haematoxylin and eosin (H&E). Patterns of lesions in the various organs examined were established in order to correlate them to respective viral loads. Statistical analysis was performed with Related-Samples Wilcoxon Signed Rank.

RHDV2 was investigated by a quantitative RT-PCR as recommended by the OIE (Duarte, 2015). All homogenates were prepared at 10% in PBS. Nucleic acid extraction (BioSprint 96 nucleic acid extractor) and RT-qPCR (Duarte el al., 2015) were performed at the same conditions for all samples. Viral loads were inferred by the Cq values according to the equation y=-3,336x + 43,386 (Duarte et al., 2015).

Results

All 36 rabbits included in this study, vaccinated (VAC) and non-vaccinated (NVAC), were positive for RHDV2.

Lesions found in the various organs were mainly necrotic (spleen, thymus and kidney) or oedematous and haemorrhagic (trachea and lungs). Liver and lung lesions were more variable allowing for the establishment of seven patters in the former and five in the latter (Tables 1 and 2 and Figure 1). In the heart, serous fluid accumulated between fibres in most cases with or without granular degeneration of cardiomyocytes (Table 3, Figure 1). The more severe lesions were significantly more frequent in the non-vaccinated rabbits: liver pattern F#7, p = 0.001 and lung pattern P#5, p = 0.028. In vaccinated rabbits the more frequent the pattern of lung lesions was milder (pattern P#3, p= 0.027).

The Cq value (cycling quantification, inversely proportional to the viral charge), was higher by 4.55 to 9.46 cycles in the vaccinated group compared to the non-vaccinated animals, reflecting higher viral loads in the latter (Table 4).

The liver in the non-vaccinated rabbits showed a Cq mean of 8.79 cycles below the homologous matrix in vaccinated group (p= 0,025). Similarly, the higher degree of injury in the lungs of non-vaccinated rabbits may be justified with the higher viral load, since the Cq value was in average, 4.77 cycles below those vaccinated (p= 0.077).

Lesions found in the various organs were mainly necrotic (spleen, thymus and kidney) or edematous and hemorrhagic (trachea and lungs). In the heart, serous fluid accumulated between fibers in most cases with or without granular degeneration of cardiomyocytes. Liver and lung lesions were more variable allowing for the establishment of seven patters in the former and five in the latter (Tables 1 and 2). The more severe lesions were significantly more frequent in the non-vaccinated rabbits: liver pattern F#7, p = 0.001 and lung pattern P#5, p = 0.028. In vaccinated rabbits the more frequent the pattern of lung lesions was milder (pattern P#3, p = 0.027) (Figure 2).

Table 1 - Patterns of lesions identified in the liver. The values shown represent the number of observations in vaccinated and non-vaccinated rabbits for each pattern. Whenever the sum is higher than the n of the group, this was due to the observation of more than one pattern in the same organ from the same animal.

			VAC	NVAC
Non-necrotic patterns	F#1	Mild congestion.	1	0
	F#2	Congestion and distention of sinusoids.	4	1
Degenerative or necrotic patterns	F#3	Vacuolar degeneration of hepatocytes.	2	1
	F#4	Foci of hepatocytic necrosis alternating with vacuolar degeneration. Necrotic cells have eosinophilic cytoplasm and pyknotic and karyorrhetic nuclei.	1	0
	F#5	Focal areas of acellular necrosis alternating with areas of hepatocytic necrosis, witheosinophilic cytoplasm and pyknotic and karyorrhetic nuclei.	4	0
	F#6	Areas of diffuse hepatic necrosis with eosinophilia of the cytoplasm. More than 50% of the cells exhibit nucleus although frequently pyknotic. The trabecular architecture is maintained.	7	4
	F#7	Generalized severe diffuse necrosis of hepatocytes with dissociation of trabeculae. Less than 50% of hepatocytes exhibit nucleus persistently pyknotic.	2	11

Table 2 - Patterns of lesions identified in the lung. The values shown represent the number of observations in vaccinated and non-vaccinated rabbits for each pattern. Whenever the sum is higher than the n of the group, this was due to the observation of more than one pattern in the same organ from the same animal.

			VAC	NVAC
Congestion and edema are predominant	P#1	Focal or diffuse alveolar edema, with or without congestion.	8	7
	P#2	Congestion and alveolar edema. Intralveolar focal hemorrhage	4	3
	P#3	Very marked congestion of the alveolar capillaries. Restricted zones of thickening of the interalveolar septa with moderate to severe atelectasis (focal interstitial pneumonia).	7	0
Congestion and edema are not predominant	P#4	Presence of granulomas with necrotic centre, formed by epithelioid macrophages, eosinophils and multinucleated giant cells.	1	0
	P#5	Thickening of the interalveolar septa with mononuclear cell infiltration with atelectasis (diffuse interstitial pneumonia).	1	5

Table 3 - Patterns of lesions identified in the heart. The values shown represent the number of observations in vaccinated and non-vaccinated rabbits for each pattern.

		VAC	NVAC
C#0	No significant changes.	0	1
C#1	Presence of serous fluid between fibers. Granular degeneration of cardiomyocytes, with loss of striation.	21	13

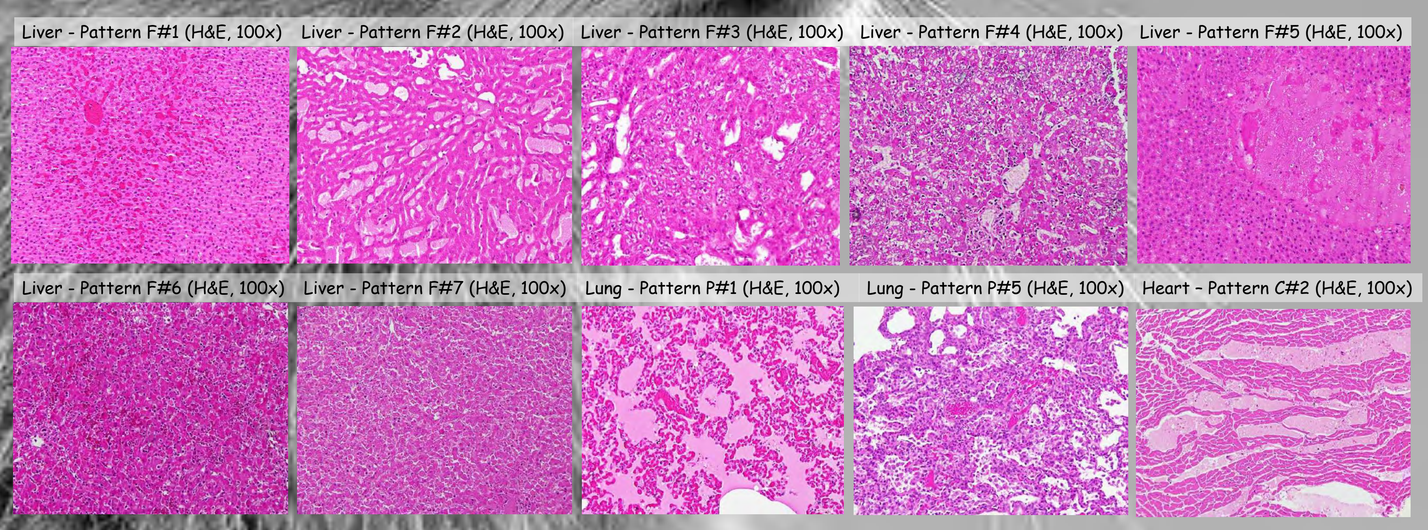


Figure 1. Histopathology of the various patterns established for liver and lung is described in the Tables at left, and the respective images are shown above.

Table 4 - Upper table- The value presented results from the statistical analysis of the difference of matrices Cq value within the VAC and NVAC groups. Lower table- Minimum and Maximum Cq values obtained for the different matrixes from vaccinated (VAC) and non-vaccinated animals (NVAC).

	VAC							NVAC						
Matrix	**Liver**	**Spleen**	**Duodenum**	**Feces**	**Kidney**	**Lung**	**Heart (left ventricle)**	**Liver**	**Spleen**	**Duodenum**	**Feces**	**Kidney**	**Lung**	**Heart (left ventricle)**
Liver		0,455	0,872	0,856	0,654	0,05*	0,737		0,064	0,191	0,023	0,0211	0,975	0,211
Spleen			0,205	0,263	0,112	0,05*	0,351			0,281	0,008*	0,125	0,594	0,233
Duodenum					0,455	0,023*	0,931				0,027*	0,776	0,307	0,650
Feces					0,794	0,099	0,654					0,009**	0,009**	0,008**
Kidney						0,002**	0,305						0,211	1,000
Lung							0,008**							0,221
		Descriptive analysis of Cq values												
Minimum Cq	13,27	14,17	16,18	21,29	23,82	15,62	26,12	11,28	12,34	12,45	18,91	12,35	10,57	13,64
Maximum Cq	38,01	38,01	38.01	38.01	38,01	36,08	38,01	38,01	38,01	33,92	38,01	36,44	38,01	38,01
Medium Cq	31,28	20,64	32,06	32,17	33,40	28,31	32,63	22,49	22,10	23,24	27,62	23,94	23,54	24,65
σ	8,01	7,22	5,73	6,46	4,67	5,92	3,70	9,82	9,60	6,92	6,92	7,14	8,58	7,98

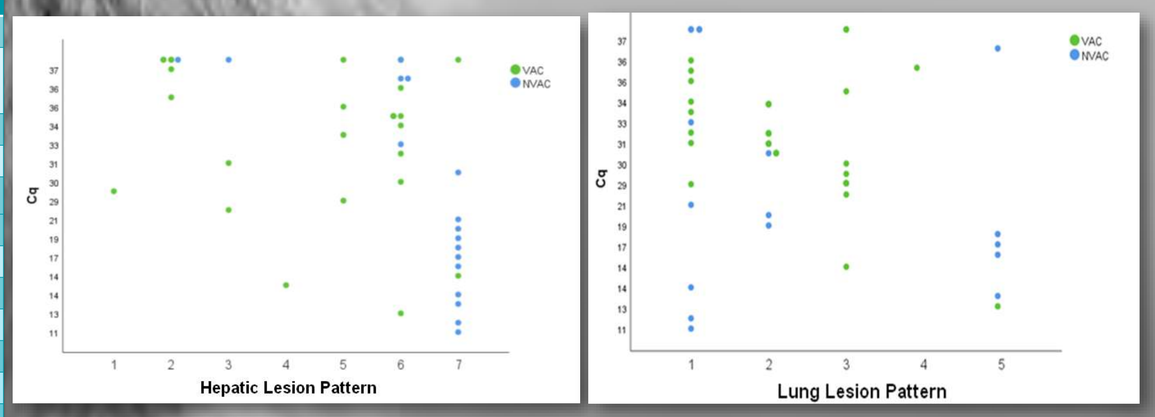


Figure 2. Correlation between the Cq values and the lesional patterns in liver and lungs of vaccinated (VAC) and non-vaccinated (NVAC) RHDV2 wild rabbits.

Discussion

The progression of the disease in a vaccinated industrial domestic rabbit population has previously reported (Carvalho et al. 2017) who showed lesions compatible with systemic haemorrhagic disease and RHDV2-RNA in 85.7% of the vaccinated animals tested that died. However, no data was available for wild rabbits. We investigated the relationship between viral loads and severity of histopathological lesions in several organs such as liver, spleen, duodenum, kidney, lungs and heart in two groups of rabbits that were naturally dead by RHDV2.

Lesions identified in the study were generally in agreement with what was described in the literature with the exception of myocardial lesions with marked interstitial oedema separating fibres. Further studies are, however, necessary to clarity if this new finding reflects the compromise of myocardia in RHDV2.

The lesions observed were systematically more severe in the non-vaccinated group (NVAC), suggesting that disease progressed more rapidly in this group.

These results may be related with the higher viral loads registered in the liver and lungs of the non-vaccinated rabbits.

The efficacy of vaccination in wild rabbits should be investigated, as this study showed that a large number of vaccinated rabbits were subsequently infected by RHDV2 and died of the disease, possibly due to several concurring factors, including interference with maternal immunity.

According to our study, in RHDV2 vaccinated dead rabbits, vaccination has been shown to play a role in slowing down the progression of the disease, resulting in lower viral loads and reduced severity of the lesions in various organs, particularly liver and lungs. These results suggest that vaccination induced some degree of partial protection and, therefore, should be encouraged.

References

- Abade dos Santos, F.A., Carvalho, C., Nuno, O., Correia, J.J., Henriques, M., Peleteiro, M.C., Fevereiro, M., Duarte, M.D., 2017. Detection of rabbit Haemorrhagic disease virus 2 during the wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) eradication from the Berlengas archipelago, Portugal. BMC Vet. Res. 13, 336. doi:10.1186/s12917-017-1257-3
- Cabral, M.J., 2005. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. In: Almeida, J., Almeida, P.R., Delliger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queirós, A.I., Rogado, L., Santos-Reis, M. (Eds.). Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa. 659p.
- Carvalho, C.L., Leclerc Duarte, E., Monteiro, J.M., Afonso, C., Pacheco, J., Carvalho, P., Mendonça, P., Botelho, A., Albuquerque, T., Themudo, P., Fevereiro, M., Henriques, A.M., Santos Barros, S., Dias Duarte, M., 2017. Progression of rabbit haemorrhagic disease virus 2 upon vaccination in an industrial rabbitry: A laboratorial approach. World Rabbit Sci. 25, 73–85.
- Carvalho, Silva S, Gouveia P, Costa M, Duarte EL, Henriques AM, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016-2017). Virus Genes. 2017;1-5.
- Delibes, M., Rodríguez, A., Ferreras, P., 2000. Action Plan for the conservation of the Iberian lynx (Lynx pardinus) in Europe. Counc. Eur. Publ. Nat. Environ. Strasbourg.

Acknowledgements: This project was supported by FCT project UID/CVT/276/2013. Molecular diagnostic was funded by FUNDO FLORESTAL PERMANENTE (Projeto Avaliação

1st ICECVM – Athens, Greece, 26th-27th Setembre 2019

PROJECT FIGHT 2

Development of an Edible Bait Vaccine to Control Rabbit Haemorrhagic Disease Virus 2 (RHDV2) in Wild Rabbits

Carvalho CL [1], Monteiro M[1], Carvalho P[1], Mendonça P[1], Correia J[2], São Brás B[2], Peleteiro C[2], Duarte E[3], Mira A[3], Branco S[3], Roldão A[4], Duarte MD[1,2]

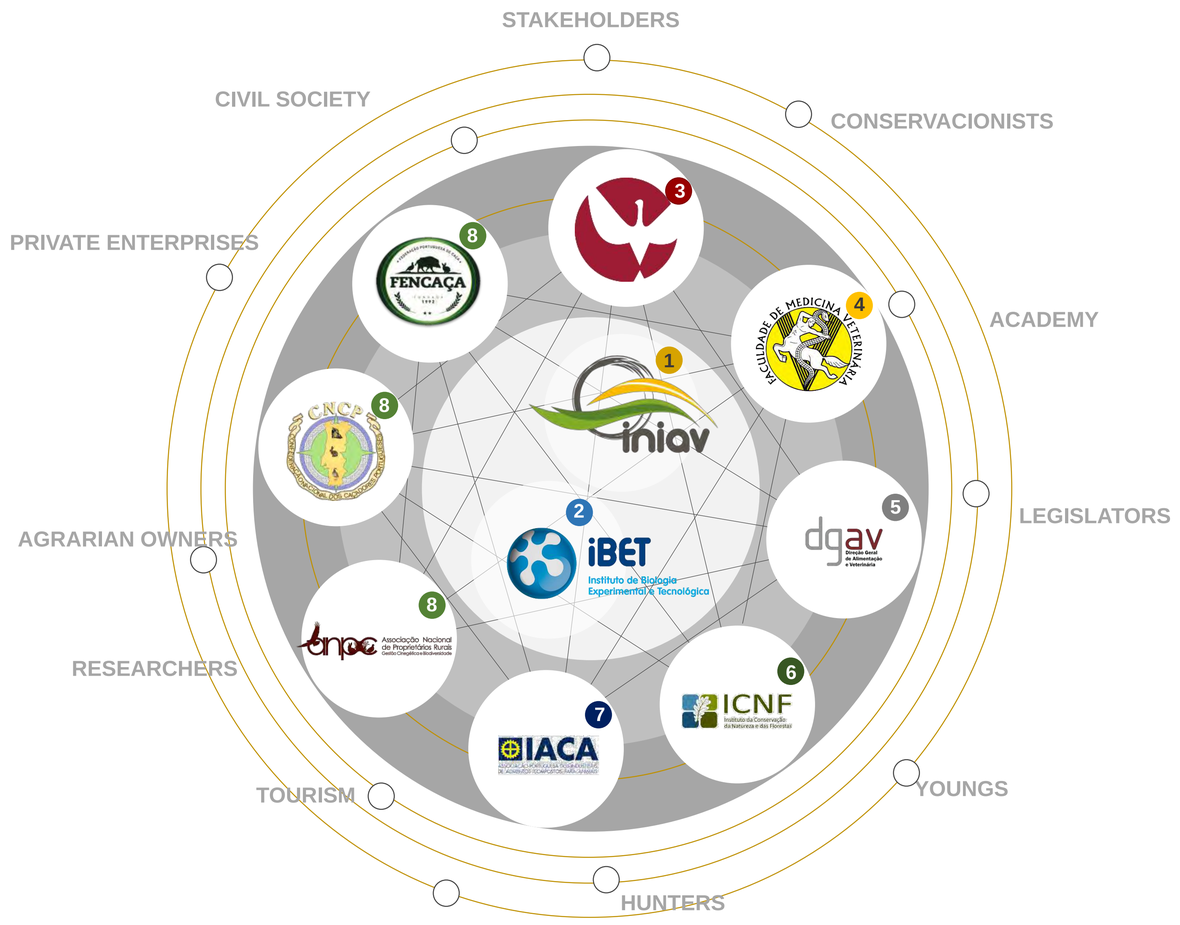
[1]Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.), Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras, Portugal
[2]Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária (FMV-UTL), Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
[3]Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Instituto de Formação e Investigação Avançada (IIFA), Universidade de Évora, (UÉ) Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal
[4]Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Avenida da República, Estação Agronómica, 2780-157 Oeiras, Portugal

Context of the study

RHDV2, a ***Calicivirus*** of the genus ***Lagovirus***, causes **rabbit haemorrhagic disease (RHD)**, an often-lethal systemic infection in the European rabbit (***Oryctolagus cuniculus***)[1,2]. Since its emergence in 2010 in France[2], RHDV2 replaced the classical RHDV genogroups (G1-G6) that circulated previously[1,3,4]. Currently, RHDV2 is one main factor underlying the **wild rabbits' decline**, which is a key-stone species in the Mediterranean ecosystems of the Iberian Peninsula. RHDV2 affects adult and juvenile animals, hampering the recruitment of new individuals to wild populations compromising their dynamics, indirectly impacting on several **endangered predator species**[5].

RHD cannot be eradicated due to the high environment resistance of the virus and easy spread by insects, rodents, birds of prey or anthropogenic actions. Also, **disease control** is difficult despite in the industry vaccination, good management practices and biosecurity measures are effective[6].

Commercial RHDV2 vaccines currently available are **inactivated**, obtained from infected animal liver extracts and the route of administration is usually subcutaneous, requiring handling of the animals. Further than the risks associated with **incomplete virus inactivation** and the inadvertent release of infectious virus in the field, these vaccines are **not suitable for wild rabbits**, requiring capture for inoculation which causes great stress. The immunity induced by these vaccines is short and, hence, the protection transient. The previous commercial RHDV vaccines, most also inactivated, were shown to be **ineffective** in conferring cross protection against RHDV2[6].



Direct Partners

1 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA I.P. (INIAV)
National Reference Laboratory for Animal Diseases; Investigation supporting public policies

2 INSTITUTO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL E TECNOLÓGICA (IBET)
Experiência no Desenvolvimento de Vacinas Baseadas em VLPs

3 UNIVERSIDADE DE ÉVORA (UÉ)
Pathology and Animal Experimentation

4 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE LISBOA (FMV-UTL)
Pathology and Animal Experimentation

Indirect Partners

5 DIREÇÃO GERAL DE VETERINÁRIA (DGAV)
National Veterinary and Sanitary Authority

6 INSTITUTO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (ICNF)
Nacional Authority for Nature's Conservation and Utilization of Hunting Resources

7 ASSOCAÇÃO PORTUGUESA DOS INDUSTRIAIS DE ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS (IACA)
Develpment of dry feed specifically formulated for the wild rabbit

8 ORGANIZAÇÕES DO SETOR DA CAÇA (OSCS) DE 1º NÍVEL (FIRST LEVEL HUNTING ORGANIZATIONS - FENCAÇA, CNCP, ANCP)
Observers in the field, participants in trials; Vaccine users

Figure 2. Project Figth-two partnership.

Main objectives

FIGHT-TWO (PTDC/CVT-CVT/29062/2017) strategic framework is the development and **production of an edible and innocuous (pathogen- and genome-free) RHDV2 vaccine**, based in Virus-Like Particles (VLPs), to be distributed in the field as bait or in dry feed. This oral vaccine overcomes the need of capture and manipulation of the animals, unfeasible in wild populations, and will potentially protect a broad proportion of the rabbit populations, crucial to abrogate virus transmission leading to the control the infection.

VP60 (major capsid protein) -VLPs are protein cages that mimic the overall structure of the native virions harbouring **no genetic material**[7], although able to induce a protective immune response when administered parenterally[8] or orally[9]. The **oral immunogenicity** of VP60 in rabbits has been described more than two decades ago[9-13], however this strategy was never implemented due to cost/benefit ratios. Currently, VLP-based vaccine technologies have the potential of producing higher concentration of VLPs in a much-reduced time-frame. The VLP purification process required for rabbit immunization is expected to be simpler therefore **less expensive**[14,15]. The recombinant VP60 based-VLPs RHDV2-vaccine, will be **updated** according to the virus evolution in an progressive ***modular system***, as it is the case of Influenza vaccines[16] [**Figure 1**].

The National Institute of Agrarian and Veterinarian Diseases (INIAV I.P.) that harbours the Nacional Reference Laboratory for Animal Diseases, and the **Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET),** a private institute with vast experience in animal and human vaccine production, coordinated the project. The direct partnership includes two Portuguese Veterinary Universities - **Universidade de Évora (UÉ) and Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV)**. Other institutions are considered indirect partners of the consortium. The project aims to mobilize several other layers of society including the hunting sector **[Figure 2**].

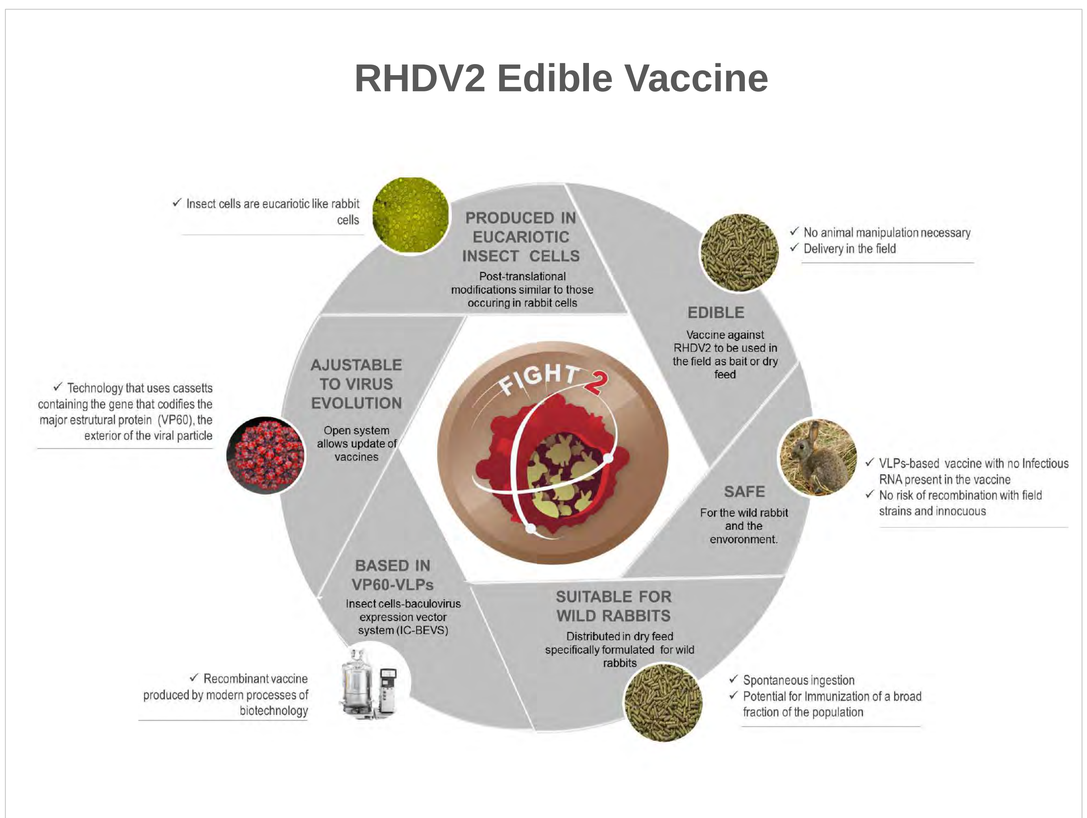


Figure 1. Characteristics of the VP60-VLPs based edible vaccine against RHDV2.

Materials and Methods

The insect cells-baculovirus expression vector system (IC-BEVS) will be used to produce this novel vaccine.

Results and Conclusions

A nucleotide bank of RHDV2 *vp60* sequences is being obtained to support the selection of a subset of representative strains to be **included in the vaccine**. The *vp60* gene of those strains will be **cloned and used to construct the recombinant baculoviruses**.

FIGHT-TWO will allow to proceed with one of 12 measures specified in a **National Action Plan for the Control of Rabbit Haemorrhagic Viral Disease in Rabbits** (Dispatch 4757/17 of 31 May, Portuguese Ministry of Agriculture).

Project FIGHT-TWO supports other generalist management policies towards the **recovery of wild rabbit populations and RHD control**, the recovery of ecosystems where the rabbit is keystone and the reactivation of hunting activities in Portugal.

Funding: Project Fight-two (**PTDC/CVT-CVT/29062/2017**, PT2020), is financed by the **Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT**).

Acknowledgments: Project **+Coelho1**: "*Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral"* and Project **+Coelho2**: "*Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal"*, financed by the **Fundo Florestal Permanente (FFP), Portuguese Ministry of Agriculture**.

References:

[1]Le Gall-Reculé *et al.*, 2013. Vet. Res. 44.
[2]Le Gall-Reculé *et al.*, 2011. Vet. Rec. 168, 137–8.
[3]Lopes *et al.*, 2015. Viruses 7, 27–36.
[4]Mahar *et al.*, 2018. . J Virol. 2018 Jan 2;92(2). pii: e01374-17
[5]Delibes-Mateos *et al.*, 2014. Emerg. Infect. Dis. 20, 2166-8.
[6]Carvalho *et al.*, 2017. World Rabbit Sci. 25: 73-85.
[7]Crisci *et al.*, 2012. Vet Immunol Immunopathol. 148(3-4):211-25
[8]Müller *et al.*, 2019. Arch Virol. 164(1):137-148.
[9]Plana-Duran *et al.*, 1996. Arch Virol. 141(8):1423-36.
[10]Bárcena *et al.*, 2000. J Virol. 74(3):1114-23
[11]Torres *et al.*, 2000. Vaccine.19(2-3):174-82
[12]Martín-Alonso *et al.*, 2003. Transgenic Res. 12(1):127-30
[13]Gil *et al.*, 2006. Transgenic Res. 12(1):127-30
[14]Vicente *et al.*, 2011. J Invertebr Pathol. 2011 Jul;107 Suppl:S42-8
[15]Peixoto *et al.*, 2007. J Biotechnol. 10;127(3):452-61
[16]Sequeira *et al.*, 2017. Vaccine. pii: S0264-410X(17)30246-3

I Congreso Ibérico de Ciencia Aplicada a los Recursos Cinegéticos (CICARC)
1-4/7/2019 Ciudad Real, España

QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE DE HOSPEDEIROS DE TUBERCULOSE ANIMAL NA PENÍNSULA IBÉRICA

***Nuno Santos* [1], *Joaquín Vicente* [2], *José de la Fuente* [2], *Paulo Célio Alves* [1] & *Christian Gortázar* [2]**

[1] CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Portugal.

[2] SaBio (Sanidad y Biotecnologia), IREC, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, España

E-mail: nuno.santos@cibio.up.pt

Palavras chave: tuberculose animal, comunidade de hospedeiros, Península Ibérica.

Resumo:

A tuberculose animal é uma doença de importância económica para a pecuária, sujeita a programas de erradicação em bovinos. Apesar do sucesso do controlo da tuberculose nos bovinos, a tendência nos últimos anos foi de um ligeiro aumento da prevalência. Evidências epidemiológicas apontam para a importância da fauna selvagem e espécies domésticas na transmissão da tuberculose aos bovinos. Estudos observacionais e experimentais provam a manutenção da TB na Península Ibérica num sistema multi-hospedeiros.

Nosso objetivo é caracterizar quantitativamente a comunidade de hospedeiros na Península Ibérica, estimando o número de animais selvagens infetados por tuberculose. A prevalência real foi estimada com base na prevalência aparente, sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos e combinada num contexto bayesiano com dados de abundância dos hospedeiros, para obter a distribuição posterior do número de hospedeiros infetados. Uma abordagem geograficamente estruturada foi utilizada para espécies selvagens devido às grandes diferenças regionais na prevalência ou na abundância previamente descritas nestas espécies.

Estimamos que o número de animais infetados por tuberculose na Península Ibérica seja de 225,760 – 1,295,162. As estimativas de espécies não bovinas infetadas excedem a de bovinos infetados, com uma relação de 92,8 (IC_{95} 22,1 – 955).

Estes resultados corroboram a ideia de que na Península Ibérica a tuberculose é uma doença mantida por uma comunidade de hospedeiros domésticos e silvestres. A investigação em ferramentas de controle inovadoras e a combinação de múltiplas abordagens para diminuir a prevalência de infeção nas principais espécies hospedeiras precisarão ser fortalecidas, na linha da estratégia prevista no PATUBES.

Preferência de comunicação: oral.

Anexo VII-F

Divulgação em Revistas de Circulação Nacional para Público Especializado

- Veterinaria Atual - https://www.veterinaria-atual.pt -

Os coronavírus dos animais e do Homem: das infeções assintomáticas às síndromes respiratórias agudas

Posted By *Ana Tavares* On 7 Abril, 2020 @ 8:00 In Destaques,Na Clínica | Comments Disabled

---

Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal, Laboratório de Virologia
Margarida D. Duarte* (Médica veterinária, investigadora)
Fábio A. Abade dos Santos* (Médico veterinário, estudante de doutoramento)
Teresa Fagulha (Médica veterinária)
Carina L. Carvalho (Médica veterinária, investigadora)
Fernanda Ramos (Médica veterinária)1

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (CIISA FMV)
Ana Isabel S. Duarte (Médica veterinária, professora associada)

Instituto de Medicina Molecular – João Lobo Antunes, Universidade de Lisboa
João Pedro Simas (Médico veterinário, professor associado)

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal e Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo
Patrícia Tavares Santos (Médica veterinária)
Pedro Canavilhas Melo** (Médico veterinário)

**membros do CIISA FMV*
*** Vetnatura-Lisboa*

Os coronavírus (CoV) são vírus de RNA não segmentado (de cadeia simples e polaridade positiva), por isso mais sujeitos a mutações dos que os vírus de DNA, e com capacidade de recombinação. Os seus grandes genomas de 27 a 32 kilobases, os maiores genomas de RNA viral conhecidos [1], propiciam a ocorrência e acumulação de erros (mutações) durante a replicação viral. Face a estes dois atributos geradores de variabilidade genética (elevada taxa de mutação e capacidade de recombinação), os coronavírus são reconhecidos entre os vírus com maior capacidade de evolução [2].

Estes vírus pertencem à família *Coronaviridae* e são caracterizados morfologicamente pela disposição das espículas proteicas que possuem na sua camada mais exterior – o invólucro, e que ao microscópio eletrónico lhes conferem a aparência de uma coroa, justificando o seu nome [3]. Dentro da subfamília *Orthocoronavirinae*, são reconhecidos quatro géneros, nomeadamente os *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma–* e *Deltacoronavirus* [4].

Estes vírus **infetam inúmeras espécies de mamíferos** (suínos, bovinos, equídeos, gatos, cães, ratos, morcegos, coelhos, furões, martas, etc.) **e aves** (galinhas, patos, perus, etc.), tanto domésticas como selvagens (Tabela 1) [5].

Doença	Vírus	Espécie suscetível	Hospedeiro reservatório	Espécies intermediárias	Género
Gastroenterite transmissível (TGE)	TGEV	suíno			*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória por coronavírus	PRCoV	suíno			*Alphacoronavírus*
Diarreia Epidémica porcina (PED)	PEDV	suíno			*Alphacoronavírus*
Síndrome da diarreia aguda dos suínos	SADS-CoV	suíno			*Alphacoronavírus*
Encefalomielite hemaglutinante porcina (PHE)	PHEV	suíno			*Betacoronavírus*
Delta coronavírus Porcino	PDCoV	suíno			*Deltacoronavírus*
Diarreia dos vitelos	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Diarreia de inverno	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Doença respiratória	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Enterite por coronavírus	ECoV	equino			Betacoronavírus
Enterite por coronavírus e peritonite infeciosa (PIF)	FCoV	gato			*Alphacoronavírus*
Enterite por coronavírus	CCoV	cão			*Alphacoronavírus*
Tosse dos canis	CRCoV	cão			*Betacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV 229-E	homem	morcego	lama	*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV-NL63	homem	morcego		*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV-OC43	homem		ratinho	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS)	MERS-CoV	homem	morcego	dromedário/camelo	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS)	SARS-CoV	homem	morcego	civeta	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória Aguda Severa (Covid-19)	SARS-CoV-2	homem	morcego?	desconhecido	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória	HCoV-HKU1	homem	ratinho		*Betacoronavírus*
Bronquite Infeciosa	IBV	galinha	aves selvagens		*Gammacoronavírus*
Coronavírus dos perus	TCoV	peru	galinha?		*Gammacoronavírus*
Coronavírus	QuaCoV, PiCoV, FalCoV	Várias espécies			*Deltacoronavírus*

[1]

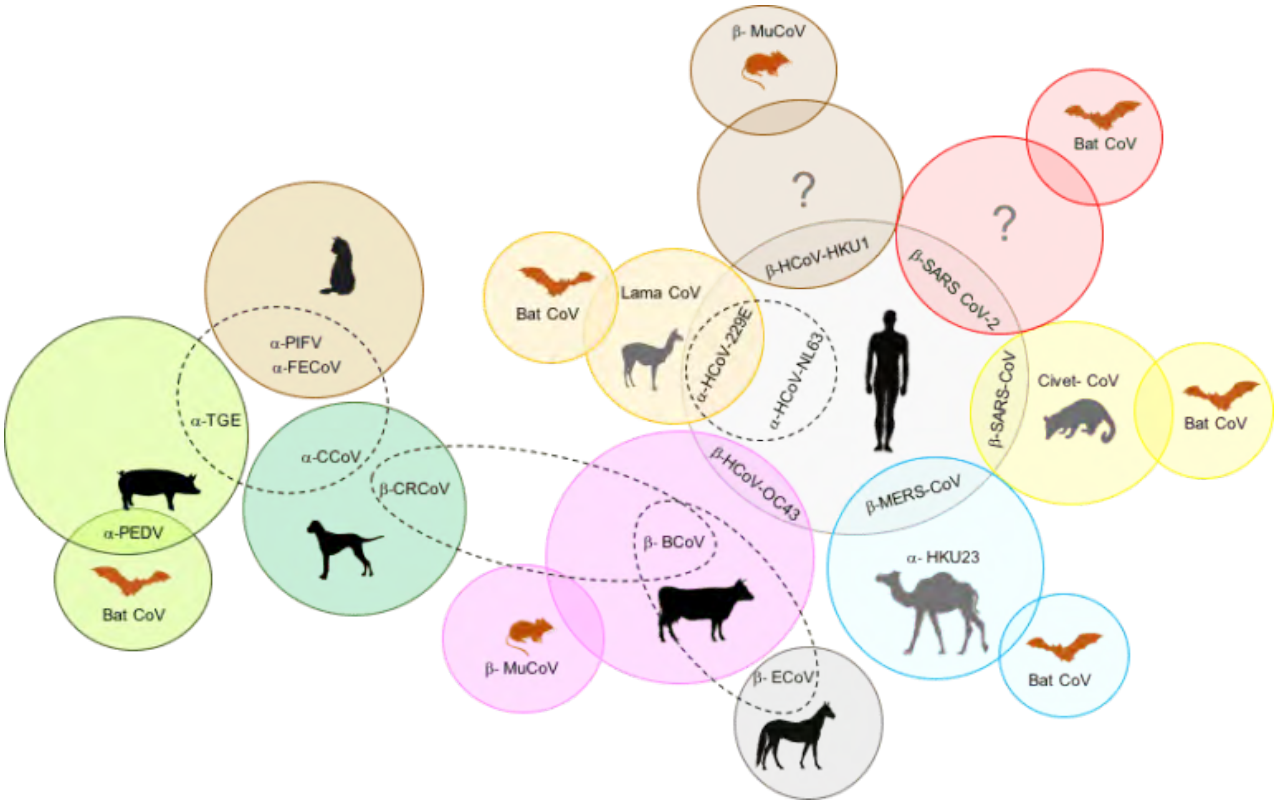
Tabela 1. Listagem dos principais coronavírus que afetam os animais de companhia, os animais de pecuária e o homem.

Os coronavírus **estão amplamente disseminados no meio ambiente** e têm distribuição mundial [6]. Por esta razão estima-se que, após o primeiro ano de vida, uma grande percentagem (cerca de 80%) das espécies domésticas, incluindo cães, gatos, ruminantes e suínos, já tenham sido infetados por algum coronavírus e desenvolvido anticorpos tornando-se seropositivos, sem terem, contudo, apresentado sinais clínicos associados à infeção [5]. De facto, muitas infeções causadas por coronavírus são subclínicas, i.e., assintomáticas, passando por isso despercebidas. No entanto, estes animais aparentemente saudáveis podem excretar coronavírus e funcionar como portadores, atuando como agentes de propagação e disseminação destes vírus [5].

Infetam vários tipos de células, preferencialmente células epiteliais como as que compõem a mucosa digestiva e a mucosa do trato respiratório. Causam doenças de gravidade muito variável, desde infeções inaparentes a síndromes respiratórias severas que podem ter desfecho fatal [6]. Devido ao tropismo celular destes vírus para os epitélios de revestimento, as doenças

resultantes manifestam-se geralmente na forma gastrointestinal (CCoV, FCoV, BCoV) ou respiratória (CRCoV, BCoV). Nesta última, podem afetar o trato respiratório superior, como é o caso das constipações comuns (HCoV 229-E), ou inferior causando broncopneumonias e pneumonias (SARS, MERS, Covid19) [9]. Alguns coronavírus causam doenças reprodutivas, polisserosites (inflamação das serosas), sialodacriloadenites (inflamação das glândulas salivares e lacrimais), hepatites, encefalomielites e nefrites [5].

Uma das consequências da grande plasticidade genómica dos coronavírus é a possibilidade de um determinado vírus **adquirir a capacidade de infetar novas espécies**. Os eventos de **salto de barreira de espécie**, que por vezes requerem uma **espécie intermediária** são, no entanto, raros. Requerem o alinhamento contemporâneo de uma série de fatores, nomeadamente de um **animal reservatório** (espécie onde o vírus replica, geralmente sem induzir patologia)**,** em fase ativa de excreção de grandes quantidades de vírus, e do contato muito próximo e repetido com a nova espécie potencialmente suscetível [7]. Os contatos frequentes, diretos ou indiretos, de humanos com animais reservatórios de coronavírus, como os morcegos [8] e os ratos, potencialmente infeciosos para o Homem, aumenta a probabilidade de transmissão viral entre espécies (Figura 1).



[2]

Figura 1. O diagrama ilustra as cadeias de transmissão para os hospedeiros suscetíveis pelas interceções dos círculos coloridos, a partir de hospedeiros reservatório (a vermelho), passando ou não, por espécies intermediárias (a cinzento). Os círculos tracejados agrupam coronavírus de diferentes espécies animais com relações genéticas próximas.

A relação entre um vírus e o seu hospedeiro é muito complexa, envolvendo uma infinidade de fatores virais e do hospedeiro, na infeção viral e consequente patogénese. Durante a infeção, o hospedeiro ativa várias linhas de mecanismos celulares de defesa. Enquanto parasitas intracelulares obrigatórios, que dependem de células ativas para se multiplicarem, os vírus

desenvolveram estratégias para sequestrar a maquinaria celular do hospedeiro, em prol da sua replicação e manutenção.

Durante anos, os HCoVs foram considerados agentes patogénicos causadores de doença respiratória leve que afetavam a população humana [2]. No entanto, o aparecimento do SARS-CoV veio mostrar que os coronavírus emergentes ou reemergentes podem constituir uma ameaça para saúde pública global.

Os extensos inquéritos epidemiológicos conduzidos na China permitiram localizar a origem do coronavírus da CoVid-19 num mercado de vida selvagem [9]. Em alguns países não-Europeus, estes mercados proporcionam efetivamente circunstâncias facilitadoras da transmissão interespecífica de agentes patogénicos. Essas condições incluem 1) a reduzida higiene, uma vez que estes espaços são frequentemente palco de abates no momento da venda dos animais, originando a contaminação de múltiplas superfícies com sangue e fezes dos animais, 2) a presença de animais altamente stressados pela captura e confinamento, o que acelera a excreção de vírus, 3) o contacto próximo e continuado entre várias espécies, extremamente improvável noutras circunstâncias pelo fato das mesmas serem originárias de locais remotos altamente inacessíveis, 4) a proximidade que estes mercados proporcionam entre o Homem e várias espécies domésticas (incluindo espécies pecuárias e animais de companhia) e 5) o facto dos animais (selvagens e pequenos animais domésticos) serem subsequentemente consumidos, por vezes crus ou mal cozinhados, promovendo o contato íntimo entre vírus e trato intestinal dos novos hospedeiros, proporcionando a infeção.

O **diagnóstico laboratorial** dos coronavírus faz-se por métodos moleculares, altamente sensíveis e específicos (ex. *real time* PCR), por isolamento de vírus em células suscetíveis ou por serologia, no caso de animais não vacinados. O diagnóstico em vida é possível a partir de fezes, sangue, excreções respiratórias, no caso da CoVid-19 e líquido ascítico no caso dos felinos com suspeita de PIF. As lesões macroscópicas *e* a histopatologia podem ser muito informativas *post-mortem*.

Reveem-se de seguida as características de alguns coronavírus dos animais domésticos, incluindo os animais companhia, e do Homem.

1. Coronavírus dos caninos

O **coronavírus entérico canino** (CCoV ou CECoV), pertence ao género Alphacoronavirus, e causa uma gastroenterite ligeira, caracterizada por diarreia, cuja transmissão se faz por via oro-fecal [5]. Esta infeção entérica é comum em cães (*Canis lupus familiaris*) em todo o mundo, tendo também sido registadas epidemias de enterite por coronavírus em cães selvagens [5]. Para além disso, foram detetados coronavírus semelhantes ou idênticos ao CCoV em raposas (*Vulpes vulpes*), cães-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) e gatos-bravos (*Felis silvestris silvestris*) [5]. A doença nos cães é semelhante à causada pelos coronavírus entéricos em outras espécies, ocorrendo destruição das células que revestem as vilosidades intestinais, causando má digestão e má absorção dos alimentos, e consequentemente diarreia [5]. A suspeita clínica de infeção por coronavírus canino deve ser sempre confirmada por testes laboratoriais, geralmente moleculares, uma vez que são muitas as causas possíveis de diarreia. A deteção de anticorpos nos cachorros não permite diagnosticar a doença, uma vez que estes podem ter tido origem no

colostro e representar imunidade passiva [5]. Existe no mercado uma vacina inativada para o controle da infeção pelo coronavírus canino, mas o seu valor protetor é controverso [5].



[3]Identificaram-se também **estirpes do coronavírus canino pantrópicas** (i.e., com tropismo para vários tecidos), atribuídas a doença sistémica grave em cães, caracterizada por febre, anorexia, depressão, vómito, diarreia, leucopenia e sinais neurológicos de ataxia e convulsões [5].

O **coronavírus respiratório canino** (CRCoV) foi identificado pela primeira vez em 2003 em amostras obtidas do trato respiratório de cães com doença respiratória infeciosa (tosse do canil) alojados em abrigos no Reino Unido [5]. Tem também sido frequentemente identificado em cães da Europa, América do Norte e Ásia.

A doença caracteriza-se por tosse seca e metálica. Embora contagiosa, a doença tem geralmente uma expressão ligeira e autolimitante, causando elevada morbilidade mas baixa mortalidade, e ocorrendo geralmente em populações de cães confinados, como por exemplo, em centros de recolha oficiais, alojamentos ou hospitais veterinários [5]. No entanto, a doença pode progredir para uma broncopneumonia potencialmente fatal.

A tosse do canil é considerada uma infeção complexa, multifatorial, na qual estão envolvidos vários agentes virais, nomeadamente o CRCoV, que participa nas fases iniciais da infeção, comprometendo as vias aéreas superiores e propiciando infeções secundárias por outros vírus (como o herpesvírus canino, o vírus da parainfluenza canina, o adenovírus canino tipo 1 e 2, o pneumovírus canino e o vírus da influenza canina), mas também bactérias como *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma spp, Streptococcus* sp, *Pasteurella* sp, *Pseudomonas* sp e vários coliformes [5].

O CRCoV está intimamente relacionado com o coronavírus bovino (BCoV) e o HCoV-OC43, com os quais apresenta identidade nucleotídica no gene que codifica as espículas do invólucro viral, de 97,3% e 96,9% respetivamente, sendo claramente distinto do Coronavírus entérico canino (CCoV ou CECoV) [5]. Tal como o BCoV e o HCoV-OC43, o CRCoV pertence ao género *Betacoronavírus*.

2. Coronavírus dos felinos

A grande maioria das infeções causadas por FCoV, pertencente ao género *Alfacoronavirus*, é benigna, não sendo detetadas ou causando diarreias leves decorrentes de enterite [5]. No entanto, os FCoVs podem ocasionalmente induzir enterites mais graves e infeções persistentes.

De acordo com as propriedades serológicas, os FCoVs são classificados em dois serótipos (I e II), ambos capazes de causar uma forma de doença progressiva, muito mais grave, designada peritonite infeciosa felina (PIF). A PIF pode apresentar-se numa forma "húmida", caracterizada por derrame abdominal característico, ou na forma "seca", sem derrame abdominal [5]. Menos de 10% dos gatos seropositivos a FCoV, desenvolvem PIF [11,12]. Assim, as [4]manifestações patológicas não são apenas uma propriedade específica de uma estirpe de vírus, pois as estirpes



de vírus individuais podem causar qualquer forma da doença em gatos. Com efeito, a patogénese da peritonite infeciosa felina é complexa e não se encontra totalmente esclarecida. A infeção intestinal por coronavírus entérico é central para o desenvolvimento da peritonite infeciosa [5]. A ocorrência esporádica de peritonite infeciosa felina é explicada pelo somatório de mutações do coronavírus entérico durante a infeção natural de gatos, resultando no aparecimento de um vírus com tropismo para as células da linhagem monócitos/macrófagos, ao invés do tropismo para as células epiteliais do intestino [5]. Contudo, em 1989, surgiram evidências de um aumento da infeção *in vitro*, dependente de anticorpos (ADE), em culturas primárias de macrófagos peritoneais de gato infetados por PIFV [13]. O exacerbamento da doença em gatos que foram infetados quando já possuíam imunidade humoral dirigida contra a proteína das espículas, e o facto de gatos imunizados com uma vacina recombinante expressando essa proteína terem morrido mais cedo do que os animais controlo, evidenciou que, também *in vivo*, se verifica um agravamento da doença decorrente da presença de anticorpos não-neutralizantes à medida que a resposta imunitária contra PIF é montada. Esta doença fatal, descrita pela primeira vez em 1963 [10], resulta assim de uma resposta imunitária exagerada à infeção viral, e não modulada, com consequente dano de vários tecidos, devido à formação e deposição de imunocomplexos nos pequenos vasos.

A grande maioria das infeções naturais que ocorrem na Europa e América é causada pelo serótipo I, enquanto que os FCoVs do serótipo II são mais frequentes nos países asiáticos, onde chegam a representar cerca de 25% das infeções naturais, sendo aparentemente mais virulentos [5].

Pensa-se que os coronavírus felinos do serótipo II tenham emergido por dupla recombinação entre o serótipo I do FCoV e o coronavírus dos cães (CCoV), em gatos simultaneamente infetados por estes dois vírus [14]. Nos vírus do serótipo II, um terço (10 kb) do genoma do FCoV serótipo I, foi substituído pelas regiões equivalentes do genoma do CCoV.

Uma vez que os locais em que ocorre a recombinação diferem nos diferentes isolados, percebe-se que os FCoV de ambos os serótipos surjam continuamente devido a episódios de recombinação independentes [5].

Nos FCoVs do serótipo II, a região do genoma que codifica a proteína de ligação ao recetor celular (a chave) tem origem no genoma do CCoV, justificando a utilização de diferentes recetores pelos dois serótipos (FCoV I e II).

Os animais persistentemente infetados eliminam o vírus por períodos prolongados, desempenhando um papel central na disseminação e manutenção de FCoVs nas diferentes populações de gatos. A transmissão ocorre por via fecal-oral [5].

3. Coronavírus dos suínos

A **gastroenterite transmissível dos suínos (TGE)** é uma doença altamente contagiosa dos suínos (*Sus scrofa domesticus*) com distribuição mundial [5], causada por um coronavírus que pertence ao gênero *Alphacoronavirus* [15]. O TGEV replica nos enterócitos intestinais afetando maioritariamente porcos jovens. É caracterizada por diarreia aquosa, vómitos e desidratação. A taxa de mortalidade em leitões recém-nascidos pode atingir os 100% [5], resultando em perdas económicas significativas para as explorações de porcos.

A imunização passiva via colostro, protege eficazmente os leitões recém-nascidos contra a infeção por TGEV, que pode ser alcançada através da imunização de porcas gestantes com vacinas inativadas ou atenuadas [5].

O coronavírus respiratório porcino (PRCoV) surgiu posteriormente, através de deleções genéticas do vírus entérico (TGEV) que resultaram na perda do seu tropismo entérico, adquirindo um padrão de tropismo e transmissão respiratória. Este novo vírus substituiu o seu ancestral entérico em muitas regiões do mundo [5]. Foi identificado pela primeira vez na Bélgica em 1984 e reportado em 1986 na Dinamarca, com base na seroconversão de suínos que se sabiam livres de gastroenterite transmissível. O TGEV está intimamente relacionado com o coronavírus entérico felino e o coronavírus canino. A doença respiratória causada por este coronavírus é geralmente leve ou mesmo subclínica.



[5]A **diarreia epidémica porcina (PED)** é uma doença diarreica de leitões descrita pela primeira vez em porcos na Inglaterra em 1971 [16], tendo-se posteriormente alastrado a outros países europeus e asiáticos [17] e da América do Norte [18]. A doença é causada por um Alphacoronavírus diferente (CV777). O PEDV pode infetar porcos de qualquer idade, de neonatos a porcos adultos, e também javalis. No entanto, a gravidade da doença difere de acordo com a idade, sendo muito mais severa em neonatos e em leitões pré-desmame, onde geralmente induz a morte por diarreia aquosa, às vezes precedida por vómitos. Nesta faixa etária, a mortalidade pode ser muito alta (até 80%) devido a desidratação. Em muitos surtos, os leitões mais velhos não são afetados. A infeção de suínos adultos é frequentemente assintomática, embora possa ocorrer diarreia esporádica [5]. O diagnóstico deve ser confirmado laboratorialmente. Algumas vacinas atenuadas estão disponíveis em alguns países.

A **síndrome da diarreia aguda dos suínos** (SADS), foi identificada pela primeira vez no sul da China, em janeiro de 2017, na sequência de um episódio de mortalidade de cerca de 24,000 leitões. É causada por um coronavírus, **SADS-CoV**, [19], também conhecido por **SeACoV** [20]. A doença caracteriza-se por diarreia aguda e vómito, causando uma mortalidade superior a 90% em leitões com menos de 5 dias de idade [5]. O genoma do SADS-CoV partilha uma identidade genética muito elevada (98,5%) com um coronavírus de morcegos pertencente do género *Rhinolophus*, que são também considerados os reservatórios do SARS-CoV. A identificação do

SADS-CoV poderá constituir a primeira evidencia de um "salto" viral (*spillover*) de uma espécie animal selvagem para uma espécie doméstica, sem requisito de espécie intermediária.

O **deltacoronavírus porcino** (PDCoV), é um vírus entérico dos suínos, com tropismo para o trato gastrointestinal, semelhante ao TGEV e PEDV, foi descoberto em animais saudáveis na China em 2012, no decurso de investigações epidemiológicas [21]. Dois anos depois, este vírus foi identificado em suínos com diarreia grave, vómitos e enterite atrófica nos Estados Unidos e na China [22]. As manifestações clínicas são semelhantes ao TGEV ou PEDV. Foram relatadas infeções graves em leitões nos Estados Unidos, em 2014, com alta mortalidade sem o envolvimento de outros agentes patogénicos [23]. No entanto, registam-se coinfecções com PEDV, rotavírus e PDCoV [24].

O vírus da **encefalomielite hemaglutinante porcina (PHEV)** é o único coronavírus porcino neurotrópico produzindo sintomas neurológicos em porcos suscetíveis, e alta mortalidade em leitões nas primeiras semanas de vida. A infeção ocorre por via oral-nasal, atingindo os plexos do nervo gástrico e entérico e causando glanglioneurite com comprometimento do sistema nervoso central (SNC) por encefalomielite. As manifestações clínicas incluem anorexia, tremor e paraparesia [5].

Devido às suas características, este vírus induz aglutinação de eritrócitos de várias espécies, como murganhos, ratos e galinhas.

4. Coronavírus dos bovinos

Os coronavírus dos bovinos (*Bos taurus*) foram identificados pela primeira vez como os agentes causais de diarreia dos vitelos nos Estados Unidos em 1973 [25] e, desde então, são reconhecidos mundialmente pela sua associação a três síndromes clínicas, com um impacto económico considerável, nomeadamente a diarreia dos vitelos, a disenteria de inverno com diarreia hemorrágica em adultos [26,27] e infeções respiratórias em bovinos de várias idades. Estas infeções pertencem ao complexo das doenças respiratórias dos bovinos ou febre de remessa de bovinos confinados. O BCoV é geneticamente muito próximo do HCoV-OC43, tendo sido sugerido que o vírus humano resultou de uma transmissão zoonótica do BCoV, a partir de bovinos infetados [28].



[6]

A **diarreia dos vitelos** que ocorre maioritariamente em bezerros com menos de 3 semanas de idade, após o declínio de anticorpos maternos, é causada pela coinfeção do BCoV em conjunto com outros agentes patogénicos entéricos, nomeadamente rotavírus, torovírus, criptosporídeos e estirpes *Escherichia coli* enterotoxigénicas, sendo a gravidade da diarreia resultante dos efeitos cumulativos dos vários agentes envolvidos [28]. A diarreia dos vitelos é geralmente sazonal, sendo mais comum no inverno, em parte devido à maior estabilidade do vírus a baixas temperaturas.

A **disenteria de inverno** (diarreia hemorrágica) é uma doença aguda e esporádica do gado adulto, que ocorre em todo o mundo, sendo causada pelo BCoV [5].

A doença é caracterizada por diarreia explosiva, geralmente com sangue, acompanhada de diminuição da produção de leite, depressão, anorexia e alterações respiratórias frequentes. As taxas de morbilidade variam de 20 a 100% nos núcleos afetados, mas as taxas de mortalidade são geralmente baixas (1–2%) [5]. Em outros ungulados em cativeiro e em estado livre, ocorre uma síndrome semelhante à disenteria de inverno associada a variantes de coronavírus bovino, o que sugere que certos ungulados selvagens (os) que partilham áreas de pastagem comuns com o gado, podem ser um reservatório para estirpes de coronavírus transmissíveis ao gado, ou vice-versa [29].

O coronavírus bovino causa também **infeções respiratórias em bovinos** de várias idades [5], sendo responsável por doença respiratória leve (tosse, rinite) ou pneumonia em bezerros com 2 a 6 meses de idade. Um estudo epidemiológico em bezerros desde o nascimento até às 20 semanas de idade confirmou a excreção fecal e nasal do coronavírus, com destaque para a diarreia na infeção inicial. Posteriormente, ocorreu eliminação intermitente pela via respiratória, com ou sem sinais de doença, o que sugere que a imunidade local a longo prazo no trato respiratório superior seja ineficaz na mediação da eliminação do vírus. Embora muitos coronavírus possuam uma gama de hospedeiro restrita, os *Betacoronavírus*, como é o caso dos coronavírus dos bovinos, e também do coronavírus do SARS, podem infetar outras espécies de

animais, incluindo a fauna selvagem. Com efeito, o BCoV pode também estar associado a doença respiratória nos cães e a episódios de doença intestinal ligeira nos humanos [5].

5. Coronavírus dos equinos

O **coronavírus equino** (ECoV) é um *Betacoronavírus* [5] com associação clínica e epidemiológica a febre, depressão, anorexia e menos frequentemente, cólica e diarreia em cavalos adultos. A via de transmissão é [7]provavelmente fecal-oral, ocorrendo eliminação de vírus pelas fezes dos cavalos infetados, quer estes exibam sinais de doença, quer sejam assintomáticos. As complicações mais graves são raras e incluem septicemia e endotoxémia por rotura da barreira gastrointestinal, e encefalopatia associada à hiperamonémia, O vírus infecta principalmente a mucosa do intestino delgado, causando enterite. A doença é geralmente autolimitada, ocorrendo habitualmente recuperação facilitada pela aplicação de suporte clínico. O ECoV é um vírus próximo do coronavírus bovino (BCoV) [30,31].



6. Coronavírus das aves

O **vírus da Bronquite Infeciosa** (IBV), pertence ao género Gamacoronavírus e é o agente etiológico de uma doença aguda das galinhas (*Gallus gallus*) [32]. Como outros coronavírus, caracteriza-se pela sua rápida disseminação e notável capacidade de alteração do seu genoma, quer por mutação quer por recombinação genética [33]. Outras aves, selvagens e domésticas, como perus, faisões e pintadas, são suscetíveis à infeção pelo IBV [33]. A taxa de morbilidade em galinhas atinge os 100% e a mortalidade pode ser superior a 50%, se ocorrerem infeções bacterianas secundárias [34]. Para além de causar doença respiratória e renal, este coronavírus aviário pode também afetar o aparelho reprodutor, levando a quebras acentuadas da produção e diminuição da qualidade dos ovos cujas cascas ficam quebradiças e rugosas. O IBV pode também originar proventriculites [35].

[8]O coronavírus aviário foi detetado pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em Massachusetts no ano de 1937, e durante muito tempo o serótipo "Mass" foi o único conhecido. Atualmente, o IBV tem distribuição mundial e conhecem-se vários serótipos e genótipos [36].



A bronquite infeciosa representa uma ameaça para a avicultura, a nível mundial [36]. As regras de biossegurança e a vacinação são as medidas utilizadas para o controlo desta doença. No entanto a variação antigénica do IBV contorna frequentemente a vacinação, porque os vários serótipos e genótipos não produzem, na maior parte das vezes, proteção cruzada [36].

A deteção de vírus IBV em aves selvagens saudáveis, tem reforçado a hipótese destas aves atuarem como reservatórios naturais destes vírus para as aves domésticas [37]. O aparecimento

na Europa da variante QX, originária da China, deve-se, muito possivelmente, à disseminação por aves selvagens migratórias [38]. A vigilância e a identificação das variantes virais em circulação, são essenciais para controlar a transmissão de variantes de IBV emergentes. Não há nenhuma descrição de infeção pelo IBV em humanos [39].

O **coronavírus dos perus** (TCoV) é o agente etiológico de uma doença entérica e aguda dos perus, denominada enterite dos perus ou enterite transmissível dos perus (*bluecomb disease* em Inglês) [40]. Esta doença afeta perus [9](*Meleagrisis gallopavo*) de todas as idades, mas a sua gravidade é maior nas aves mais jovens, provocando elevados danos económicos, decorrentes do aumento da taxa de mortalidade e do fraco índice de conversão alimentar [40]. O TCoV está presente no intestino e nas fezes, sendo a transmissão efetuada pela via fecal-oral. As aves que recuperam da doença, excretam o vírus nas fezes durante várias semanas, possibilitando a disseminação entre bandos e explorações avícolas [41]. Apesar de não haver registo de casos de doença entérica por TCoV em galinhas, alguns estudos experimentais comprovaram que o vírus tem capacidade para replicar no intestino desta espécie, levantando a hipótese de as galinhas poderem ser vetores da infeção para os perus [42].



O TCoV é também um dos agentes causais da síndrome da enterite e da mortalidade dos perus jovens, PEMS (*poult enteritis- mortality syndrome*), síndrome de etiologia multifatorial, onde estão implicados outros agentes virais [43]. Os perus com idade inferior a quatro semanas são os mais atingidos, apresentando atraso de crescimento, diarreia e disfunção imunitária. A taxa de morbilidade é elevada [44].

7. Coronavírus dos humanos

Foram identificados vários coronavírus capazes de infetar humanos (HCoV), causando geralmente infeções ligeiras. São eles, **o HCoV-229E, o HCoV-NL63, o HCoV-OC43 e o HCoV-HKU1**, que circulam globalmente na população humana, e são responsáveis por cerca de um terço das constipações que ocorrem em humanos [45]. Contudo, em casos graves, os quatro HCoVs acima referidos podem também causar pneumonias e bronquiolites graves, especialmente em idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas [46,47]. Para além dos sintomas respiratórios, estes coronavírus humanos podem causar doenças entéricas e neurológicas [48].

O coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (**MERS-CoV**) emergiu na Arábia Saudita em 2012, causando uma epidemia em humanos [51]. Os sintomas clínicos são semelhantes aos da SARS mas a taxa de mortalidade é bastante maior, de cerca de 35% [52]. A transmissão do MERS-CoV revelou-se, contudo, mais limitada. Os dromedários (*Camelus dromedarius*) foram identificados como a espécie intermediária destes vírus [51].

O **SARS-CoV-2**, cuja espécie reservatório é ainda desconhecida, emergiu em dezembro de 2019 na província de Wuhan, na China [53]. A doença é altamente contagiosa resultando numa pandemia que afeta atualmente 205 países, tendo, desde a sua descoberta, causado a morte a mais de 61 000 pessoas (5 abril 2020). A origem do SARS-CoV2 não está ainda esclarecida [53]. Embora o vírus tenha revelado uma elevada similaridade genética (96,3%) com um coronavírus previamente identificado numa espécie de morcegos-de-ferradura- (*Rhinolophus affinis*) no

sudoeste da China; este vírus (Bat-CoV-RaTG13) não possui o mesmo ligando (chave) que o vírus SARS-CoV-2 possui, não podendo por isso utilizar o recetor celular humano (designado ACE2) para a entrada nas células alvo. Por esta razão o Bat-CoV-RaTG13 não tem capacidade de infetar células humanas [54].



[10]

No decurso das investigações realizadas desde a emergência desta pandemia, verificou-se que a região do ligando ("chave" para entrada na célula) de um coronavírus de pangolim-malaio (*Manis javanica*), descoberto em 2019, apresentava elevada identidade com a "chave" do SARS-CoV-2, apoiando a hipótese de que o SARS-CoV-2 pudesse ter resultado de uma recombinação genética natural entre coronavírus com dois hospedeiros animais diferentes [55]. O genoma do Pangolim-CoV possui 91,02% de similaridade nucleotídica com o genoma SARS-CoV-2, tendo sido sugerido que os pangolins possam ser uma espécie candidata à origem da SARS-CoV-2 [56]. No entanto, é importante sublinhar que, nesta fase, quer o pangolim, quer outra espécie, não foram ainda consideradas espécies intermediárias ou de amplificação no surto de SARS-CoV-2.

Foi também levantada a hipótese de que este **vírus pudesse ser uma construção humana**, libertada no ambiente de forma deliberada ou acidental. Esta possibilidade foi rejeitada pela análise genómica do SARS-CoV2, que revelou claramente a origem natural deste vírus. Assim, constata-se que a evolução genética do SARS-CoV-2 lhe conferiu a capacidade de se ligar com elevada eficiência ao recetor ACE2 que está presente na superfície de vários tipos de células humanas. A eficiência e estabilidade desta ligação parece facilitar a dispersão viral de pessoa-para-pessoa e justificar a facilidade com que se transmite [54].

Estão a ser feitos esforços no sentido de se perceber qual o espetro de hospedeiros do SARS-CoV2. A capacidade do SARS-CoV-2 se transmitir e infetar outras espécies de mamíferos além do Homem foi avaliada por inoculação de várias linhas de células de mamíferos e simulada em computador, de acordo com a potencial capacidade do ligando viral se poder ligar ao recetor ACE2, que o SARS-CoV2 utiliza [57]. Entretanto também foram reportadas à OIE deteções de RNA viral em dois cães e em um gato, pertencentes a doentes Covid-19. Não havendo informação sobre cargas virais, a deteção de ácidos nucleicos em zaragatoas orais, nasais e fecais destes animais de companhia, não permite, contudo, excluir que possa ter ocorrido apenas transmissão passiva do Homem para estes animais, sem replicação viral. Nenhum destes animais desenvolveu sintomatologia respiratória durante o contacto com humanos infetados, e a tentativa de isolamento de vírus não foi bem-sucedida, pelo que não pode demonstrar a presença de vírus infecioso. Recentemente foi também divulgado um estudo, antes de sua avaliação e validação por especialistas, com dados de infeções experimentais de algumas

espécies animais com SARS-CoV-2. Com base neste ensaio, o SARS-CoV-2 infeta ineficientemente cães, porcos, galinhas e patos, mas eficientemente furões e gatos, podendo ocorrer nesta última espécie transmissão gato-a-gato por gotículas respiratórias [58].

Também o Laboratório Nacional Veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) reportou a noticia da infeção de um tigre do Parque Zoológico Bronx de Nova York, não disponibilizando, conquanto, a técnica [11]de diagnóstico utilizada. Embora apenas um tigre tenha sido testado, tanto este animal como outros tigres e leões do mesmo Zoo apresentaram sinais respiratórios de tosse seca. [12] Supõe-se que estes felídeos tenham sido infetados a partir de um tratador SARS-CoV-2-positivo, assintomático.



Decorrem na China ensaios de infeção de macacos-*rhesus* e ratinhos transgénicos que possuem o gene ACE2 humano e de furões na Austrália [59].

A elevada taxa de transmissão da doença entre humanos e o potencial patogénico não são as únicas preocupações relativamente ao SARS-CoV2. Os coronavírus são mais frágeis do que os vírus nus (vírus sem invólucro, como por exemplo os parvovírus e os calicivírus), mas bastante mais **resistentes no ambiente** [60] do que a maioria dos outros vírus com invólucro (como por exemplo, o vírus da gripe), o que dificulta o seu controlo. Alguns estudos permitiram esclarecer que o SARS-CoV2 é estável em plástico e aço inoxidável e pode persistir infecioso até 72 horas após a sua aplicação nestas superfícies, embora o título do vírus decaía no plástico de $10^{3,7}$ para $10^{0,6}$ TCID50/mL após 72 horas, e no aço inoxidável de $10^{3,7}$ a $10^{0,6}$ TCID50/mL em 48 horas [69]. Em superfícies de cobre, o vírus não se mantém infecioso ao fim de quatro horas, embora em papelão o vírus se mantenha infecioso por 24 horas [61].

A informação cientifica disponibilizada sobre os melhores **desinfetantes capazes de promover a inativação do SARS-CoV2** está já disponível [62].

As recomendações da OMS incluem a higienização frequente das instalações, através da utilização de água e detergente e a aplicação de hipoclorito de sódio (lixivia) a 0,1%. Para a desinfeção de superfícies menores (bancadas de trabalho, por exemplo) é recomendada a utilização de etanol a 70%. Para a descontaminação das mãos é recomendada a lavagem com água e sabão e a aplicação de etanol a 75% ou 80% ou 2-Propanol a 75%. Todas as medidas de controle devem ser realizadas frequente e consistentemente.

Considerações Finais

A globalização proporciona o continuado movimento de massa de pessoas por todo o mundo, cria novas oportunidades para a disseminação e estabelecimento de doenças infeciosas comuns na população a nível mundial. Determinadas práticas, de que são exemplo a proximidade ou o consumo de espécies animais selvagens de localização remota, algumas em perigo de extinção, e cujo estatuto sanitário é totalmente desconhecido, desempenham um papel importante na emergência de novas epidemias. A movimentação de animais dentro da União Europeia (UE)

obedece a legislação muito específica, exigindo a rastreabilidade e comprovativos sanitários para algumas doenças e quarentenas obrigatórias. Relativamente à entrada de espécies animais (e seus produtos) provenientes de países terceiros o seu controlo realiza-se ao nível dos Postos de Inspeção Fronteiriços, aplicando-se a legislação da UE harmonizada, a que os países terceiros se obrigam a cumprir, com base em informação recolhida por um sistema de vigilância epidemiológica que assegura a monitorização das doenças de animais domésticos e selvagens, tendo como base testes laboratoriais validados, bem como a implementação de medidas de controlo, como o isolamento pré-expedição ou imunização ativa. Para as espécies animais para as quais não há legislação harmonizada, aplica-se a legislação nacional, com base na análise de risco efetuada pela autoridade competente nacional.

No domínio de "Uma Só Saúde" (*One Health*), as infeções por coronavírus são alvos prioritários de abordagem sistemática no âmbito da medicina da conservação, uma ciência multidisciplinar com enfoque nas relações patogénicas entre o ser humano, a fauna e os ecossistemas. Apenas através do desenvolvimento e aplicação de práticas de gestão de saúde, de políticas públicas e programas científicos concertados, se poderá alcançar o equilíbrio ambiental essencial à saúde animal e humana. A identificação das variáveis de risco associadas à interconexão entre pessoas, animais, plantas e seu ambiente compartilhado, são fundamentais para se prever e prevenir a emergência e reemergência de epidemias por coronavírus ou por outros agentes patogénicos.

Referências Bibliográficas

Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Van Reeth K, Nauwynck H, et al. Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. J Virol. 2006;80: 7270–7274. doi:10.1128/jvi.02675-05

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses. An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. RNA Biol. 2011;8: 270–279. doi:10.4161/rna.8.2.15013

Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. Methods Mol Biol. 2015;1282: 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7

Wertheim JO, Chu DKW, Peiris JSM, Kosakovsky Pond SL, Poon LLM. A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses. J Virol. 2013;87: 7039–7045. doi:10.1128/jvi.03273-12

MacLachlan N., Dubovi EJ, editors. Fenner's Veterinary Virology. 5th ed. Elsevier; 2016.

de Groot R, Baker S, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya A, Holmes K, et al. Part II – The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses Family Coronaviridae. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. pp. 806–828. doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9

Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. Coronavirus humains (HCoV). Pathol Biol. 2009;57: 149–160. doi:10.1016/j.patbio.2008.02.018

Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses Coronaviruses: Emerging and re-emerging pathogens in humans and animals Susanna Lau Positive-strand RNA viruses. Virol J. 2015;12: 1–10. doi:10.1186/s12985-015-0422-1
Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. J Autoimmun. 2020; 102433. doi:10.1016/j.jaut.2020.102433
Holzworth J. Some important disorders of cats. Cornell Vet. 1963;53: 157–160.
ADDIE DD, JARRETT O. A study of naturally occuring feline coronavirus infections in kittens. Vet Rec. 1992;130: 133–137.
Kennedy M, Citino S, Hillis McNabb A, Serino Moffatt A, Gertz K, Kania S. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. J Vet Diagnostic Investig. 2002;14: 520–522. doi:10.1177/104063870201400615
Stoddart, C. A., and F. W. Scott. 1988. Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions. J. Leukocyte Biol. 44: 319-328.
Hohdatsu T, Okada S, Koyama H. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. Arch Virol. 1991;117: 85–95.
Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. Adv Virus Res. 2006;65: 193–292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol. 1978;58: 243–247. doi:10.1007/BF01317606
Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes. 2012;44: 167–175. doi:10.1007/s11262-012-0713-1
Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the united states. MBio. 2013;4: 1–8. doi:10.1128/mBio.00737-13
Zhou P, Fan H, Lan T, Yang X Lou, Shi WF, Zhang W, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. Nature. 2018;556: 255–259. doi:10.1038/s41586-018-0010-9
Pan Y, Tian X, Qin P, Wang B, Zhao P, Yang Y Le, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. Vet Microbiol. 2017;211: 15–21. doi:10.1016/j.vetmic.2017.09.020
Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. J Virol. 2012;86: 3995–4008. doi:10.1128/jvi.06540-11
Song C, Zhang S, Huang H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. Front Microbiol. 2015;6: 1–18.

doi:10.3389/fmicb.2015.01049
Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. Emerg Infect Dis. 2014;20: 917–919. doi:10.3201/eid2005.140195
Marthaler D, Jiang Y, Collins J, Rossow K. Porcine Deltacoronavirus from the United States. Genome Announc. 2014;2: 2–3. doi:10.1128/genomeA.00218-14.Copyright
Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus M. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. Amer J Vet Res. 1973;34: 145–150.
Saif LJ. Bovine Respiratory Coronavirus. Vet Clin North Am Food Anim Pr 2010. 2010;26: 349–365. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.005
Saif LJ. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? Cornell Vet. 1990;80: 303–311.
Kin N, Miszczak F, Diancourt L, Caro V, Moutou F. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. Infect Genet Evol J. 2015;40: 186–191. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.006
Amer HM. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. Anim Heal Res Rev. 2019. doi:10.1017/S1466252318000117
Miszczak F, Tesson V, Kin N, Dina J, Balasuriya UBR, Pronost S, et al. First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe. Vet Microbiol. 2014;171: 206–209. doi:10.1016/j.vetmic.2014.03.031
Pusterla N, Vin R, Leutenegger CM, Mittel LD, Divers TJ. Enteric coronavirus infection in adult horses. Vet J. 2018;231: 13–18. doi:10.1016/j.tvjl.2017.11.004
González JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. Arch Virol. 2003;148: 2207–2235. doi:10.1007/s00705-003-0162-1
Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res. 2007;38: 281–297. doi:10.1051/vetres:2006055
Jackwood A, Mark W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World Published By : American Association of Avian Pathologists Invited Review — Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. Avian Dis. 2012;56: 634–641.
Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, et al. Characterization of Three Infectious Bronchitis Virus Isolates from China Associated with Proventriculus in Vaccinated Chickens. Avian Dis. 2001;45: 416. doi:10.2307/1592981
Cook JKA, Jackwood M, Jones RC. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathol. 2012;41: 239–250. doi:10.1080/03079457.2012.680432

Miłek J, Blicharz-Domańska K. Coronaviruses in avian species-review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. J Vet Res. 2018;62: 249–255. doi:10.2478/jvetres-2018-0035
Franzo G, Massi P, Tucciarone CM, Barbieri I, Tosi G, Fiorentini L, et al. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. PLoS One. 2017;12: 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0184401
OIE. OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.3.2.-Avian Infectious Bronchitis. 2018.
Guy JS. Turkey Coronavirus Enteritis. 12th ed. In: Saif, Y.M., Fadly A.M., Glissen J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. SDE, editor. In: Diseases of Poultry. 12th ed. Wiley-Blackwell; 2008. pp. 330–338.
Jindal N, Mor SK, Goyal SM. Enteric viruses in turkey enteritis. VirusDisease. 2014;25: 173–185. doi:10.1007/s13337-014-0198-8
Ismail MM, Tang Y, Saif YM. Pathogenicity of Turkey Coronavirus in Turkeys and Chickens. Avian Dis. 2003;47: 515–522. doi:10.1637/5917
Ismail MM, Cho KO, Hasoksuz M, Saif LJ, Saif YM. Antigenic and Genomic Relatedness of Turkey-Origin Coronaviruses, Bovine Coronaviruses, and Infectious Bronchitis Virus of Chickens. Avian Dis. 2001;45: 978. doi:10.2307/1592877
Awe OO, Kang K, Ibrahim M, Ali A, Elaish M, Saif YM, et al. Age-Related Susceptibility of Turkeys to Enteric Viruses. Avian Dis. 2015;59: 207–212. doi:10.1637/10907-071514-reg
Groth L. Coronavirus Symptoms vs Cold: How Do They Compare? In: Coronavirus [Internet]. 2020 [cited 27 Mar 2020]. Available: https://www.health.com/condition/infectious-diseases/coronavirus/coronavirus-symptoms-vs-cold
Gerna G, Campanini G, Rovida F, Percivalle E, Sarasini A, Marchi A, et al. Genetic Variability of Human Coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-Like Strains and Their Association With Lower Respiratory Tract Infections of Hospitalized Infants and Immunocompromised Patients. J Med Virol. 2006;78: 938–949. doi:10.1002/jmv
Zhang S fen, Tuo J ling, Huang X bin, Zhu X, Zhang D mei, Zhou K, et al. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. PLoS One. 2018;13: 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0191789
Xu J, Zhong S, Liu J, Li L, Li Y, Wu X, et al. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in the Brain: Potential Role of the Chemokine Mig in Pathogenesis. Clin Infect Dis. 2005;41: 1089–1096. doi:10.1086/444461
Schneider E. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Netter's Infect Dis. 2012; 537–543. doi:10.1016/B978-1-4377-0126-5.00089-6

Lam WK, Zhong NS, Tan WC. Overview on SARS in Asia and the World. Respirology. 2003;8: 29–32. doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00516.x
Sharif-Yakan A, Kanj SS. Emergence of MERS-CoV in the Middle East: Origins, Transmission, Treatment, and Perspectives. PLoS Pathog. 2014;10. doi:10.1371/journal.ppat.1004457
Alsolamy S, Arabi YM. Letter To the Editor. Can J Respir Ther. 2015;51: 102–103.
Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med. 2020;89: 44–48. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. CelPress. 2020; 1–6. doi:10.1016/j.cub.2020.03.022
Ping Liu, Wu Chen and Jin-Ping Chen,Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (Manis javanica) viruses
Tao Zhang, Qunfu Wu, and Zhigang Zhang, 2020, Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. Current Biology 30, 1346–1351 April 6, 2020 a 2020 Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022
Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. 2020; 1–10. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
Hualan C. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. 2020; 1–23.
Callaway E. Labs rush to study coronavirus in transgenic animals — some are in short supply. 2020. Available: https://www.nature.com/articles/d41586-020-00698-x
Rabenau HF, Kampf G, Cinatl J, Doerr HW. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. J Hosp Infect. 2005;61: 107–111. doi:10.1016/j.jhin.2004.12.023
Doremalen NV, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1. Medxriv. 2020. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020;104: 246–251. doi:10.1016/j.jhin.2020.01.022

Article printed from Veterinaria Atual: **https://www.veterinaria-atual.pt**

URL to article: **https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/os-coronavirus-dos-animais-e-do-homem-das-infecoes-assintomaticas-as-sindromes-respiratorias-agudas/**

URLs in this post:

[1] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Tabela-final-artigo-coronavirus.png**
[2] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Imagem-artigo-coronavírus.png**
[3] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2018/07/cão-Veterinária-Atual-1.jpg**
[4] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2019/09/gato-veterinária-atual.jpg**
[5] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2016/04/suínos-Veterinária-Atual.jpg**
[6] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2017/09/bovinos-Veterinária-Atual-.jpg**
[7] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2015/07/equino3.jpg**
[8] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2016/03/galinhas-Vida-Rural.jpg**
[9] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2015/07/perus.jpg**
[10] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/02/little-ant-eater-grazing-for-food-picture-id155261042-1.jpg**
[11] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Vet-Atual-tigre-da-Malásia.jpg**
[12] Embora apenas um tigre tenha sido testado, tanto este animal como outros tigres e leões do mesmo Zoo apresentaram sinais respiratórios de tosse seca.: **https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/um-tigre-em-nova-iorque-um-gato-na-belgica-qual-e-a-historia-do-sars-cov-2-e-dos-felinos/**

Copyright © 2015 Veterinaria Atual. Todos os direitos reservados.

Veterinária Atual

Mensal nº143/ Novembro 2020

TEXTO TÉCNICO

As principais ameaças infeciosas à saúde dos leporídeos selvagens de Portugal

As espécies de leporídeos em Portugal podem ser afetadas por doenças causadas por diferentes agentes etiológicos de origem viral, cujo impacto é mais visível nas populações por surgirem na forma de surtos epidémicos, mas também bacteriana, parasitária e fúngica.

Texto: *Fábio A. Abade dos Santos, Carina Carvalho, Jéssica Monteiro, Teresa Fagulha, Teresa Albuquerque, Jacinto Gomes, Margarida Duarte (INIAV, I.P.) Pedro Melo, Patrícia Tavares Santos (DGAV)*

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) e o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) são as únicas espécies de leporídeos selvagens existentes em Portugal e, à semelhança de outras, como a salamandra-lusitânica, o tritão-de-ventre-laranja, lince-ibérico, ruicavo-do-oeste e a boga-portuguesa, são espécies autóctones, profundamente adaptadas aos seus territórios de origem, constituindo um património genético e uma riqueza inestimável para a biodiversidade dos ecossistemas locais. O seu valor é reconhecido em múltiplas esferas de atividade da sociedade e a relevância do papel dos leporídeos selvagens faz-se sentir claramente nos setores social e económico, nomeadamente no impacto que têm na preservação das tradições, no turismo da natureza, na atividade cinegética e, indiretamente, no turismo rural e na hotelaria.

A subspécie *Oryctolagus cuniculus* algirus é originária da Península Ibérica, sendo a subespécie maioritariamente presente em Portugal, ocupando também cerca de metade do território de Espanha. A densidade populacional do coelho-bravo foi outrora muito elevada no nosso país, levando muitas vezes a prejuízos agrícolas. Porém, nas últimas décadas, as populações de coelho-bravo sofreram uma diminuição acentuada, quer em número, quer em distribuição geográfica, estimando-se que atualmente existam apenas 5 a 10% da população de há 50 anos e que, ainda assim, o coelho-bravo se encontre em diminuição acrescida de cerca de 20% por ano na Península Ibérica[1].



Figura 1 – Resumo dos principais agentes patogénicos que afetam os leporídeos. A manutenção de uma boa imunidade de grupo no seio destas populações só é possível através de práticas de gestão cinegética integradas que envolvam a adequada gestão do *habitat*, o correto maneio dos animais, o cumprimento da certificação dos animais translocados e o fomento de alimentação, especialmente nos meses de maior escassez. Estes aspetos favorecem a boa condição corporal dos animais,e, consequentemente, uma melhor resposta imunitária. A correta gestão de todos estes fatores depende dos dados obtidos nos programas de monitorização sanitária das populações selvagens e do conhecimento gerado pelos programas de investigação na área da sanidade animal.

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), é também endémica da Península Ibérica e a única espécie de lebre existente em Portugal, estendendo-se pelo sudoeste de Espanha. A lebre-ibérica é a mais pequena das seis espécies de lebre existentes na Europa, pesando em adulta 2 a 2,6 kg e atingindo 44 a 50 cm, sendo as fêmeas ligeiramente maiores que os machos.

A lebre-ibérica é encontrada em *habitats* diversos, contudo, não tanto como o coelho-bravo. Prefere zonas de planalto, alternadas com zonas de algum mato denso, sendo também encontrada em olivais, sementeiras de girassol, vinhas e diversos pomares de fruta. À semelhança do que acontece com o coelho-bravo, não apresenta dimorfismo sexual, embora os olhares experientes consigam diferenciar o sexo com alguma certeza em ambas as espécies, pelo tamanho, postura e características morfológicas.

Estas duas espécies de leporídeos são espécies-chave nos ecossistemas mediterrânicos, assumindo um lugar basilar nas diversas e complexas cadeias tróficas que envolvem muitas espécies de predadores. O coelho-bravo é uma das principais presas de pelo menos 27 espécies de aves de rapina, 11 espécies de carnívoros e duas espécies de serpentes. Entre elas destacam-se o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*), espécies com estatuto de conservação ameaçado, associado à diminuição das populações de coelho-bravo.

Não obstante a sua importância ser há muito reconhecida, a diminuição das populações selvagens de coelho-bravo e de lebre-ibérica vem ocorrendo continuadamente há várias décadas, levando a que, em 2019, o coelho-bravo fosse, pela primeira vez na história, classificado como "em perigo" pela União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN). Embora atualmente as populações da lebre-ibérica sejam ainda consideradas estáveis, a sua redução progressiva, aliada à emergência recente de doenças infeciosas graves de origem viral, irão certamente desencadear a reclassificação para um estatuto de maior preocupação.

Entre os fatores extrínsecos que afetam os leporídeos encontra-se a perda de *habitat* e sua fragmentação, devido à alteração das práticas agrícolas, à desertificação do mundo rural, aos incêndios florestais, assim como a caça e predação excessivas e, sobretudo, a emergência de doenças infeciosas. Este trabalho pretende rever as doenças e agentes que afetam, ou podem vir a afetar, os leporídeos em Portugal e cujo impacto nas populações pode conduzir a reduções mais ou menos significativas, algumas com risco para a saúde pública por se tratar de doenças zoonóticas.

1. Mixomatose

A mixomatose é uma doença endémica em Portugal causada por um leporipoxvírus que afeta o coelho-bravo desde a sua emergência na Europa nos anos 1950, resultado da introdução intencional como arma biológica para controlo das populações excessivas de coelho-bravo. Entretanto reportada em quase todo o mundo, a mixomatose está atualmente presente de forma endémica na Península Ibérica e em outros países da Europa, assim como na Austrália



Figura 2 – Exemplar adulto de lebre-ibérica (Fotografia de Sebastião Miguel).

e na América do Sul, de acordo com as notificações de doença à OIE em 2019.
No coelho-europeu, a doença pode apresentar-se em duas formas, uma caracterizada por lesões cutâneas (forma nodular ou típica) e outra caracterizada por insuficiência respiratória (forma atípica). Aquando da sua emergência, a mixomatose reduziu drasticamente as populações de coelho-bravo na Europa para 5-10% dos seus números iniciais[2], originando formas de doença hiperaguda com mortalidade próxima dos 100%. Não obstante a resistência das populações de coelho-bravo à doença tenha aumentado de forma gradual ao longo dos anos, neste momento continua a causar grande mortalidade na forma de surtos epidémicos que, em Portugal, se verificam principalmente na primavera e verão.
A mixomatose, considerada uma doença dos coelhos durante décadas por apenas se verificarem casos extremamente esporádicos em algumas espécies de lebre (nomeadamente na lebre-da-montanha e na lebre-europeia), emergiu na lebre-ibérica de forma comprovada e preocupante no final do ano de 2018, primeiro em Espanha e depois em Portugal, sendo atualmente uma das grandes ameaças à estabilidade das populações selvagens. Após a sua emergência, verificou-se uma quebra nas densidades populacionais de todo o território nacional que se estima ter sido superior a 75%, e que acentuou a diminuição gradual verificada nas últimas décadas. De acordo com um inquérito recente a cerca de 700 caçadores portugueses, em alguns locais, essa redução chegou a 75 a 100%, sendo por isso extremamente preocupante.

2. Doença hemorrágica viral

A doença hemorrágica viral é outra doença endémica que afeta o coelho em Portugal e em vários países do mundo. É causada por um vírus de RNA, género Lagovírus pertencente à família *Caliciviridae*. Emergiu na Europa em 1986, disseminando-se rapidamente a partir de 1988, ano em que foi também identificada pela primeira vez em Portugal, nomeadamente na Região Autónoma da Madeira. Nos anos seguintes, a doença progrediu para a Região Autónoma dos Açores e para o Continente. Uma nova variante da doença causada por um novo vírus (RHDV2), altamente contagiosa, foi detetada em 2010, em França; em 2011, em Espanha; e em 2012, em Portugal, causando elevada morbilidade e mortalidade e afetando os coelhos de todas as faixas etárias, tanto domésticos como selvagens. Progressivamente, as estirpes de RHDV2 substituíram as estirpes de RHDV anteriores.
Existem vários vírus geneticamente diferenciáveis a circular em Portugal, genericamente designados RHDV2 considerando a sua composição (proteínas estruturais presentes na partícula viral), mas que incluem também vírus recombinantes cujos genes codificam proteínas não estruturais com origem em vírus diferentes (RHDV, RHDVa, NP-RCV). O seu aparecimento levou igualmente a mortalidades superiores a 90% das populações de coelho-bravo. Atualmente, a DHV representa provavelmente a maior ameaça para as populações selvagens e coelho-bravo, pela menor capacidade de adaptação do hospedeiro a este vírus comparativamente ao vírus da mixomatose.
Os sinais vulgarmente associados a esta doença são a mortalidade súbita de vários animais, a observação de movimentos espásticos dos membros e aparecimento de sangue nas narinas. À necropsia, os sinais mais vulgarmente presentes são a descoloração do fígado e padrão congestivo-hemorrágico nos pulmões e outros órgãos.
A DHV não afetou, desde a sua emergência até à atualidade, a lebre-ibérica, embora este vírus tenha sido detetado esporadicamente em outras espécies de lebre, nomeadamente na lebre-da-montanha[3], na lebre-europeia[4,5] e na lebre-da-Córsega[6]. Assim, face à forte possibilidade de a lebre-ibérica poder vir também a ser afetada, é importante incluir-se este agente nos programas de monitorização sanitária.

3. Síndrome da lebre europeia castanha

A síndrome da lebre europeia castanha (EBHS) é também causada por um vírus de RNA de cadeia simples (EBHSV), pertencente ao género Lagovirus, família *Ca-*





Figura 3 – Lesões (vesículas e vesículo-pústulas) presentes numa lebre morta com LeHV-5

liciviridae, que induz uma doença na lebre caracterizada por hemorragias em vários órgãos e necrose hepática na lebre-europeia e na lebre-da-montanha. O EBHSV surgiu nos anos 1980 no norte da Europa e, até agora, têm-se restringido à Europa, nomeadamente à Suécia, Itália, Reino Unido, França, Polónia, Grécia e Eslováquia. Nas duas espécies de lebre que afeta (lebre-europeia e lebre-da-montanha), a infeção apresenta grande semelhança com a DHV na sua epidemiologia, sintomatologia e patologia, sendo caracterizada por progressão rápida, aparecimento de sinais nervosos ligeiros (incluindo depressão, tremores musculares e incoordenação), presença de líquido sero-hemorrágico nas narinas, hemorragias internas, hepatite necrótica grave e congestão do baço e rins. A morte pode advir em três dias após o início dos sinais clínicos e as taxas de mortalidade podem chegar aos 100%.

3. Herpesvirose por LeHV-5

Foi descrito recentemente um herpesvírus (LeHV-5) em exemplares de lebre-ibérica em Portugal (8), frequentemente associado a coinfecção com a mixomatose, embora esta associação possa ter resultado da amostragem dos animais durante um surto epidémico de mixomatose. No entanto, a presença de vírus com presença de lesões cutâneas (vesículas e vesículo-pústulas), subcutâneas (edema) e reprodutivas (inflamação e necrose dos órgãos genitais externos) só foi verificada em animais coinfetados com o vírus da mixomatose, provavelmente devido a imunossupressão. O LeHV-5 (figura 3) foi caracterizado como um Rhadinovirus, sendo provável que se trate de um vírus de persistência insidiosa na espécie, com capacidade de latência em células do sistema imunitário, constituindo por isso uma ameaça contínua, sobretudo em situações de imunossupressão decorrentes de carências alimentares, de esforço metabólico acrescido (ex. época reprodutiva, lactação) ou de coinfeções com outros vírus, parasitas ou bactérias.

5. Cisticercose

A cisticercose é uma doença parasitária causada pela forma larvar da *Taenia pisiformis*, cujo parasita adulto ocorre no intestino dos carnívoros, nomeadamente do cão doméstico. As lebres infetam-se ao ingerir os ovos presentes no solo e alimentos contaminados com as fezes de carnívoros.
Em geral, a cisticercose ocorre em formas pouco evidentes nos leporídeos, com presença na cavidade abdominal de algumas vesículas com conteúdo líquido transparente e uma estrutura branca em forma de bago de arroz, medindo poucos milímetros de diâmetro. Contudo, em alguns animais, as cargas parasitárias são muito elevadas levando à destruição de órgãos como o fígado, e em último caso à morte (figura 4). Por forma a reduzir os riscos de infeção dos cães, nunca deve ser permitido que os cães se alimentem de vísceras e carnes cruas dos animais caçados ou encontrados mortos. Embora não representem um risco para o homem, desaconselha-se o consumo de animais parasitados. A desparasitação frequente dos cães de caça e de outros cães que partilham o *habitat* com leporídeos selvagens, como é o caso dos cães de pastoreio, contribui também para o controlo desta infeção parasitária. A desparasitação deve ocorrer pelo menos duas vezes por ano e ser acompanhada por exames fecais solicitados pelo médico veterinário.

6. Tularémia

A tularémia é uma doença zoonótica infeciosa rara, causada pela bactéria *Francisella tularensis*. É transmitida por contato direto com animais infetados, por ingestão de alimentos ou água contaminados, pela inalação de aerossóis ou por picada de artrópodes hematófagos infetados (carraças, mosquitos ou moscas).
No homem, a doença é potencialmente fatal, assemelhando-se muitas vezes a um quadro gripal, caracterizado por febre, dor de cabeça, calafrios, dores musculares, aumento e dor dos gânglios linfáticos, que surgem após um período de incubação de três a cinco dias.
A tularémia foi também detetada em lagomorfos, roedores, carnívoros, pássaros, peixes e répteis. As lebres, os coelhos e os roedores são, no entanto, considerados os principais reservatórios da bactéria na natureza. Nestes, as manifestações clínicas são variáveis, podendo estar ausentes no início da infeção. Quando surgem, os sinais de doença incluem febre alta, letargia (prostração), falta de apetite (anorexia), perda de peso, taquipneia (aumento do ritmo respiratório), taquicardia (aumento dos batimentos cardíacos) e hipertensão. A prostração e a morte advêm de septicémia e coagulação intravascular disseminada, que leva à falência dos órgãos.
As lesões macroscópicas observadas consistem habitualmente no aumento do tamanho do fígado (hepatomegália) e do baço (esplenomegália), na presença de granulomas nos pulmões, no pericárdio e nos rins ou, alternativamente, na presença de lesões congestivas e hemorrágicas em vários órgãos, podendo ainda ser observados sinais de pneumonia nos pulmões. Nos casos de evolução mais arrastada da doença (infeções subagudas e crónicas), as lesões podem lembrar as de tuberculose, com aparecimento de granulomas crónicos no fígado, baço, rim e pulmão. Certos grupos de atividade, nomeadamente caçadores, agricultores, médicos veterinários, taxidermistas e técnicos de laboratório que manipulam carne crua não controlada, têm maior risco de contrair a doença pelo contato com a bactéria ou com os seus hospedeiros e vetores.
Um estudo realizado em Portugal (2015) revelou uma taxa de positividade a *F. tularensis* em carraças (ixodídeos) e lagomorfos de cerca de 6%[7]. No âmbito de um programa de vigilância sanitária que decorre em Portugal desde meados de 2017 (Projetos +Coelho), não foram observados animais com lesões sugestivas de tularémia. Entre 2001-2002, na região Norte de Portugal, um estudo encontrou seropositividade em 8,9% da amostra[8]. Em 2007, viria a detetar-



Figura 4 – Cultura da bactéria *E.coli* em gelose MacConkey, para diagnóstico

-se *F. tularensis* holárctica numa amostra humana colhida em Bragança[9]. Em novembro de 2018 diagnosticou-se Francisella num humano, e, de acordo com os dados epidemiológicos reunidos, é possível que a infeção tenha sido contraída no estrangeiro.

7. Colibacilose

A colibacilose é uma doença causada pela bactéria ubiquitária *Escherichia coli*, cujas estirpes infetam todas as espécies animais. No coelho, causa habitualmente diarreias, embora as estirpes enteropatogénicas, como os serotipos O103, O15:H, O109:H2, originem formas clínicas diferentes, de acordo com a idade do animal. Os coelhos jovens, com uma a duas semanas de idade, desenvolvem uma diarreia profusa amarelada que geralmente culmina em morte. Em coelhos em desmame, verifica-se geralmente um quadro semelhante à enterotoxémia (uma doença causada por outra bactéria pertencente ao género *Clostridium*), com enchimento do intestino por conteúdo fluidificado com petéquias hemorrágicas na serosa, podendo também confundir-se com a doença de Tyzzer (também causada por uma bactéria do género *Clostridium*)[10]. A colibacilose não é habitualmente relatada em coelho-bravo, nem em lebre-ibérica.

8. Brucelose

A *Brucella spp.* é também um agente bacteriano zoonótico, infetando uma grande gama de espécies domésticas e selvagens, incluindo espécies marinhas[11]. Esta bactéria tem potencial de transmissão venérea, ocular e oronasal e transplacentária. Pode transmitir-se ao homem em áreas onde a doença é endémica, através do contacto com animais infetados ou por ingestão dos seus produtos, como o leite e derivados. As espécies selvagens portadoras de *Brucella spp.* representam um grande risco de manutenção da doença. São o caso da lebre-europeia, da rena, do bisão e de algumas espécies de roedores[12]. A lebre-ibérica mostrou suscetibilidade à infeção por Brucella suis biovars 1 e 2, representando para esta última biovar um reservatório importante, tal como o javali[13]. Contudo, a biovar 1 é aquela que apresenta maior risco para o homem, por ser altamente patogénica e provocar doença severa, ao contrário da *B.suis* biovar 2, raramente patogénica para o homem[14], tendo contudo grande impacto nos suínos e gado doméstico.
Curiosamente, a infeção nesta espécie é muitas vezes latente ou caracterizada por inflamação e aparecimento de abcessos no aparelho reprodutivo, nos gânglios linfáticos, fígado, baço, rins, bexiga, articulações ou cérebro[15]. A doença ocorre sobretudo em animais adultos, geralmente em formas crónicas, ocorrendo transmissão durante a reprodução. Pensa-se que esta patologia tenha pouco impacto na mortalidade das lebres[16].

9. Pasteurelose

A pasteurelose compreende um conjunto de afeções do trato respiratório dos coelhos, causadas pela bactéria *Pasteurella multocida*, que surge geralmente em associação com outras bactérias (*Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus spp.*, *Streptococcus spp.* ou *Staphylococcus spp.*), ou que ocorre secundariamente à infeção por vírus. A *P. multocida* é frequentemente encontrada nos seios paranasais de coelhos saudáveis, pelo que os animais portadores constituem fontes de infeção.
Os sinais clínicos incluem dificuldade respiratória (dispneia), descargas nasais e espirros, torcicolo ou alterações decorrentes de infeções genitais. O quadro lesional pode incluir rinite aguda, otite média, conjuntivite, broncopneumonia com evolução para pneumonia lobar, pleurisia, pericardite, focos necróticos no ouvido, piómetra (infeção do útero), orquite (infeção dos testículos), aparecimento de abcessos subcutâneos ou em órgãos internos, septicémia e morte. No entanto, podem desenvolver-se quadros de septicémia aguda, com morte sem registo de quaisquer outros sinais clínicos.

10. Leptospirose

Um outro agente bacteriano a considerar nos programas de monitorização dos leporídeos é a *Leptospira spp.*, uma bactéria endémica com potencial zoonótico, detetada em várias espécies animais, domésticas e selvagens, sendo a urina a fonte principal de disseminação. De acordo com o nosso conhecimento, esta bactéria nunca foi reportada nos leporídeos da Península Ibérica. No entanto, a dispersão deste agente por diversas espécies selvagens, nomeadamente roedores, que vivem em simpatria com a lebre-ibérica e o coelho-bravo, tornam, contudo, plausível que ocorra infeção dos leporídeos. Um estudo realizado em França a 28 espécies com potencial reservatório de Leptospira patogénica para o homem, encontrou uma prevalência desta bactéria no coelho-europeu de 0,3 e 1,4%, mais baixa do que a verificada no ouriço-cacheiro (37,5%) e em mustelídeos, como a marta e a doninha (15 a 20%).

11. Leishmaniose

O agente etiológico desta doença é um protozoário do género *Leishmania* (Família Trypanosomatidae), também zoonótico. A doença é habitualmente conhecida pela doença que causa no cão doméstico, sendo endémica em Espanha e Portugal e bastante frequente no Algarve, Lisboa e Setúbal. Existem cerca de 53 espécies de *Leishmania*, das quais cerca de 20 são pa-



Figura 5 – Cultura da bactéria *P. multocida* em agar sangue, para diagnóstico.

togénicas para o Homem. No nosso País, a transmissão ocorre principalmente pela picada de pequenos insetos fêmeas do género Phlebotomus (também conhecidos por mosca-da-areia) (11). A interrupção da transmissão nos ciclos zoonótico ou antroponótico entre o vetor artrópode e o reservatório mamífero são determinantes para o controlo da doença.

A infeção por este parasita intracelular foi já documentada em várias espécies selvagens, incluindo carnívoros, primatas, marsupiais, morcegos, roedores e lagomorfos. Num estudo realizado em 2016 em Itália[17], foi encontrada uma prevalência do parasita *Leishmania infantum*, baseada em métodos moleculares, de cerca de 30% no coelho-europeu (*Oryctolagus cuniculus*) e de 18,5 % na lebre-europeia (*Lepus europaeus*). A capacidade de uma espécie ser infetada não significa que seja espécie reservatório do parasita para o Homem, dependendo esta capacidade da eficácia de transmissão pelos flebótomos.

A lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) é também apontada como um importante reservatório de *L. infantum*, tendo sido comprovada a capacidade de transmissão do parasita de lebres infetadas, mas aparentemente saudáveis, para o *Phlebotomus perniciosus*[18]. Outro estudo desenvolvido[19] em diversas regiões de Espanha, reportaram uma prevalência de *L. infantum* de 40-50% na lebre-ibérica e lebre-europeia, não tendo sido detetada na Lebre-de-piornal (Lepus castroviejoi). As prevalências de infeção por *L. infantum* na Grécia e Itália foram de 23% e 2-18% respetivamente. A seroprevalência de *L. infantum* em lebre-ibérica em Espanha foi de 74%[20]. O coelho-bravo pode representar um importante reservatório, tendo sido relatada uma prevalência de *L. infantum* através de técnicas de serologia e de biologia molecular de 82.6% em populações selvagens da comunidade de Madrid (20). Embora nunca tenham sido relatados sinais clínicos na lebre, a monitorização deste parasita é também importante tendo em conta que a coexistência de concentrações mais elevadas de animais e de potenciais vetores, associados a um nível de imunidade baixa na população humana, pode representar um risco efetivo para infeção do Homem[21].

12. Coccidiose

Trata-se de uma parasitose altamente contagiosa em coelhos por via fecal-oral, causada por várias espécies de parasitas protozoários do género *Eimeria* e pode apresentar-se na forma intestinal ou na forma hepática. Esta parasitose não tem impacto na saúde pública, mas pode provocar elevada mortalidade em coelhos. Tanto os coelhos como as lebres saudáveis podem ser portadores assintomáticos de Eimeria.

Os oocistos (forma de transmissão) de *Eimeria spp.*, eliminados pelas fezes, contaminam o ambiente. Ao serem ingeridos os oocistos esporulados, presentes na vegetação, os animais infestam-se, perpetuando o ciclo de vida destes parasitas.

A forma intestinal de coccidiose afeta principalmente os animais jovens (seis semanas a cinco meses), sendo sobretudo observada em coelhos jovens recém-desmamados, embora também seja encontrada em idades mais avançadas. Os adultos podem desenvolver infeções subclínicas que passam geralmente despercebidas, mas muitos ficam portadores assintomáticos e continuam a contaminar o ambiente.

Os sinais clínicos incluem redução do apetite (anorexia), aumento da ingestão de água (polidipsia), depressão, dor abdominal e palidez das mucosas, embora em coelhos mais velhos estes sinais possam estar ausentes. Os coelhos jovens apresentam um atraso no crescimento devido a diarreia (mucoide, aguada ou hemorrágica). Na necropsia, observam-se com frequência múltiplas manchas brancas ou úlceras na superfície da mucosa do intestino delgado ou grosso.

A espécie *Eimeria stiedaei* infeta os canais biliares podendo causar lesões graves no fígado. A coccidiose hepática afeta coelhos de todas as idades e leva a apatia, polidipsia e distensão abdominal. Na coccidiose hepática, se a morte não ocorrer em poucos dias, a doença pode evoluir para a forma crónica. A mortalidade é baixa nos adultos. Na necropsia, o parênquima do fígado dos animais afetados apresenta pequenas granulações cor de marfim, multifocais, contendo exsudado amarelado, causadas pela proliferação dos parasitas no epitélio dos ductos biliares. Em infeções intensas há aumento do tamanho do fígado (hepatomegália). As lesões mais antigas coalescem e formam grandes massas caseosas.

13. Cenurose

A Taenia é um parasita da classe dos cestodes raro e agente da zoonose grave denominada cenurose. O parasita adulto (ténia) parasita o intestino delgado do hospedeiro definitivo, carnívoros domésticos e silvestres, e a forma larvar desenvolve-se no tecido conjuntivo subcutâneo e intramuscular, no caso da forma larvar *Coenurus serialis* da *T.serialis*[22], ou no cérebro, no caso do *Coenurus cerebralis*, forma larvar da *T.multiceps*. Estas formas larvares parasitam o hospedeiro intermediário (coelhos, lebres, roedores, cavalos, pequenos ruminantes e até primatas).

14. Sarnas

As sarnas são causadas por ectoparasitas denominados ácaros da sarna. Os mais frequentes nos leporídeos, são o *Psoroptes cuniculi* e o *Chorioptes cuniculi*. Ocorrem

principalmente no canal auditivo, levando muitas vezes a otites, ou em casos mais graves, alterações de equilíbrio, torcicolo ou morte. Observam-se estas situações patológicas, pela constatação de inflamação e secreção espessa ou serosa amarelada no ouvido. Trata-se de uma doença muito contagiosa entre animais, não apresentando risco para o homem. É, contudo, de notar, que outras sarnas menos frequentes, como a causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, são zoonóticas e, portanto, apresentam risco para o Homem.

15. Encefalitozoonose

A encefalitozoonose é causada pelo fungo intracelular *Encephalitozoon cuniculi*, o qual é eliminado pela urina e transmitido entre animais pela ingestão dos esporos que permanecem na vegetação, solo e água. A infeção geralmente ocorre na forma latente, não se observando sinais clínicos. No entanto, em infeções severas, podem observar-se sinais neurológicos (torcicolo, convulsões, tremores, paresia posterior) e edema. Em casos agudos, os rins estão hipertrofiados. As lesões macroscópicas são mais frequentes nas formas crónicas e incluem áreas multifocais, pontiagudas e brancas na superfície dos rins.

16. Parasitismo intestinal por mematodes e cestodes

Existem muitas espécies de parasitas dos leporídeos, sendo a sua diversidade e frequência muito variável entre regiões geográficas. Apesar de muitos leporídeos se encontrarem parasitados, existe um equilíbrio entre o hospedeiro e as populações destes parasitas. No entanto, podem ocorrer desequilíbrios se as cargas parasitárias aumentarem substancialmente, causando então doença.

Estas situações podem ser despoletadas por carências nutricionais ou por infeção concomitante com outros agentes patogénicos. As elevadas densidades populacionais facilitam a perpetuação dos ciclos de infeção, dado o maior contacto entre os animais facilitador da transmissão. Os lagomorfos podem ser hospedeiros definitivos (das formas adultas dos parasitas) ou intermediários (das formas larvares) de outras espécies de parasitas com potencial impacto na condição corporal dos animais. Além da ocorrência de formas larvares de ténias (cestodes), os leporídeos podem ser hospedeiros de formas adultas de ténias da família *Anoplocephalidae* [como as espécies *Cittotaenia ctenoides* e *Andrya cuniculi*, transmitidas pela ingestão de ácaros de vida livre (hospedeiros intermediários)]. Pela dimensão das ténias, quando em número elevado, pode ocorrer obstrução intestinal e má condição corporal dos animais. Os leporídeos são também hospedeiros definitivos de várias espécies de vermes redondos (nematodes), como o *Graphidium strigosum* (parasita do estômago que pode originar gastrites hemorrágicas, resultando em anemia, diarreia e morte). Também são frequentes os oxiurídeos da espécie *Passalurus ambiguus* e, com menor frequência, a espécie *Dermatoxys veligera*, responsáveis por inflamação do intestino delgado e do ceco. Um outro parasita de localização intestinal (ceco) é a espécie *Trichuris leporis*, de menor gravidade para os animais. Estas espécies de nematodes têm o ciclo direto, sendo que os animais se infetam quando ingerem ovos dos parasitas que são excretados nas fezes de outros coelhos.

17. Fungos

O fungo do género *Trichophyton mentagrophytes* é o mais frequente nos coelhos, embora outros, como o *Microsporum canis*, também o possam afetar. Este tipo de micoses ou dermatofitoses leva ao aparecimento de lesões circulares, crostosas, eritematosas e com alopécia (perda de pelo), e são geralmente pruriginosas. Aparecem primordialmente em zonas mais sujeitas a *grooming* (limpeza pelo próprio animal usando a boca) como as patas e a própria zona do focinho.

Não são doenças frequentes e aparecem normalmente associadas a fatores de stresse como doenças concomitantes, nutrição deficitária ou manipulação excessiva pelo homem. Estas micoses são em alguns casos transmissíveis ao Homem, mas tal como nos animais, apresentam maior riscos em pessoas imunodeprimidas.

Conclusão

A maioria dos estudos desenvolvidos sobre as doenças que afetam os leporídeos têm enfoque nas doenças epidémicas, nomeadamente na mixomatose e na doença hemorrágica viral pois causam a morte de um grande número de animais em curtos períodos de tempo. Contudo, é importante que a comunidade científica esteja atenta a outras doenças, que embora mais insidiosas e de evolução mais lenta, podem debilitar os animais de forma continuada, tornando-os funcional e reprodutivamente menos eficientes. De forma menos alarmante, estas patologias comprometem também a viabilidade das populações, acentuando a sua redução.

Os animais selvagens estão expostos simultaneamente a inúmeros agentes patogénicos, não sendo possível controlar-se a sua saúde de forma sistemática, como se faz para os animais de pecuária ou de companhia. Por esta razão, existe sempre um certo nível de desconhecimento associado às avaliações do estado sanitário das populações selvagens mesmo quando monitorizadas para um subconjunto de agentes patogénicos. Dada a complexidade dos fatores que afetam os animais selvagens (*habitat*, disponibilidade de alimento, predação, doenças, condições climatéricas, etc.), são necessárias abordagens integradas que possibilitem a melhoria da sua condição geral para melhor enfrentarem surtos de doenças epidémicas, através do favorecimento do equilíbrio entre o hospedeiro e os agentes patogénicos.

Referências bibliográficas:

1. P. Monterroso *et al.*, *Sci. Rep.* 6, 36072 (2016).
2. OIE, Myxomatosis (2020), (available at https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Myxomatosis/).
3. A. S. Neimanis *et al.*, 1–12 (2018).
4. R. N. Hall *et al.*, Vet. Rec. 180, 121 (2017).
5. G. Puggioni *et al.*, *Vet. Res.* 44, 1–7 (2013).
6. A. Camarda *et al.*, *Res. Vet. Sci.* 97, 642–645 (2014).
7. C. Carvalho, S. Núncio, I. L. De Carvalho, 16–18 (2015).
8. J. SEABRA *et al.*, in *Abstracts of the Prevention and Control of Zoonoses*, U. 2002 O. 21-23. C. (Wales); Cardiff, Wales, Ed. (Health Protection Agency, 2002), p. Abstract 110.
9. I. L. De Carvalho *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.* 13, 666–667 (2007).
10. J. Mayer, Bacterial and Mycotic Diseases of Rabbits. MSD Vet. Man. (2015), (available at https://www.msdvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/rabbits/bacterial-and-mycotic-diseases-of-rabbits).
11. C. N. Tsokana *et al.*, 1–15 (2020).
12. M. M. Zheludkov, L. E. Tsirelson, 37, 709–715 (2010).
13. M. Fort *et al.*, 156, 439–442 (2012).
14. N. I. Paton, N. W. Tee, C. K. Vu, T. Teo, 1, 129–130 (2001).
15. J. Godfroid, in *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*, Gavier-Widén, J. P. Duff, A. Meredith, Eds. (Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012), pp. 318–328.
16. R. Winkelmayer, M. Vodnansky, P. Paulsen, A. Gansterer, F. Treml, 92, 131–135 (2005).
17. S. Zanet, in *12 th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA)*, A. Schumann, G. Wibbelt, A. D. Greenwood, H. Hofer, Eds. (2016), pp. 2–4.
18. R. Molina *et al.*, *Vet. Parasitol.* 190, 268–271 (2012).
19. F. Ruiz-Fons, E. Ferroglio, C. Gortázar, 1–5 (2013).
20. N. García *et al.*, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014), doi:10.1155/2014/318254.
21. J. Millán, E. Ferroglio, L. Solano-gallego, 2005–2014 (2014).
22. X. Y. Zhang, Y. N. Jian, L. Q. Ma, X. P. Li, P. Karanis, *Korean J. Parasitol.* 56, 195–198 (2018).

Anexo VII-G

Divulgação em Revistas de Circulação Nacional para Público Não Especializado

Mixomatose: uma ameaça para a lebre-ibérica?

Vários casos de mixomatose em lebres-ibéricas provenientes do sul do país foram recentemente confirmados no Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal (INIAV, I.P.), no âmbito do projeto +Coelho. A elevada positividade em lebres encontradas mortas e em animais caçados levanta preocupações justificáveis face à potencial ameaça que esta doença pode constituir à conservação da lebre-ibérica.

Margarida Dias Duarte, Carina Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Mónica V. Cunha, Nuno Canada . INIAV, I.P.

Rita Amador, Patrícia Tavares Santos, Yolanda Vaz Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)

Ana Hora, Gonçalo Lopes . Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF)

Joana Abrantes, Ana Margarida Lopes, Pedro José Esteves, Nuno Santos e Paulo Célio Alves . Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), da Universidade do Porto (CIBIO-InBIO)

João Carvalho, António Paula Soares . Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC)

Fernando Castanheira-Pinto . Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP)

Jacinto Amaro . Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA)

O vírus da mixomatose é originário da América do Sul

O vírus da mixomatose é originário do continente americano. Quando infetadas, as espécies de leporídeos do género *Sylvilagus*, autóctones do sul e norte do continente americano, desenvolvem infeções subclínicas, ou acompanhadas de sinais ligeiros, geralmente recuperando totalmente da infeção. Estas espécies são, por isso, consideradas *hospedeiro reservatório* do vírus da mixomatose (Fenner e Ratcliffe, 1965).

A mixomatose é considerada uma doença de coelhos

A doença, designada "mixomatose" por induzir à formação de nódulos cutâneos que lembram tumores (mixomas), só foi reconhecida no final do século XIX, depois da introdução do coelho doméstico europeu (*Oryctolagus cuniculus*) na América do Sul. Uma vez infetado, o coelho-europeu desenvolveu doença sistémica grave, com mortalidade próxima de 100%, o que conduziu à identificação subsequente do agente (Fenner e Ratcliffe, 1965).

O vírus dispersa-se muito rapidamente através de vetores de transmissão mecânica, como as pulgas e os mosquitos que, conjuntamente, asseguram a continuidade da transmissão no verão e no inverno (Blanco *et al.*, 1993).

O vírus do mixoma é geneticamente relacionado com o vírus do Fibroma de Shope, frequentemente utilizado como vacina heteróloga contra a mixomatose. Induz a formação de fibromas cutâneos, geralmente inofensivos, e que regridem naturalmente.

O vírus da mixomatose infeta apenas leporídeos, não sendo por isso uma ameaça para o Homem.

Utilização de estirpes virulentas do vírus da mixomatose para controlo biológico de sobrepopulações de coelho-bravo

Introduzido várias vezes na Austrália para fins cinegéticos, o coelho rapidamente se tornou uma praga neste país, dadas as condições favoráveis de *habitat* e alimento e a ausência de predadores naturais. A sobrepopulação de coelhos-bravos comprometeu gravemente espécies nativas, afetando também a agricultura. Em 1950, para salvaguardar as explorações agrícolas e ajudar a preservar as espécies autóctones, o governo australiano consentiu na libertação de uma estirpe altamente virulenta de vírus da mixomatose (SLS) para o controlo biológico das populações de coelho-bravo, que resultou na redução imediata do tamanho destas populações (Ratcliffe *et al.*, 1952).

No entanto, poucos anos depois, surgiam estirpes de vírus da mixomatose mais atenuadas e as populações de coelhos recuperaram progressivamente, tornando-se de novo uma praga. A coevolução do vírus da mixomatose com o coelho-bravo na Austrália constitui um exemplo clássico de coevolução entre um agente patogénico e um hos-

ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA MIXOMATOSE

O vírus da mixomatose, um *Leporipoxvirus* pertencente à Família *Poxviridae*, é um vírus de ADN de cadeia dupla e estrutura em forma de tijolo. Os viriões medem cerca de 200 nm e 300 nm respetivamente na sua menor e maior dimensão. Ao contrário de outros vírus de ADN, a replicação dos poxvírus ocorre exclusivamente no citoplasma das células infetadas, permitindo, por vezes, a visualização de corpos de inclusão ao microscópio ótico (Murphy *et al.*, 1995).

pedeiro (Kerr *et al.*, 2012).
Em 1952, uma outra estirpe de vírus da mixomatose (Lausanne) foi libertada clandestinamente em França, para controlo populacional. A partir dessa libertação, o vírus espalhou-se rapidamente para outros países europeus, incluindo o Reino Unido e Portugal e Espanha, onde se verificou uma redução drástica do tamanho da população de coelho-bravo (90-99%) (Ferreira e Alves, 2006; Ferreira e Delibes-Mateus, 2010). A coevolução entre o vírus da mixomatose e as populações naturais de coelho-bravo ocorreu também na Europa, incluindo Portugal, tendo originado uma diminuição da virulência das estirpes (Kerr *et al.*, 2012).

A mixomatose em lebres foi registada esporadicamente no passado

Considerada uma doença de coelhos, desde a sua introdução deliberada em França, a mixomatose foi apenas esporadicamente relatada em lebre, nomeadamente em lebre-europeia (*Lepus europaeus*) e em lebre-ibérica (*Lepus granatensis*).
A lebre, sendo também um leporídeo, pertence a um género taxonómico (*Lepus*), distinto do coelho-europeu (*Oryctolagus*).
Os casos esporádicos de mixomatose em lebres, documentados desde 1953, ocorreram em França (Jacotot *et al.*, 1954), Inglaterra (Barlow *et al.*, 2014), Irlanda (Collins, 1955) e Espanha (Lucas *et al.*, 1953), afetando apenas um único animal por episódio, alguns sem lesões de mixomatose. Inoculações experimentais de lebre-europeia sugeriram que esta espécie teria alguma resistência natural à infeção pelo vírus da mixomatose (Bull e Dickinson, 1937). A raridade destes eventos no passado sugeria baixa eficácia na transmissão do vírus coelho-a-lebre e lebre-a-lebre.
É curioso constatar que, também, alguns caçadores portugueses referem, no decurso da sua longa atividade cinegética, ter avistado esporadicamente uma ou outra lebre com sinais compatíveis com mixomatose. Estes potenciais casos não foram, contudo, testados em laboratório.

A partir de meados de 2018, verifica-se registo de mortalidade anormal em lebres no Reino Unido e na Península Ibérica

Não obstante o relato de casos de mixomatose em lebre no passado, a ocorrência de doença nesta espécie foi extremamente esporádica. Esta situação alterou-se profundamente no verão de 2018.
Em agosto, foi verificada mortalidade em lebre-ibérica em várias províncias do sul e centro de Espanha e, nos meses seguintes, registou-se mortalidade em lebre-europeia no leste da Inglaterra. Em ambos os países, foram encontrados vários animais mortos na mesma área, sugerindo causa de mortalidade de origem infeciosa e a possibilidade de transmissão direta entre lebres do agente patogénico envolvido. A suspeita de mixomatose foi colocada posteriormente, face aos sinais clínicos presentes em algumas lebres, muito semelhantes aos observados em coelhos infetados pelo vírus da mixomatose, como, por exemplo, cegueira, desorientação, conjuntivite e edema dos olhos, focinho, região anal e genitais. Foram publicados vários artigos de divulgação, refletindo a preocupação generalizada sobre a preservação destas espécies silvestres. Por exames laboratoriais, em novembro de 2018 foi confirmada a presença de mixomatose em lebre-ibérica em Portugal.

Decorre em Portugal um Plano de Vigilância Sanitária dos Leporídeos Silvestres (Projeto +Coelho)

Desde agosto de 2017 que decorre em Portugal o Projeto +Coelho, que executa o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos, deliberado pelo Despacho 4757/2017, de 31 de maio do MAFDR e que envolve várias instituições da Administração Pública (INIAV, que coordena o plano, DGAV e ICNF) e entidades privadas (iBET, CIBIO-InBIO, OMV), bem como as organizações do setor de caça de 1.º nível (ANPC, CNCP e FENCAÇA).
Entre outras medidas, o Projeto inclui um programa de vigilância sanitária de leporídeos selvagens (coelho-bravo e lebre-ibérica), conduzido à escala nacional, com enfoque na doença hemorrágica viral. No entanto, a monitorização efetuada nos Laboratórios de Referência de Saúde Animal do INIAV (Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal – Oeiras) incide também sobre a mixomatose, que, conjuntamente com a doença hemorrágica viral, constitui um dos fatores principais de mortalidade de origem infeciosa do coelho-bravo.
Este projeto conta, ainda, com a colaboração dos gestores e caçadores para a recolha de amostras biológicas no ato venatório em animais caçados, assim como da sociedade civil em geral, para a recolha e envio de cadáveres encontrados no campo, dentro e fora das zonas de caça. A contínua e atenta vigilância sanitária da fauna silvestre é fundamental para uma gestão sustentável dos recursos naturais.
As atividades do Projeto +Coelho são divulgadas no *site* do INIAV (http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos), onde se disponibiliza também toda a informação necessária para a colheita e envio de amostras (Folhas de registo, Protocolos de colheita, Pontos de entrega de cadáveres e material biológico, etc.) e se partilham notícias e alertas sanitários.

Os dados da vigilância sanitária nas épocas venatórias 2017/2018 e 2018/2019 revelam que, desde novembro de 2018, a lebre-ibérica está a ser gravemente afetada pelo vírus da mixomatose em Portugal

No âmbito do Projeto +Coelho, durante a época venatória 2017/2018, foram analisados cerca de 80 exemplares de lebre-ibérica caçados no Alentejo e Algarve. Todos foram negativos a mixomatose. Entre agosto de 2017 e agosto de 2018, apenas foi rececionada uma lebre encontrada morta no campo, também esta negativa a mixomatose.
A amostragem de cadáveres desta espécie aumentou substancialmente desde setembro de 2018 até à presente data, com a análise de 12 espécimes encontrados mortos no campo. Destes, nove (75%) foram positivos a mixomatose, tendo o primeiro caso sido detetado no início de novembro, num animal caçado a 28 de outubro no município de Évora. Por se tratar de uma doença de declaração obrigatória, este primeiro caso, assim como o segundo registado no concelho de Beja, foi reportado à Organização Mundial

O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA MIXOMATOSE

Embora, quando presentes, os sinais clínicos da forma nodular de mixomatose (formações cutâneas e edemas) sejam indicativos da doença, a forma pulmonar pode passar despercebida, tal como a forma nodular nos estádios iniciais da infeção. É importante, por isso, proceder-se à confirmação do diagnóstico através da realização de exames laboratoriais. O diagnóstico do vírus da mixomatose é atualmente feito no INIAV por metodologias de moleculares, altamente sensíveis e específicas desenvolvidas pelo Laboratório de Virologia (Duarte *et al.*, 2014).

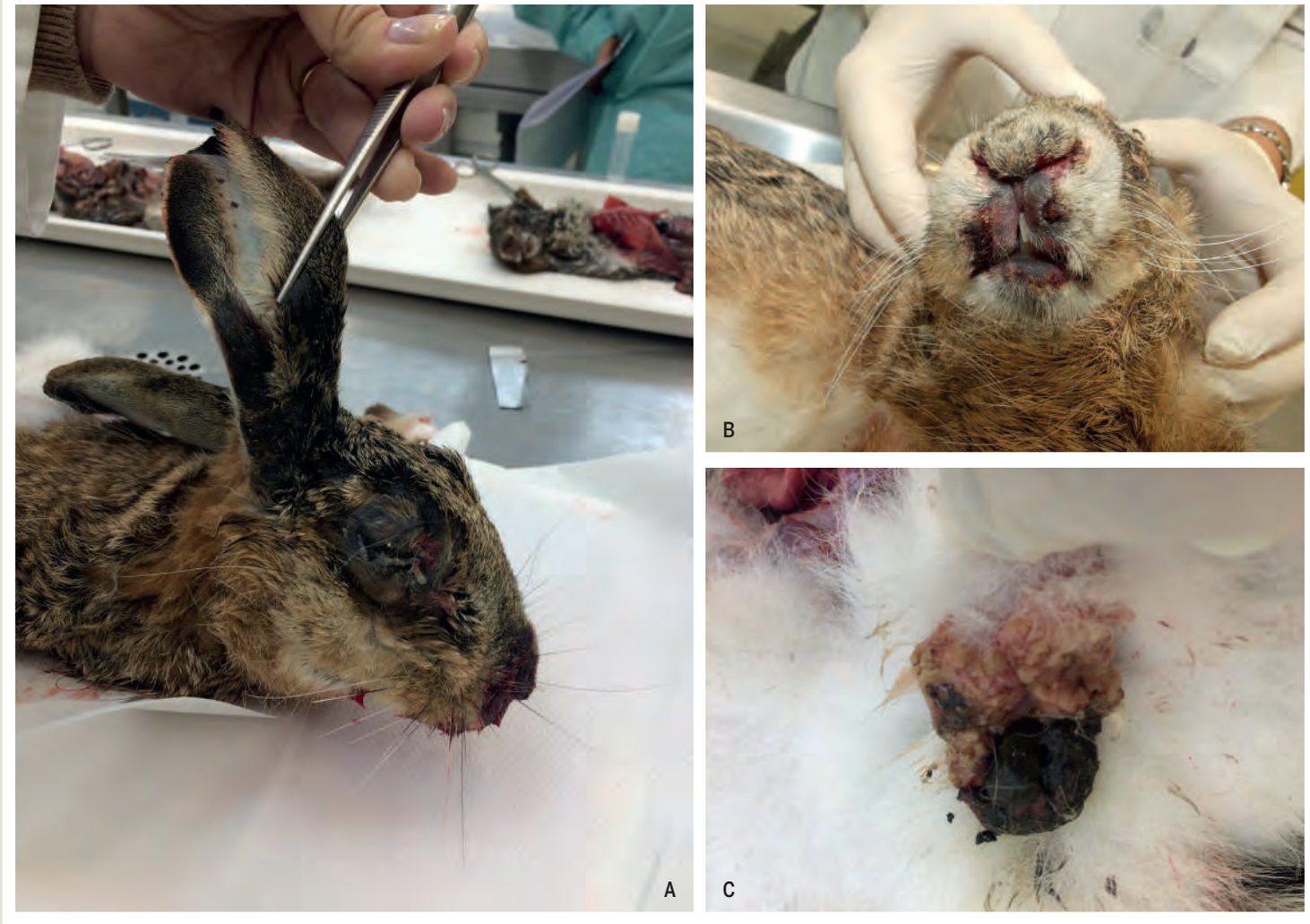


Figura 1 – O primeiro espécimen de lebre-ibérica positiva a mixomatose apresentava lesões compatíveis com a doença. A – edema das pálpebras e conjuntivite purulenta bilaterais; B – nódulos no focinho; C – edema da região perineal (Sala de Necrópsia, do Laboratório de Patologia da UEISPSA, INIAV)

MEDIDAS ESPECÍFICAS RECOMENDADAS PARA REDUÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS EM LEPORÍDEOS

Enquanto são desenvolvidos esforços para o esclarecimento dos eventos de mortalidade anormal que se vêm verificando na lebre-ibérica, recomenda-se a aplicação de um conjunto de medidas, de índole prática, de forma a minimizar o impacto desta doença nas populações de leporídeos. Estas medidas foram já anteriormente publicadas pela DGAV ou pelo Grupo +Coelho, na forma de alertas e recomendações:

Deve ser intensificada a vigilância ativa nas zonas de caça através da prospeção e recolha de cadáveres no campo, cumprindo os procedimentos de higiene e biossegurança recomendados;

Sempre que se verifique mortalidade de lebres, não deve ser feita qualquer movimentação de animais (capturas, translocações, repovoamentos), mesmo que aparentemente saudáveis, por forma a evitar uma possível disseminação do(s) agente responsável(eis) por doença em lebres;

As pessoas que não queiram manipular os cadáveres devem fotografá-los e registar a sua localização (de preferência coordenadas geográficas), enviando essa informação para a equipa do +Coelho (maiscoelho@iniav.pt; 214403500) e avisando o Gestor da Zona de Caça mais próxima da presença desse animal;

Estes animais encontrados mortos não devem ser consumidos em quaisquer circunstâncias;

Deve ser reportada ao Grupo de Trabalho +Coelho a presença de lebres doentes ou mortas (maiscoelho@iniav.pt; 214403500);

Os animais vivos com sinais de doença devem ser capturados, colocados dentro de uma caixa (de preferência, caixa de plástico com arejamento, para que possa ser convenientemente limpa e desinfetada), com vista ao seu envio rápido para os Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal, no INIAV (o INIAV deve ser imediatamente contactado telefonicamente – 214403500);

Os cadáveres deverão ser recolhidos para análise, seguindo procedimentos de higiene e biossegurança, de acordo com a metodologia disponibilizada no *site* do INIAV (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_colheita.pdf e http://www.iniav.pt/gca/?id=1822);

Caso não disponha de *kits* de recolha, o cadáver dever ser colocado dentro de um saco de plástico e esse colocado dentro de outro, utilizando sempre luvas descartáveis (luvas de cozinha ou outras, ou ainda sacos de plástico protegendo as mãos, que depois devem ser colocados dentro do segundo saco para eliminação); manter o cadáver refrigerado se o envio for imediato. Caso contrário, congelá-lo;

Sempre que os cadáveres não sejam enviados para análise, devem ser corretamente eliminados por enterramento em vala, previamente revestida com cal em pó ou hidratada, que também deve ser aplicada sobre os cadáveres, antes de serem cobertos por uma camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v) da alínea a) do artigo 8.º do Reg. CE n.º 1069/2009] ou através de encaminhamento para empresa de tratamento de subprodutos;

Deve evitar-se o contacto dos animais suspeitos com cursos de água naturais ou pontos de abeberamento.

de Saúde Animal (OIE), em 04.11.2018, pela autoridade veterinária nacional (DGAV).

Foram também analisadas 31 lebres caçadas, algumas com sinais de doença. Destas, nove foram positivas a mixomatose (29%).

A prevalência do vírus da mixomatose em coelhos-bravos caçados nas épocas venatórias 2017/2018 e 2018/2019 foi, respetivamente, de 4,95% e 3,65% (embora ainda estejam a decorrer análises nas amostras provenientes da última época de caça). Nos coelhos-bravos encontrados mortos, a percentagem de amostras positivas, recolhidas entre setembro de 2018 e janeiro de 2019, foi de 27,27%, significativamente superior ao valor detetado na amostragem recolhida entre agosto de 2017 e agosto de 2018 (7,69%). Estes dados podem refletir um aumento da patogenicidade das estirpes mais recentes de vírus do mixoma ou uma maior circulação do vírus nas populações de coelho-bravo. De facto, alguns gestores de zonas de caça do sul do país reportaram à equipa do Projeto +Coelho elevada mortalidade de coelho-bravo evidenciando lesões sugestivas de mixomatose, embora estes casos não tenham sido confirmados laboratorialmente, uma vez que os cadáveres não foram enviados para análise.

Em 2018, os testemunhos dos gestores e caçadores reportando lebres com sinais de mixomatose aumentaram substancialmente, alguns acompanhados pelo envio de registos fotográficos dos animais doentes. Esta tendência de avistamentos continua.

A causa da mortalidade em lebres não está, ainda, totalmente esclarecida

Não obstante os Laboratórios Nacionais de Referência de Espanha (Laboratório Central de Veterinária de Algete, Madrid) e de Portugal (UEISPSA, INIAV, Oeiras) tenham demonstrado a presença de vírus da mixomatose nos tecidos de lebres encontradas mortas e lebres caçadas, não se pode ainda excluir que outros agentes patogénicos possam também estar envolvidos na mortalidade alarmante e súbita de lebre-ibérica que se verificou nos dois países. Eventuais coinfeções podem resultar na diminuição da condição imunológica dos animais, propiciando o desenvolvimento de formas clínicas de mixomatose. No entanto, não foram detetadas lebres positivas a mixomatose na época venatória anterior (2017/2018), o que sugere que o vírus não estaria a circular nesta espécie de forma assintomática.

É também possível que, à semelhança do que ocorreu no final do século XIX, aquando da transmissão do vírus da mixomatose dos seus hospedeiros naturais (*Sylvilagus*) para os coelhos-europeus (*Oryctolagus*), que resultou no aumento acentuado da virulência num novo hospedeiro, tenha ocorrido uma nova transmissão entre espécies, agora entre *Oryctolagus* e *Lepus*. A aquisição da capacidade deste vírus infetar lebres de forma eficiente pode ter resultado de alterações genéticas nas estirpes anteriormente em circulação, que, porventura, aumentaram o grau de suscetibilidade da lebre à doença, ou mesmo a virulência, para os leporídeos em geral. As diferenças genéticas entre as estirpes virais que estiveram envolvidas nos casos esporádicos observados desde a

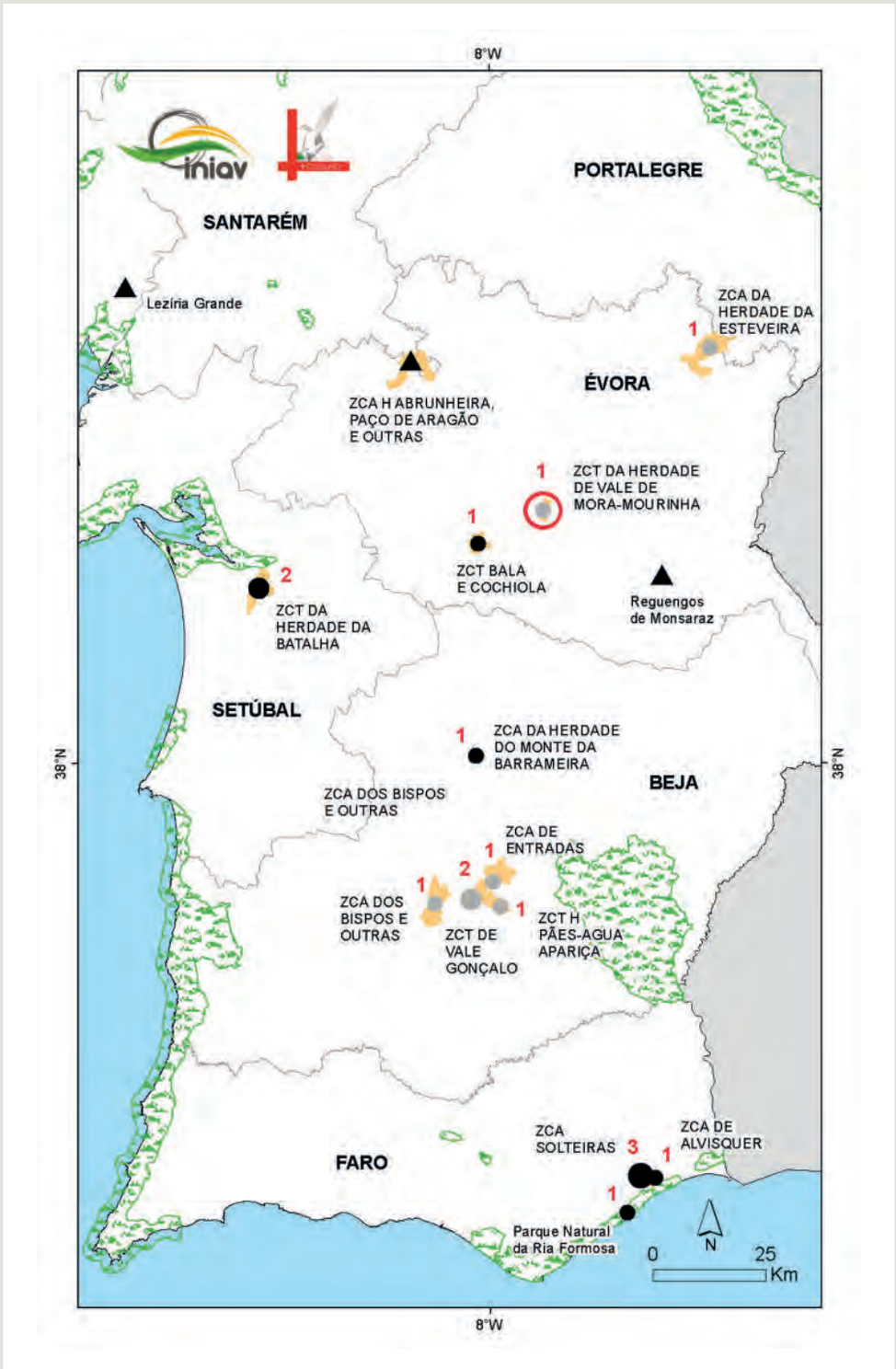


Figura 2 – Localização dos casos positivos de mixomatose em lebre-ibérica, identificados no âmbito do Projeto +Coelho. Os círculos pretos representam a localização dos cadáveres encontrados no campo, os círculos cinzentos dos animais caçados e os triângulos evidenciam a localização dos animais avistados com sinais compatíveis com mixomatose. O anel vermelho assinala a localização do primeiro caso diagnosticado em Portugal. A beje representam-se as zonas de caça (Mapa construído em ArcGIS por João Fernandes, INIAV)



Figura 3 – Lebres-ibéricas com sinais compatíveis com mixomatose fotografadas na Companhia das Lezírias a 01.12.2018 (esquerda) e a 26.01.2019 (direita), por Daniel Raposo e Joaquim Brunheta, a quem a equipa do Projeto +Coelho agradece a colaboração

década de 50 e as que estão na origem dos múltiplos casos verificados recentemente (2018) estão ainda por esclarecer.

Na Europa, as estirpes mais atenuadas que sucederam às que circularam na década de 50 originam mortalidades mais baixas, frequentemente não conduzindo, por si só, à morte dos animais, embora favoreçam a exposição à predação pela debilidade que causam.

Considerações finais

Os recentes eventos de mortalidade registados em lebre-europeia e em lebre-ibérica, surpreenderam e alarmaram os agentes no terreno e a comunidade científica, preocupando todos os que zelam pela biodiversidade. Algumas das questões levantadas por estes acontecimentos foram já mencionadas, como a eventualidade de haver outros agentes patogénicos envolvidos nesta mortalidade anormal. Interessa esclarecer se os casos verificados no Reino Unido e na Península Ibérica estão epidemiologicamente ligados, se o vírus que atualmente infeta as lebres e os coelhos é o mesmo, e se, quando isolado das lebres, o vírus da mixomatose é infecioso para o coelho.

A identificação da eventual alteração genómica que permitiu ao vírus adquirir a capacidade de infetar a lebre, a eventual existência de outra espécie hospedeira, as formas de expansão geográfica utilizadas por este vírus (populações de leporídeos ou ação antropogénica) e o rumo da evolução da sua virulência para a lebre e para o coelho-bravo, são aspetos que interessa esclarecer e compreender.

A execução do projeto +Coelho tem permitido conhecer e divulgar de forma regular, informação atualizada sobre a distribuição, incidência e evolução da mixomatose e da doença hemorrágica viral no território nacional. A disseminação da informação e do conhecimento gerado pelo projeto aos agentes do terreno e à comunidade em geral, neste, e em outros domínios dos seus eixos de intervenção (Programa de Investigação, Boas Práticas de Gestão e Medidas de Controlo Sanitário), é essencial e prioritária. Esta partilha só tem sido possível através do esforço coletivo dos seus parceiros e de todos os que têm apoiado as iniciativas e atividades que o Grupo de Trabalho vem desenvolvendo desde 2017.

REPÚBLICA PORTUGUESA

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo *FUNDO FLORESTAL PERMANENTE*.

Bibliografia

Barlow, A. *et al.* (2014). *Vet Rec.*, **175**(3):75-76.

Blanco, J.C.; Villafuerte, R.C. (1993). Empresa de Transformación Agrária, S.A. 122 pp.

Bull, L.B.; Dickinson, C.G. (1937). *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, **10**:291-294.

Collins, J.J. (1955). *Irish Veterinary Journal*, **9**:268.

Duarte, M.D. *et al.* (2014). *J. Virol. Methods*, **196**:219-224.

Fenner, F.; Ratcliffe, F.N. (1965). Cambridge University Press, Cambridge, 379 pp.

Ferreira, C.; Alves, P.C. (2006). Federação Alentejana de Caçadores, Beja.188 pp.

Ferreira, C.; Delibes-Mateos, M. (2010). *Wildl. Biol. Pract.*, **6**.

Jacotot, H. *et al.* (1954). *Annales de l'Institut Pasteur*, **86**:105-107.

Kerr, P.J. *et al.* (2012). *PLoS Pathog.*, **8**.

Lucas, A. *et al.* (1953). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **39**:770-776.

Monterroso, P. *et al.* (2016). CIBIO/InBIO, ICNF & Câmara Municipal de Mértola.

Murphy, F.A. *et al.* (1995). *Archives of Virology, Supplement 10*, Springer Verlag, Vienna, 586 pp.

Ratcliffe, F.N. *et al.* (1952). *Nature*, **170**:7-19.

Objetivos e estratégia do projeto +Coelho: primeiro ano de implementação



Apresentam-se os principais resultados obtidos no 1º ano do projeto +Coelho – "Avaliação ecossanitária das populações naturais de coelho-bravo visando o controlo da doença hemorrágica viral", que permitiu, através do financiamento pelo Fundo Florestal Permanente, pôr em prática o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos (Despacho 4757/17 de 31 de maio) no período compreendido entre agosto de 2017 e setembro de 2018.

Margarida Duarte, Carina L. Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Teresa Fagulha, Teresa Albuquerque, Jacinto Gomes, Helga Waap, Madalena Monteiro, Paulo Carvalho, Paula Mendonça, João Fernandes, Mónica V. Cunha, Nuno Canada . Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Ana Margarida Lopes, Joana Abrantes, Pedro Esteves, Pedro Monterroso, Ana Serronha, Nuno Santos, João Queirós, Paulo Célio Alves . Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), da Universidade do Porto (CIBIO-InBIO)

Patrícia Tavares Santos, Rita Amador, José Manuel Costa, Maria João Fradinho, Yolanda Vaz . Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)

Ana Hora, Gonçalo Lopes . Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)

João Carvalho, António Paula Soares . Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC)

Fernando Castanheira-Pinto . Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP)

Jacinto Amaro . Federação Portuguesa de Caça (FENCAÇA)

Ana Monteiro, Jaime Piçarra . Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA)

Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

Face à elevada morbilidade e mortalidade de coelho-bravo associadas ao novo vírus da doença hemorrágica (RHDV2) e à redução continuada destas populações silvestres, e na sequência das preocupações concertadas entre a tutela (Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural), as Organizações do Setor da Caça (OSC) e outras entidades governamentais com diferentes competências, foi publicado o Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio, estabelecendo a criação de um Grupo de Trabalho (GT) multidisciplinar, constituído por 9 instituições públicas e privadas. O GT teve como objetivo delinear uma nova estratégia conceptual e operacional de monitorização e vigilância da RHDV2 que permitisse, a curto prazo, conhecer o estado ecossanitário das populações naturais de coelho-bravo no território nacional, mapear o risco epidemiológico da DHV e reverter o decréscimo acentuado das populações de coelho-bravo, cuja relevância ecológica, sociocultural e socioeconómica é sobejamente reconhecida na Península Ibérica.

O GT é coordenado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.) e inclui o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF, I.P.), a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), o Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO-UP/InBIO, Laboratório Associado), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), a Ordem dos Médicos Veterinários (OMV) e as OSC de 1º nível, nomeadamente a Federação Portuguesa de Caça (Fencaça), a Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP) e a Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANCP).

O Plano de Ação desenvolve-se com base no conhecimento científico e integra 12 medidas (Tabela 1), a maioria de implementação a curto/médio prazo, inseridas em três eixos de intervenção: I) Programa de investigação; II) Boas práticas de gestão e III) Medidas de controlo sanitário.

Foi delineado um plano de comunicação transversal aos três eixos de intervenção, para manter permanentemente informados todos os agentes e tomadores de conhecimento implicados na recuperação do coelho-bravo, nomeadamente caçadores, gestores e proprietários rurais, assim como a sociedade civil, e em particular os jovens, procurando consolidar e transferir conhecimentos e competências e mobilizar interesses e apoios de diversos setores nos esforços para a sua recuperação.

Amostragem das populações de leporídeos silvestres

Na época venatória de 2017/2018 foi implementada, através da articulação dos parceiros do projeto +Coelho, uma rede de vigilância sanitária de coelho-bravo, que continua em curso. Esta vigilância, conduzida em 49 zonas de caça, foi alargada à lebre-ibérica, face às evidências de que outras espécies de lebres, como a lebre-europeia e a lebre-variável (*L. timidus*), eram suscetíveis à infeção por RHDV2 e pelo vírus da mixomatose. Foram recolhidas amostras de leporídeos por vigilância ativa em todo o território nacional (Figura 1), compreendendo 21 zonas de caça

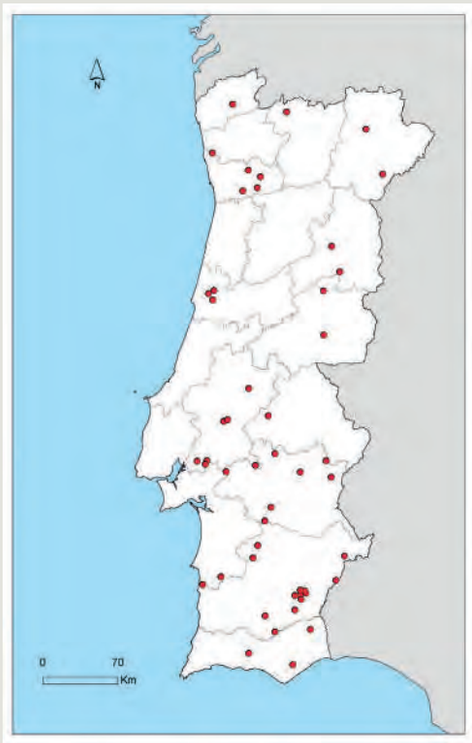


Figura 1 – Localização geográfica das zonas de caça amostradas no 1.º ano do Projeto +Coelho

EIXOS DE INTERVENÇÃO	12 MEDIDAS GERAIS	RESPONSÁVEL	PRAZO DA MEDIDA
PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO	Desenvolvimento de uma **vacina oral, inócua e ajustável à evolução do vírus**	INIAV	LP
	Identificação de **marcadores de resistência** no coelho-bravo à doença hemorrágica viral	CIBIO	MP
	Desenvolvimento e operacionalização de um **sistema nacional de recolha de dados demográficos e epidemiológicos** da população de coelho-bravo e integração com as condições edafoclimáticas, de habitat, densidades de predadores, disponibilidade de alimento, gestão cinegética e presença de vetores.	INIAV	CP MP
	Reconstrução da história demográfica de RHDV2 e desenvolvimento de **modelos preditivos de transmissão**	INIAV & CIBIO	MP
BOAS PRÁTICAS DE GESTÃO	**Gestão de habitat**: disponibilização de água e alimento e fomento de abrigo e moroiços de reprodução	CNCP, ANPC, FENCAÇA	MP
	Medidas de **controlo de predação** e **adequação da atividade cinegética**	ICNF	CP MP
	Ações de **fiscalização de movimentações** de animais	ICNF	CP MP
	Ações de **esclarecimento e divulgação** sobre Gestão e exploração de **recursos faunísticos**	ICNF	CP MP
	Certificação genética dos indivíduos introduzidos	ICNF	MP
MEDIDAS DE CONTROLO SANITÁRIO	**Implementação de Medidas de Vigilância da DHV**	DGAV & ICNF	CP MP
	Implementação de **medidas que favorecem o controlo** da DHV	DGAV	CP MP
	Ações de esclarecimento sobre os **fatores de risco** de **disseminação** da doença	INIAV & DGAV	CP

INIAV

Tabela 1 – Eixos de Intervenção e Medidas Gerais do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos

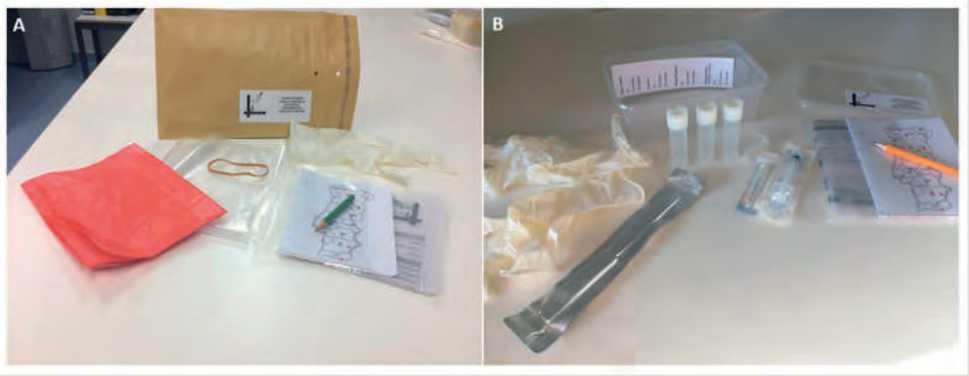


Figura 2 – *Kit* envelope para cadáveres de leporídeos silvestres encontrados mortos no campo (A) e *Kit* caixa para recolha de amostras de animais caçados (B)

turísticas, 18 associativas e 10 municipais.
Para identificação das amostras de forma sistemática, foi elaborada uma Ficha de Identificação de Amostra (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf), e definidos protocolos de recolha de cadáveres encontrados no campo e de material biológico em ato venatório (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/protocolo_recolha_22nov2018.pdf).
Decorreram várias ações de formação teórico-práticas e práticas (no campo) para capacitação dos técnicos na recolha de material biológico, tendo ainda sido produzido um vídeo demonstrativo destes procedimentos disponível no *site* do INIAV (http://www.iniav.pt/gca/?id=1822). Foram preparados *kits* específicos para recolha de cadáveres (*kit* envelope) e para a recolha de amostras de animais caçados (*kit* caixa) (Figura 2).
Foi também desenvolvida uma metodologia para amostragem dos animais em vida que inclui a sua captura e a recolha de material biológico, seguida de libertação. Estas colheitas realizaram-se em zonas de caça onde não se efetuaram jornadas cinegéticas durante a época venatória de 2017/2018. A metodologia de colheita de sangue da veia jugular externa sob sedação e vigilância médico-veterinária está divulgada num vídeo técnico (http://www.iniav.pt/menu-de-topo/divulgacao/edicoes-proprias/videos-institucionais/captura-e-sedacao-de-coelho-bravo).

A rede de epidemiovigilância ficou operacionalizada no início da época cinegética 2017/2018, integrando 19 pontos de receção de amostras de leporídeos (15 centros do ICNF, 3 laboratórios do INIAV e 1 das OSC), permitindo o armazenamento temporário no frio (http://www.iniav.pt/fotos/editor2/pontos_entrega_22nov2018.pdf).
Do estabelecimento desta rede de vigilância decorreu uma amostragem de leporídeos silvestres de vida livre (n=913), maioritariamente composta por amostras de coelho-bravo (91,24%, n=833) e, em menor extensão, de lebre-ibérica (8,76%, n=80).
A amostragem, maioritariamente oportunista (77,44%, n=707), é especificada na Figura 3. Foram também rececionadas amostras de raposas e roedores e capturados insetos e ixodídeos, potenciais vetores da DHV.
Em súmula, globalmente, rececionaram-se amostras de leporídeos silvestres de 15 distritos, de norte a sul de Portugal, não tendo sido amostrados os distritos de Braga, Aveiro e Viseu. A maior parte das amostras recebidas proveio dos distritos de Beja (n=338) e de Évora (n=132) (NUT II-Alentejo). Os distritos de Santarém (n=116) e Faro (n=109) também aportaram um número significativo de amostras.
O sucesso da avaliação sanitária efetuada durante o 1º ano do projeto +Coelho dependeu da boa cooperação e articulação dos parceiros, em particular entre os institutos de investigação e os técnicos e associados das OSC, que diariamente estão no terreno.
O reduzido número de amostras prejudicadas para análise laboratorial (n=5) demonstrou a eficácia da rede.
No 1º ano de projeto +Coelho foram realizadas 3948 análises laboratoriais no período entre 1 de agosto de 2017 e 31 de agosto de 2018 (Figura 4).

Resultados virológicos das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica

Todas as amostras de material biológico foram submetidas a **exame virológico** para pesquisa do vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (RHDV2) e do vírus da mi-

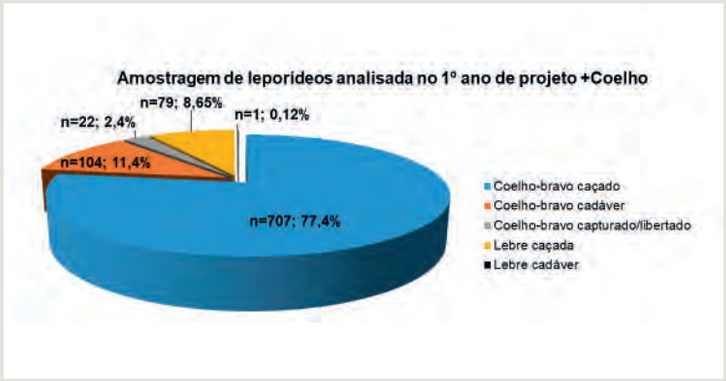


Figura 3 – Amostragem de leporídeos silvestres de vida livre recebida no decurso do 1.º ano do Projeto +Coelho

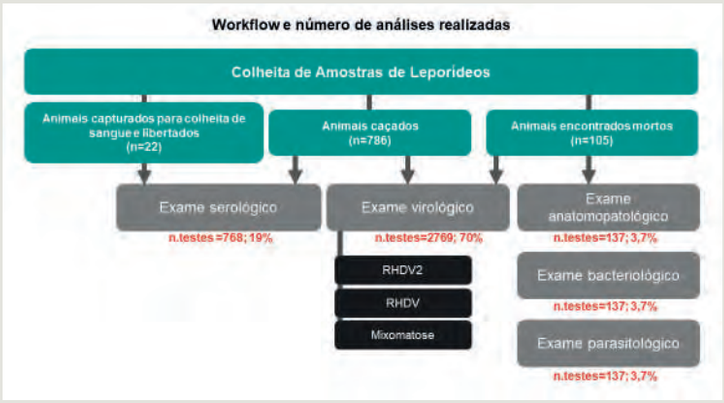


Figura 4 – Exames efetuados nos leporídeos caçados e encontrados mortos

xomatose por métodos moleculares[1,2,3]. Embora as evidências em Portugal e no estrangeiro apontassem já para a substituição das estirpes clássicas do vírus da DHV (RHDV) pelo RHDV2, uma vez que se referiam a estudos ocasionais e a regiões geográficas específicas, entendeu-se ser importante alargar a investigação à globalidade do território nacional. O RHDV (forma clássica) não foi detetado em nenhum leporídeo.

Durante este período, nenhuma **lebre-ibérica caçada ou encontrada morta no campo** testou positivamente a RHDV2 ou ao vírus da mixomatose. Os resultados obtidos para RHDV2 e mixomatose nos **coelhos-caçados e nos coelhos encontrados mortos** estão representados nas Figuras 5 e 6.

Em conjunto, os resultados obtidos no 1º ano do projeto permitiram confirmar a distribuição geográfica alargada do RHDV2 e do vírus da mixomatose em coelho-bravo a todo o território continental e obter valores de positividade na amostra relativos ao período a que se referem os dados (Figura 7).

Resultados serológicos das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica

Os dados **serológicos** permitem avaliar o contacto prévio com o vírus, dando uma indicação sobre a circulação do mesmo e a resistência das populações. Para avaliação serológica das populações de leporídeos, foram obtidas amostras de sangue dos animais caçados, por punção intracardíaca ou, em alternativa, por aspiração de sangue acumulado na cavidade abdominal. Fora da época venatória, ou em áreas com baixa densidade populacional, foi ainda possível recolher sangue de animais capturados vivos.

Globalmente, foram analisadas serologicamente 768 amostras, correspondendo a 689 amostras de coelho-bravo e 79 amostras de lebre-ibérica, recolhidas em todo o território de Portugal continental.

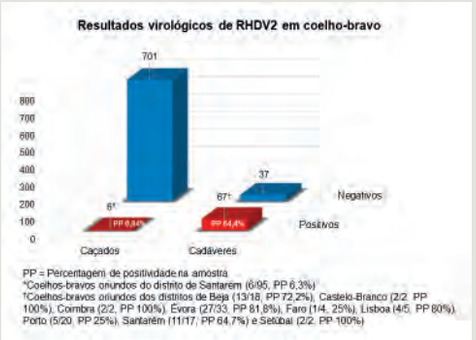


Figura 5 – Percentagem de positividade a RHDV2 na amostra



Figura 6 – Percentagem de positividade a mixomatose na amostra

Das 768 amostras foram analisadas por método indireto de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-lagovirus (RHDV e RHDV2) [4]. Cerca de 32% (n=220) das amostras de coelho-bravo foram positivas. As populações de coelho-bravo da região Centro sul de Portugal continental apresentaram uma maior percentagem de seropositividade (Figura 8). Apesar da menor amostragem, nas populações da região Norte esse valor não ultrapassou os 18% dos animais amostrados. Não obstante a baixa amostragem comparativamente à de coelho-bravo, 27% (n=21) do total de lebres analisadas possuíam anticorpos antilagovírus, sendo que a região do Alentejo mostrou maior número de animais seropositivos (Figura 8). Estes resultados sugerem que, apesar de nunca ter sido detetado RHDV2 na lebre-ibérica (todas as amostras foram negativas à presença de RNA de RHDV2), o vírus infeta esta espécie e induz uma resposta imunitária, não causando, aparentemente, nem morbilidade, nem mortalidade.

A avaliação serológica destes anticorpos, efetuada em leporídeos caçados, evidenciou o contacto das populações com o RHDV2 e permitiu inferir que o nível de imunização das populações de coelho-bravo e lebre, se representados pela amostragem, não impede a circulação do vírus no campo, já que menos de 85% da população está protegida, valor que, quando igualado ou ultrapassado, permite a interrupção da infeção.

Outros resultados laboratoriais das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica

Os **exames anatomopatológicos** dos cadáveres de coelho-bravo revelaram que a maioria dos animais apresentava uma boa condição corporal (Figura 9), evidenciando que a morte dos animais por RHDV2 acontece de forma rápida, não permitindo a deterioração da condição corporal, mais característica de formas subagudas ou crónicas da doença. Inversamente, no grupo dos animais com fraca condição corporal observou-se a maior percentagem de positividade a mixomatose.

Os dados recolhidos durante as necrópsias permitiram verificar que a presença de sangue nas fossas nasais (epistaxis) e região perinasal e as lesões congestivo-hemorrágicas e de descoloração hepática, frequentemente presentes nos animais positivos a RHDV2, nem sempre foram verificados, reforçando a necessidade de se proceder ao diagnóstico laboratorial.

A forma nodular de mixomatose em coelho-bravo foi a mais frequente, caracterizada por edemas e lesões nodulares nas orelhas e regiões periocular, perivulvar, perioral e perinasal. Em conjunto ou isoladamente,

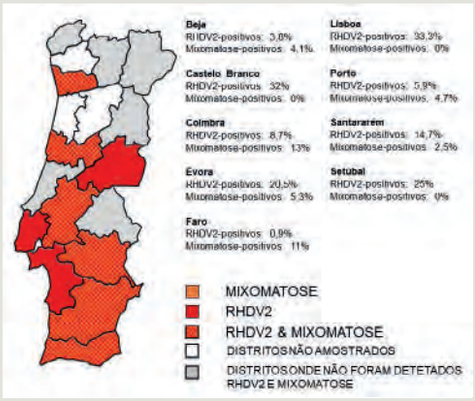


Figura 7 – Distribuição do RHDV2 e do vírus da mixomatose em Portugal continental no período entre 1 de agosto de 2017 e 31 de agosto de 2018

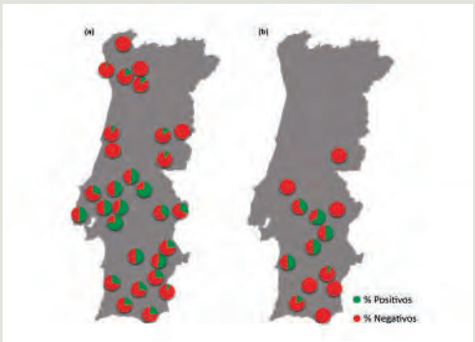


Figura 8 – Percentagem de soros positivos/negativos por localidade para coelho-bravo (A) e para lebre-ibérica (B)

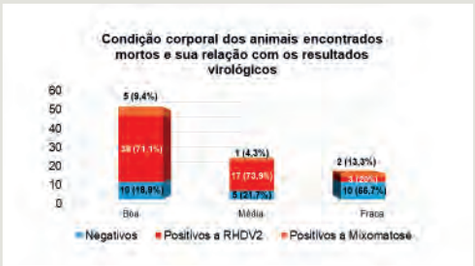


Figura 9 – Condição corporal (boa, média, fraca) dos leporídeos relativamente aos resultados virológicos

estas lesões foram encontradas em todos os animais positivos a mixomatose. No entanto, dado que nas formas pulmonares desta doença estes sinais exteriores estão ausentes, é necessário proceder-se sempre ao diagnóstico laboratorial.

Nos **exames bacteriológicos**, foram identificadas bactérias patogénicas com potencial zoonótico em 34 dos 104 (32,7%) cadáveres de coelho-bravo testados, com potencial risco para a Saúde Pública, quer pelo contacto direto com estes animais, quer por ingestão da sua carne. Foram identificadas 16 espécies de bactérias, sendo as mais frequentes *Escherichia coli* (12,5% positivos na amostra de coelho-bravo) e *Staphylococcus warneri* (5,8% de positivos na amostra de coelho-bravo). As restantes bactérias isolaram-se em menos de 2% da amostragem, não sendo, aparentemente, um fator de impacto significativo na saúde das populações de coelho-bravo analisadas.

Cerca de 75% dos coelhos-bravos investigados por **exame parasitológico** evidenciaram parasitismo, com infeções mistas frequentes por coccídeas, céstodes e nemátodos. O parasitismo por céstodes referiu-se sobretudo a *Cittotenia* spp., e o parasitismo por nemátodes maioritariamente a *Graphidium strigosum*, *Trichostrongylus retortaeformis*, *Passalurus ambiguus* e *Dermatoxys veligera*. Apenas no caso de parasitismo por *Graphidium strigosum* e *Trichuris leporis* foram identificadas grandes cargas parasitárias.

Relativamente à presença de protozoários, apenas 41 cadáveres não apresentaram infeções por coccídeas, sendo que 60,6% dos animais apresentavam infestações simples ou múltiplas por espécies de *Eimeria* spp., nenhuma com potencial zoonótico.

Embora não se possa fazer uma associação causal entre parasitismo e mortalidade, a debilidade por parasitismo leva à redução da resposta imunitária às infeções, contribuindo indiretamente para as taxas de morbilidade e mortalidade.

Desenvolvimento de alimento composto especificamente formulado para o coelho-bravo

As elevadas cargas parasitárias intestinais detetadas em animais provenientes de algumas das 49 zonas de caça amostradas, e a heterogeneidade da condição corporal dos leporídeos testados, alertaram para a necessidade de se complementar a alimentação de algumas populações de coelho-bravo, de forma a melhorar a condição física dos animais e, consequentemente, a resposta imunitária aos agentes patogénicos, acelerando assim a sua recuperação. Para o efeito, o GT, em parceria com a Associação dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA) e cinco dos seus associados, nomeadamente as Rações Zêzere, De Heus, Sorgal, Mazel e Rico Gado, desenvolveu um alimento composto não medicamentoso para ser distribuído em zonas de caça onde a indisponibilidade ou escassez de alimento sejam fatores limitantes na recuperação das populações.

Este alimento composto será também utilizado para veicular antiparasitários, e mais tarde a vacina oral contra a DHV, na forma de alimento medicamentoso.

Por forma a assegurar um elevado índice de ingestão do alimento composto, particularmente em condições de abundância de outros alimentos naturais, foi avaliado o impacto da incorporação de um determinado aromatizante (tomilho, fenacho ou anis) no consumo da ração por 7 populações de coelho-bravo.

Os ensaios foram conduzidos em 7 zonas de caça, de forma cega, entre agosto e outubro 2018. Em 6 zonas de caça, a ração contendo tomilho foi ingerida mais rapidamente. Embora numa zona de caça a ração contendo anis tenha sido a preferida, os dados deste ensaio indicam que, dos três aromatizantes testados, o tomilho constitui o mais atrativo quando comparado com o fenacho ou com anis. Contudo, esta preferência pode variar em função das condições naturais e hábitos alimentares das populações em causa.

Os alimentos medicamentosos com vista à correção das cargas parasitárias serão disponibilizados aos utilizadores finais (gestores de zonas de caça), devidamente identificados, pelas OSC, que ficarão legalmente habilitadas para esta distribuição através de protocolo estabelecido com a Divisão de Alimentação Animal da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), no âmbito da valoração experimental dos alimentos medicamentosos (Artigo 12º e Artigo 18º do Decreto-Lei 151/2005 de 30 de agosto).

Caracterização da demografia do coelho-bravo

No âmbito da avaliação das populações naturais de coelho-bravo, foram implementados sistemas de monitorização em 9 áreas de estudo selecionadas pelas OSC (Figura 10).

As monitorizações foram efetuadas por métodos indiretos (contagem de excrementos com remoção, em pontos fixos)[5] e por mé-

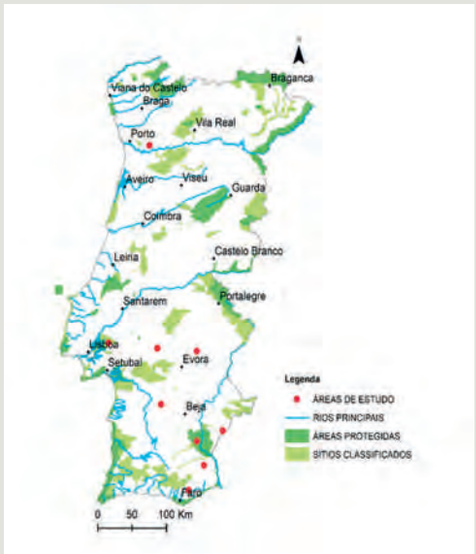


Figura 10 – Localização da 9 Zonas de Caça (áreas de estudo a vermelho) onde foi estabelecida a monitorização das populações de coelho-bravo

todos diretos (contagens diretas por distâncias de coelhos-bravos numa área extensa da zona de caça, centrada nas áreas monitorizadas pela contagem de excrementos em pontos fixos)[6], tendo as densidades sido estimadas através de modelos estatísticos.

A capacitação dos técnicos das OSC para a monitorização das populações implicou a formação técnica dos mesmos e o desenvolvimento de um caderno de registo periódico de informação.

Os resultados das avaliações demográficas mostraram que as densidades encontradas nos núcleos populacionais das diferentes áreas de estudo para o mês de julho (época de máximo populacional e mês em que todas as áreas foram amostradas) foram heterogéneas, com valores de erro-padrão elevados, registando-se valores médios acima dos 100 indivíduos/ha, em algumas zonas de caça, e valores perto de 1 indivíduo/ /ha, noutras. No entanto, o reduzido período de monitorização em cada zona de caça não permitiu a análise adequada das respetivas tendências populacionais, nem dos fatores que as afetam.

Quatro das zonas de caça monitorizadas neste projeto (Benavente, Ferreira do Alentejo, Serpa e Tavira) foram monitorizadas em 2015/2016 no âmbito do projeto SOS Coelho, no qual se aplicaram os mesmos métodos e áreas de amostragem. Foi, por isso, possível fazer uma comparação da densidade média de coelho-bravo para três delas (Benavente, Ferreira do Alentejo e Serpa), tendo-se observado um decréscimo das populações de coelho-bravo em duas destas zonas de caça (Benavente e Ferreira do Alentejo) e um aumento na terceira (Serpa). Este estudo revelou também uma aparente relação positiva entre a proporção de indivíduos com anticorpos contra RHDV2 e a densidade da população no seu máximo teórico (julho).

Determinação da importância de outras espécies e de vetores na transmissão e disseminação de RHDV2

Foi investigado o papel de insetos, ixodídeos, roedores e mesocarnívoros capturados em zonas de caça na transmissão e disseminação de RHDV2, através da deteção de RNA viral.

Foi detetado RNA de RHDV2 em insetos descritos em Portugal (do género *Culicoides* e *Simulium*), demostrando o seu papel na transmissão da DHV.

No que se refere aos ixodídeos (carraças) recolhidos no campo, não foi detetado RNA viral de RHDV2. No entanto, a reduzida amostragem (n=38) não permite conclusões sobre o seu papel na disseminação mecânica deste vírus.

Nenhum dos 18 roedores e das 13 raposas analisadas apresentava lesões compatíveis com DHV ou foi positivo na pesquisa de RHDV2 por métodos moleculares.

Ações de educação, sensibilização, disseminação de conhecimento e transferência de competências

A transferência de informação e conhecimento entre os parceiros e para fora do GT +Coelho foi um aspeto privilegiado e assegurado através de vários meios de comunicação. As ações conduzidas pelo GT e os resultados obtidos no decurso do 1º ano foram amplamente divulgados, de forma a promover a discussão das estratégias de intervenção com os atores no terreno e outros especialistas na área. Foram promovidos eventos de diversas tipologias para públicos-alvo variados, nomeadamente caçadores, gestores, proprietários e demais utilizadores do território, indústria, decisores políticos, entre outros. Foram ainda desenvolvidas ações de educação e sensibilização junto do público em geral, em especial do público jovem, acerca da importância da preservação da biodiversidade e do papel da cinegética nesse processo.

A informação produzida durante o projeto +Coelho tem vindo a ser divulgada em vários canais de comunicação, nomeadamente no *site* do INIAV, no *banner* +Coelho, sob a forma de notícias e de alertas e recomendações para minimizar a transmissão e disseminação de RHDV2 e de mixomatose, em entrevistas televisivas, em revistas de circulação nacional para público não especializado, em colóquios e feiras de caça nacionais e estrangeiras, em *workshops* de sensibilização do público, em congressos científicos nacionais e internacionais, e sob a forma de cartazes e folhetos e de manuais práticos de apoio ao setor (http://www.iniav.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos).

Desenvolvimento de plataforma interativa e de um inquérito epidemiológico

Está em curso o desenvolvimento de uma plataforma interativa para divulgação de informação gráfica variada em tempo real (áreas afetadas, localização de surtos, evolução da doença e análise estatística simples), elaborada pelo Departamento de Logística e Sistemas de Informação do INIAV I.P. Foi já concluído, com recurso ao *Survey123* para *ArcGis* (Esri®), um inquérito epidemiológico que será distribuído pelas Associações e Confederações de Caça para recolha de dados de exploração, edafoclimáticos, hidrográficos, de paisagem, de solo, de culturas, etc., e que, em articulação com os dados sanitários e demográficos, permitirão a identificação das condições que favorecem a recuperação do coelho-bravo e o desenvolvimento de modelos para apoio à gestão.

Considerações finais

O Projeto +Coelho 1, intitulado "Avaliação ecossanitária das populações naturais de coelho-bravo visando o controlo da doença hemorrágica viral", permitiu, entre outras ações, pôr em prática monitorizações sanitárias dos leporídeos silvestres à escala continental e dar início a avaliações demográficas em algumas zonas de caça.

Os resultados obtidos durante os 14 meses do projeto +Coelho 1 geraram conhecimento crucial para a compreensão do estado sanitário das populações de coelho-bravo e lebre-ibérica, permitindo também adequar e ajustar as medidas que serão implementadas no Projeto +Coelho 2, de forma a acelerar a recuperação das populações no território nacional e salvaguardar a preservação destas espécies autóctones, que são nosso património.

O desenvolvimento de uma vacina oral foi iniciado em outubro de 2018, através de financiamento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projeto Fight-Two – PTDC/ /CVT – CVT/29062/2017).

Financiamento

Projeto "+COELHO: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Referências bibliográficas

[1] Duarte *et al.* (2015). *J. Virol. Methods*, **219**:90-95. doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.017.

[2] Tham *et al.* (1999). *Virus Genes.*, **18**(3):235-42.

[3] Duarte *et al.* (2014). *J. Virol. Methods*, **196**:219-224. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.014.

[4] Bárcena *et al.* (2015). *Vet. Res.*, **46**(1):106.

[5] Fernandez-de-Simon *et al.* (2011). *European Journal of Wildlife Research*, **57**(5):1091-1100.

[6] Buckland *et al.* (2001). *Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations*. Oxford University Press.



O vírus da mixomatose foi detetado pela primeira vez em Portugal numa lebre adulta encontrada morta numa zona de caça localizada no distrito de Évora.

20 perguntas & respostas sobre mixomatose em lebre-ibérica

A lebre-ibérica *(Lepus granatensis)* é uma espécie icónica do nosso país que, fruto de surtos de mortalidade provocada pela mixomatose, atravessa um dos piores momentos da sua história recente, constatando-se uma diminuição significativa das populações em muitas zonas de caça. Decorreram 18 meses desde a deteção do primeiro surto de mixomatose em lebre-ibérica em Espanha, em julho de 2018. Uns meses mais tarde, em outubro de 2018, a mixomatose na lebre-ibérica foi também confirmada em Portugal.

TEXTO: MARGARIDA DUARTE, FÁBIO A. SANTOS, CARINA CARVALHO, TERESA FAGULHA, JÉSSICA MONTEIRO (INIAV), PEDRO ESTEVES, JOANA ABRANTES, ANA M. LOPES, PAULO CÉLIO ALVES, NUNO SANTOS (CIBIO-INBIO), PATRÍCIA TAVARES SANTOS, PEDRO MELO (DGAV)
FOTOS: ISTOCK, ARQUIVO E GRUPO DE TRABALHO +COELHO

Em apenas um ano, a redução das populações de lebre-ibérica no nosso país tem sido estimada pelos caçadores e proprietários rurais de muitas zonas de caça, em 70 a 90%.

Esta redução abrupta também tem sido constatada pela equipa do Grupo de Trabalho +Coelho nas ações que vem realizando no campo em muitas zonas de caça.

Este artigo destina-se aos agentes dos setores económico, cinegético e ambiental com atividades nas áreas do turismo rural, turismo da natureza, produção agrícola e pecuária, caça e preservação da biodiversidade, e pretende responder, de forma simples e objetiva, a um conjunto de questões sobre a emergência desta doença.

1 Quando e onde foi detetado o vírus da mixomatose na lebre-ibérica (designado por MYXVrec) pela primeira vez?

A presença do vírus da mixomatose na lebre-ibérica foi confirmada por diagnóstico laboratorial no Laboratorio Central Veterinaria-Sanidad Animal, em Algete, Madrid, em julho de 2018. Os animais apresentavam sinais compatíveis com mixomatose e foram encontrados mortos em zonas de caça situadas nos municípios de Montalbán e La Rambla (Córdoba)[1].

2 Quando foi detetado o MYXVrec em Portugal?

O vírus da mixomatose foi detetado pela primeira vez em Portugal numa lebre adulta encontrada morta no distrito de Évora, numa zona de caça. O diagnóstico virológico foi efetuado no Laboratório Nacional de Referência para as doenças dos animais (INIAV, Oeiras), em outubro de 2018.

3 Há quanto tempo circula o MYXVrec?

As primeiras evidências de mortalidade em lebre causada por mixomatose surgiram no início do Verão de 2018, em Espanha. No entanto, é impossível datar com precisão o aparecimento de uma determinada doença numa espécie selvagem, pois a emergência de um agente patogénico só se torna percetível depois de ocorrer mortalidade de um número significativo de animais, passível de ser reconhecida como um acontecimento anormal. Por esta razão é provável que o vírus estivesse ▸



FOTO: JOAQUIM BRUNHETA

É provável que o vírus estivesse já em circulação há algum tempo antes da observação de eventos de mortalidade anormal em lebre nos dois países.

já em circulação há algum tempo antes da observação de eventos de mortalidade anormal em lebre nos dois países. Dado o reduzido intervalo (menos de 3 meses) entre as primeiras confirmações laboratoriais nos dois países, não se pode afirmar com certeza, se o vírus surgiu primeiro em Espanha ou em Portugal. No entanto, estudos retrospetivos poderão ajudar a responder a esta pergunta.

4 Que espécies de lebre são afetadas pelo MYXVrec?

Até à data, apenas foram registados casos na lebre-ibérica, *Lepus granatensis,* em Portugal e em Espanha. Desconhece-se, no entanto, se as outras espécies de lebre existentes na Europa, são suscetíveis à infeção por este vírus.

5 O que sabemos sobre o MYXVrec na lebre-ibérica?

O vírus da mixomatose da lebre-ibérica, tal como o vírus da mixomatose do coelho-bravo, é um leporipoxvirus, pertencente à Família Poxviridae.

No entanto, o vírus da mixomatose da lebre-ibérica é um vírus recombinante, resultante da combinação do material genético do vírus da mixomatose dos coelhos

O contacto das populações de lebre- bérica com as estirpes do vírus da mixomatose que vêm circulando em coelhos, desde a sua emergência no início da década de 50, foi inevitável

com material genético adicional, cuja origem ainda não foi possível perceber com exatidão. A inclusão deste material suplementar levou à interrupção de um gene e à duplicação de quatro outros. Alguns autores sugeriram que tivesse origem num poxvirus relacionado com os poxvirus de caprinos e de cervídeos[3] outros que terá resultado da translocação de genes do próprio vírus da mixomatose do coelho[4].

6 Qual a origem deste vírus recombinante?

Não se sabe. Poderá ter resultado da co-infeção de um hospedeiro suscetível por dois vírus distintos, seguida de recombinação dos seus materiais genéticos[3]. Os eventos de recombinação são frequentes nos vírus, constituindo uma forma natural de gerar diversidade genética. Daí o perigo da introdução de espécies exóticas, que podem transportar vírus que potenciem este fenómeno de transferência, ou formação, de agentes patogénicos altamente infeciosos para as espécies nativas.

7 O vírus da mixomatose que infeta os coelhos-bravos é o mesmo que o MYXVrec das lebres?

Não. O vírus da mixomatose que circula na lebre-ibérica é distinto do vírus que circula no coelho-bravo. As estirpes do vírus da mixomatose que circulam em coelhos são as que habitualmente infetam esta espécie. O vírus que infeta a lebre-ibérica, é um vírus recombinante com aparente especificidade para a lebre, e que não parece infetar coelhos3,4.

8 É a primeira vez que as lebres são afetadas por mixomatose?

Não. No entanto, os casos anteriormente descritos de mixomatose em lebre foram muito esporádicos, registados apenas em lebre-europeia *(L. europaeus)*[5] e em lebre-da-montanha *(L. timidus)*[6,7,8].

9 Porque é que a lebre-ibérica não foi afetada por mixomatose no passado?

No que diz respeito à lebre-ibérica, embora não existam registos escritos, há testemunhos de caçadores reportando o avistamento muito ocasional no passado de exemplares de lebre-ibérica com sinais compatíveis com mixomatose.

O contacto das populações de lebre-ibérica com as estirpes do vírus da mixomatose que vêm circulando em coelhos, desde a sua emergência no início da década de 50, foi inevitável. A ausência de patologia numa espécie pode decorrer da incapacidade do agente infecioso infetar esta espécie (espécie refratária à infeção) ou da existência de resistência natural à doença. No primeiro caso, a lebre-ibérica não seria suscetível à infeção, por exemplo pela inexistência do recetor nas suas células utilizado pelo vírus, enquanto no segundo, ocorreria infeção, com desenvolvimento de formas de doença subclínicas, e que por isso despercebidas, ou a infeção não seria produtiva, isto é, o vírus não se conseguiria replicar eficientemente nos tecidos da lebre (infeção abortiva).

Por outro lado, a deteção confirmada de anticorpos contra o vírus da mixomatose em soros de lebre-ibérica, colhidos antes e depois da emergência do MYXVrec, sugere que o vírus da mixomatose terá de facto capacidade de estimular uma resposta imunitária na lebre-ibérica, logo de infetar esta espécie, mesmo sem causar doença (patologia).

Assim, o facto de a lebre-ibérica estar a ser gravemente afetada pelo MYXVrec sugere, entre outras hipóteses, que a mutação que ocorreu neste vírus foi responsável pela aquisição de capacidade do vírus passar a causar doença na lebre-ibérica e de se transmitir eficientemente entre indivíduos4.

10 O que sabemos sobre esta nova doença na lebre-ibérica?

O período de incubação da mixomatose em lebre-ibérica parece ser bastante curto, provavelmente comparável ao período de incubação da doença em coelho-bravo (5 dias).

Os dados atualmente disponíveis mostram que o vírus da mixomatose da lebre-ibérica é bastante agressivo (i.e. de elevada virulência), tendo em vista a redução evidente de muitas populações naturais após a sua emergência, a gravidade dos quadros clínicos observados e a elevada mortalidade associada à infeção. Com efeito, 80,9% (51/63) das lebres encontradas mortas (vigilância passiva) desde a emergência deste vírus, foram positivas, enquanto no grupo dos animais caçados (vigilância ativa) essa percentagem foi apenas de 9,1% (4/44). O facto de ocorrer uma boa condição corporal na maioria dos exemplares de lebre encontrados mortos que testam positivamente ao vírus da mixomatose, sugere também que o curso da doença seja muito rápido e breve, compatível com uma forma de doença aguda, o que poderá justificar a inexistência de mixomas por não se verificarem infeções crónicas, mais arrastadas.

11 Como se transmite e dissemina o MYXVrec na lebre-ibérica?

Tudo indica que o vírus da mixomatose da lebre-ibérica se transmita da mesma forma que o vírus da mixomatose do coelho-bravo, isto é, por contacto direto entre animais infetados e indiretamente, através de vetores como pulgas e mosquitos, funcionando estes como vetores mecânicos[10,11]. A rapidez com que a doença se disseminou em Espanha e em Portugal, sugere que a transmissão possa ter ocorrido através de insetos voadores, nomeadamente mosquitos.

12 Quais os sinais de doença por MYXVrec?

Embora até à data não se tenha observado em lebre-ibérica os típicos mixomas observados em coelhos com mixomatose, outros sinais característicos como, inchaço (edema) das pálpebras, lábios, nariz e genitais, inflamação das pálpebras (blefaro-conjuntivite), corrimento nasal, prostração e febre, estão presentes.

13 Como tem evoluído a doença no nosso país?

Entre finais de outubro de 2018 e a presente data, foram testadas 108 lebres, 63 destas encontradas cadáveres ou moribundas e 44 caçadas em ato venatório. No primeiro grupo, 51 animais foram positivos para a mixomatose, correspondendo a 80,9% da amostragem.

O valor de percentagem de positividade na amostra de lebres encontradas mortas por trimestre (Figura 2), evidenciou uma tendência crescente, indicativa de progressão e disseminação da doença.

No grupo dos 44 animais caçados, apenas 4 foram positivos (9,1%), tendo a maioria destas amostras (n=39, 86,4%) sido recolhida durante a época venatória 2018/2019. A reduzida amostragem testada até à data,

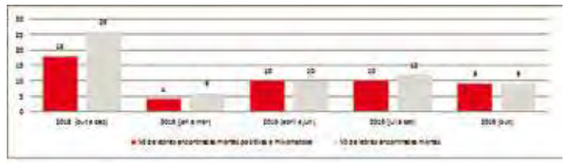


Figura 1. Número de lebres positivas a MYXV (vermelho) e testadas (cinzento), encontradas mortas entre outubro de 2018 e outubro de 2019 (por trimestre).

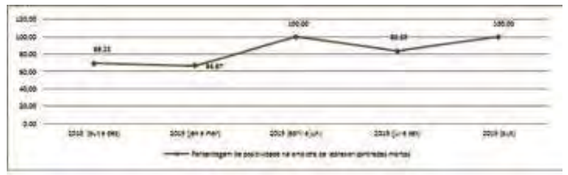


Figura 2. Percentagem de positividade na amostra de lebres encontradas mortas por trimestre (out 2018 a out 2019)

decorrente de colheitas efetuadas na época venatória 2019/2020 (n=6, todas recolhidas em outubro de 2019), não permite ainda antever a tendência de positividade neste grupo.

14 Qual a probabilidade de uma lebre-ibérica infetada sobreviver à doença?

Em Espanha, a taxa de mortalidade média aparente (calculada pelo número de mortes associadas à mixomatose dividido pelo número médio estimado de lebres ibéricas em cada zona de caça) foi estimada em 56,7%, e a taxa de fatalidade (expressa como a proporção de lebres encontradas mortas pelo número total de animais clinicamente afetados) em 69,2%, indicando que cerca de 70% dos animais infetados não sobrevivem à doença[12]. Este valor é ligeiramente inferior ao valor da percentagem de positividade na amostra de lebre-ibérica encontradas mortas entre outubro de 2018 e dezembro de 2019, em Portugal (80,9%).

No entanto, há que ter em consideração que a mortalidade observada no campo é muito subestimada devido à insuficiente ou inexistente prospeção em muitas zonas de caça, à predação fácil ▸



Os sinais macroscópicos incluem alguns dos observados nos coelhos com mixomatose, nomeadamente, febre, prostração, inflamação dos olhos e das pálpebras (blefaro-conjuntivite), corrimento nasal e inchaço (edema) dos lábios, nariz, genitais e pálpebras, que por isso se apresentam fechadas.



A suspensão da caça deverá ser avaliada caso a caso, estando acima de tudo dependente da existência de dados sobre a densidade população de lebre-ibérica na zona de caça, bem como da taxa de mortalidade causada pela mixomatose.

dos animais doentes, e à necrofagia dos cadáveres por parte dos predadores. Por outro lado, a partir de meados do outono a final da primavera, a erva pode dificultar a deteção dos cadáveres. Tendo em consideração a gravidade dos sinais clínicos observados nos animais infetados e o impacto da infeção na fisiologia do animal, a frequente ocorrência de infeções secundárias devido à ação imunossupressora do vírus da mixomatose, a incapacidade dos animais se alimentarem devido à cegueira decorrente do extenso edema das pálpebras e, consequentemente à maior exposição à predação, a probabilidade de uma lebre infetada sobreviver à infeção é baixa.

15 As lebres que sobrevivem à infeção ficam imunizadas?

Os dados divulgados em Espanha indicam que não, mas não existe ainda nenhum estudo científico publicado sobre este assunto. Algumas evidências sugerem que, quando infetadas, as lebres desenvolvem anticorpos contra o vírus da mixomatose, mas estes desaparecem ao fim de pouco tempo (2-3 meses), sendo possível nova reinfeção e o desenvolvimento de doença. No entanto, uma vez que estes dados resultam de observações recolhidas de um número reduzido de animais e de ensaios efetuados no campo (i.e. sem total controlo das condições sanitárias dos animais durante o ensaio), terão ainda de ser confirmados.

16 O que pode ser feito no campo para controlo desta doença?

Há um conjunto de medidas práticas que, coletivamente, contribuem para a redução da disseminação da doença e para o seu controlo:

1) Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;

2) Recolha dos cadáveres de lebres, utilizando Kit Envelope (disponibilizado pelas Organizações do Setor da Caça ou solicitado ao INIAV), ou na sua indisponibilidade, sacos de plástico limpos e a ficha de identificação da amostra preenchida, disponível em http://www.iniav.pt/fotos/editor2/identificacao_amostra_set2018.pdf, ou uma folha de papel onde deverá ser registada a identificação do material (dia e local de colheita, zona de caça, distrito, nome e email/telefone do operador). A entrega dos cadáveres deve ser feita nos pontos de recolha que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho, que podem ser consultados em http://www.iniav.pt/fotos/editor2/pontos_entrega_22nov2018.pdf. Caso não seja efetuada a entrega de imediato, se possível, congelar o cadáver (-20ºC) até à sua entrega;

3) Eliminação dos exemplares que não possam ser enviados para o laboratório, através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;

4) Adoção de medidas de higiene, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, aquando da saída das zonas de caça;

5) Limpeza e desinfeção periódica dos bebedouros;

6) Não efetuar a evisceração de animais no campo, durante o ato venatório. Caso o façam, ter elevadas precauções, nomeadamente fazer a evisceração sobre um plástico, para evitar contaminação de solos, e subsequente eliminação dos subprodutos através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada. É muito importante nunca dar as vísceras aos cães nem as deixar sobre o solo, pois poderá potenciar a disseminação do vírus;

7) Controlo de vetores, evitando a existência de lixo a céu aberto. A utilização de armadilhas para moscas é recomendada;

8) Não efetuar movimentação (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de áreas afetadas;

9) Não realizar introduções de coelhos-bravos e de lebres oriundas de outros países sem a respetiva certificação sanitária.

17 Se encontrar um animal doente ou morto o que devo fazer?

Sobre o que fazer com um animal doente, as opiniões divergem. Se do ponto de vista epidemiológico, a eutanásia e eliminação dos animais doentes permite reduzir os focos de infeção, a recuperação natural dos animais doentes pode levar ao aumento da imunidade a nível populacional, favorecendo a longo prazo o equilíbrio destas com o vírus. No entanto, não existindo até ao momento evidências de que as lebres ficam efetivamente imunizadas contra a mixomatose, recomenda-se a sua eutanásia, observando os devidos cuidados de manipulação sob risco de constituírem focos para novas infeções.

Os cadáveres de animais sujeitos a eutanásia, assim como dos encontrados mortos, devem ser remetidos para análise no INIAV de acordo com as indicações no ponto 16, ou eliminados através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada.

18 Os antibióticos são úteis para tratar a mixomatose? Existe alguma vacina para controle desta doença?

Não. Sendo uma doença de origem viral, os antibióticos não têm qualquer ação sobre o MYXVrec. Para além disso, a administração de antibióticos conduz frequentemente a um quadro de desequilíbrio da flora intestinal (disbiose), podendo resultar na morte do animal por malnutrição e diarreias. No entanto, a administração de antibiótico em caso de conjuntivite ou de pneumonia secundária de origem bacteriana, pode ser útil no tratamento dos animais, em situação de cativeiro. Neste caso importa relembrar que a detenção de lebre-ibérica em cativeiro carece sempre de autorização prévia do ICNF, e que, a utilização de antibióticos ou outros medicamentos deverá ser sempre acompanhada por um Médico Veterinário.

De momento, não existe nenhuma vacina específica para a lebre-ibérica. Decorrem em Portugal e em Espanha ensaios para determinar se as vacinas comerciais para coelho doméstico são efetivas em lebre-ibérica.

19 Pode consumir-se uma lebre com mixomatose?

Não. A mixomatose é causada por um vírus que, até à data, apenas foi isolado em leporídeos (coelhos e lebres), não sendo por isso zoonótico (i.e., que afete o homem e os animais). Este não é, porém, um argumento válido para justificar o consumo, uma vez que, qualquer que seja a patologia, nenhum animal doente deve ser consumido. Acresce que, pelo facto de os animais com mixomatose desenvolverem imunossupressão (i.e., o sistema imunitário fica comprometido e incapaz de proporcionar as defesas habituais), ocorrem frequentemente infeções bacterianas secundárias que podem ser transmitidas ao homem através do consumo da carne dos animais doentes.

20 É aconselhável suspender a caça nas zonas de caça afetadas?

Esta situação deverá ser avaliada caso a caso, estando acima de tudo dependente da existência de dados sobre a densidade população de lebre-ibérica na zona de caça, bem como da taxa de mortalidade causada pela mixomatose. De salientar, que em alguns países, nomeadamente na Irlanda e Escócia, o governo suspendeu a caça à lebre face ao impacto que os surtos de RHDV2 tiveram na lebre-variável *(Lepus timidus)*, como medida de precaução, permitindo um número de efetivos reprodutores mais elevado, manutenção de animais resistentes, e por conseguinte uma mais rápida recuperação da população.

Embora em Portugal a caça de lebre-ibérica não tenha sido proibida oficialmente, no cumprimento dos seus direitos de gestão e à semelhança do que aconteceu em Espanha, muitas zonas de caça decidiram não caçar lebre-ibérica nesta época venatória (2019/2020), principalmente pela modalidade de salto. A caça a corrição, por ser extremamente seletiva, tem um impacto menor pois geralmente os animais capturados não estão em condições sanitárias perfeitas.

De toda forma, é fortemente aconselhável a monitorização continuada das populações de lebre-ibérica e sua vigilância sanitária, por forma a ser possível uma tomada de decisão adequada sobre a exploração cinegética. ■

AGRADECIMENTOS

A colaboração das Organizações do Sector da Caça, caçadores, gestores e proprietários rurais, tem sido fundamental para a implementação de algumas medidas pelo Grupo de Trabalho +Coelho, destacando-se o seu empenho na prospeção ativa e recolha de cadáveres do campo, que só é possível através do conhecimento dos territórios e da amostragem em eventos de caça.
Financiamento: Fundo Florestal Permanente (FFP), ICNF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: situación de brote de mixomatosis en liebre ibérica (07/11/2019): https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/notamixomatosis07112019_tcm30-482844.pdf
2. OIE. Myxomatosis, Portugal. 2018. Available at: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=28628.
3. Águeda-Pinto A., Lemos de Matos A., Abrantes M., Kraberger S., Risalde M.A., Gortázar C., McFadden G., Varsani A., Esteves P.J. Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (Lepus granatensis). Viruses. 2019. Jun 7;11(6). pii: E530. doi: 10.3390/v11060530.
4. Dalton K.P., Martín J.M., Nicieza I., Podadera A., de Llano D., Casais R., Gimenez S., Badiola I., Agüero M., Duran M., Buitrago D., Romero L.J., García E., Parra F. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. Transbound Emerg Dis. 2019 Nov;66(6):2218-2226. doi: 10.1111/tbed.13296. Epub 2019 Aug 4.
5. Barlow A., Lawrence K., Everest D., Dastjerdi A., Finnegan C., Steinbach F. Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. Vet Rec. 2014. Jul 19;175(3):75-6. doi: 10.1136/vr.g4621.
6. Stanford M.M., Werden S.J., McFadden G. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. Vet Res. 2007. Mar-Apr;38(2):299-318. Epub 2007 Feb 13.
7. Fenner, F.; Ratcliffe, F.N. Myxomatosis. Cambridge University Press. 1965.
8. Saari S.A., Rudbäck E., Niskanen M., Syrjälä P., Nylund M., Anttila M. Contagious mucocutaneous dermatitis of the mountain hare (Lepus timidus): pathology and cause. J Wildl Dis. 2005. Oct;41(4):775-82.
9. Guixeras, J. Tratado de la mixomatosis. 1957. Graf. Bat, Salt, Girona. (126 pp).
10. Fenner F., Day M.F., Woodroofe G.M. Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. J Hyg (Lond). 1956 Jun;54(2):284-303.
11. Flowerdew J.R., Trout R.C., Ross J. Myxomatosis: population dynamics of rabbits (Oryctolagus cuniculus Linnaeus, 1758) and ecological effects in the United Kingdom. Rev Sci Tech. 1992 Dec;11(4):1109-13.
12. García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, Dalton KP, Caballero-Gómez J1, Agüero M, Zorrilla I, Gómez-Guillamón F. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (Lepus granatensis).Transbound Emerg Dis. 2019 Nov;66(6):2204-2208. doi: 10.1111/tbed.13289. Epub 2019 Jul 19.



Algumas evidências sugerem que, quando infetadas, as lebres desenvolvem anticorpos contra o vírus da mixomatose, mas estes desaparecem ao fim de pouco tempo (2-3 meses), sendo possível nova reinfeção e o desenvolvimento de doença.

Vacina oral contra a doença hemorrágica Para quando?

O impacto da doença hemorrágica viral dos coelhos nas populações silvestres é amplamente reconhecido pelos agentes cinegéticos, proprietários rurais, ambientalistas e conservacionistas. O efeito destrutor desta infeção no equilíbrio e sustentabilidade das populações de coelho-bravo, conduziu à redução significativa (estimada em 70-80%) da maioria das populações naturais de coelho-bravo.

TEXTO: **MARGARIDA DUARTE (INIAV), CARINA CARVALHO (INIAV) ANTÓNIO ROLDÃO (IBET)**
FOTOS: **ISTOCK**

FIGHT 2
ICNF
Financiado pelo Fundo Florestal Permanente

O impacto negativo da Doença Hemorrágica viral dos coelhos é comprovado por evidências científicas, nomeadamente pelos resultados de análises laboratoriais de programas de vigilância e pelos dados das avaliações demográficas das populações de coelho-bravo, que justificaram a alteração recente do estatuto de conservação das populações naturais de coelho-bravo de "quase ameaçado" para "em perigo" pela (União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN).

Por outro lado, o conhecimento científico atual, nomeadamente no que toca à comprovada capacidade imunizante do vírus da doença hemorrágica viral quando administrado por via oral e à possibilidade de se construírem partículas de tipo viral (VLPs) com este vírus por recurso a processos biotecnológicos, sustenta a possibilidade de se produzir com sucesso, uma vacina oral ajustável à evolução do vírus, para animais silvestres. ▸



A vacinação de populações silvestres só é possível através de vacinas distribuídas na forma de isco.



A colaboração dos gestores e caçadores, e fundamental na recolha de amostras de coelho-bravo em ato venatório, como de cadáveres encontrados no campo.

O PROJETO FIGHT-2

Margarida Duarte (PI, investigadora do INIAV) e António Roldão (co-PI, investigador do iBET), consideraram esta aposta importante e necessária, submetendo a a 30 de maio de 2017 um projeto a **financiamento pela Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT,** concurso SAICT-2/17), **designado Projeto Fight-Two (ou Fight-2).** Este projeto propôs o desenvolvimento da vacina oral para RHDV2, baseada em biotecnologia de VLPs, e foi aprovado em 23 de março de 2018.

O **Projeto Fight 2 é uma parceria de 4 instituições,** nomeadamente o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV) e a Universidade de Évora (UE), contando com a colaboração a tempo integral de uma investigadora doutorada em RHDV, contratada em março de 2019.

- Aquando da elaboração do Plano de Ação Contra a Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, determinado pelo despacho 4757/17 de 31 de maio do MAFDR, esta medida (Desenvolvimento de uma vacina oral contra a doença hemorrágica viral dos coelhos) foi incluída como uma das medidas que integram o seu primeiro eixo de intervenções (Programa de Investigação). O desenvolvimento da vacina oral para RHDV2 é a única medida do Plano de Ação com implementação a longo prazo (mais de 3 anos após o seu início), e que tem **financiamento pela Fundação para Ciência e Tecnologia (Fight-2: PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020),** ao contrário das outras medidas cuja implementação é integralmente suportada pelo **Fundo Florestal Permanente (FFP).**

DESENVOLVIMENTO DA VACINA EM CURSO

Interessa esclarecer que o Projeto Fight-2 permitirá o desenvolvimento de uma vacina protótipo que, no âmbito desde projeto, será testada apenas em algumas das zonas de caça aderentes ao Projeto +Coelho.

O **projeto para a construção do protótipo da vacina encontra-se em curso.**

A contribuição dos caçadores e gestores para os Projetos +Coelho, nomeadamente na recolha de amostras biológicas para a vigilância sanitária das populações de leporídeos, tem sido fundamental para o reconhecimento das características genéticas das estirpes de RHDV2 que circulam nas populações de coelhos-bravos, um dado de importância fundamental para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

A produção de uma é um processo complexo e demorado

São esperados resultados sobre a sua eficácia cerca 3 anos após o seu arranque, isto é em finais de 2021. A comercialização da vacina, se economicamente viável, demorará, contudo, mais tempo.

A demonstrar-se eficaz na proteção contra a infeção, estável do ponto de vista antigénico e financeiramente viável, a **produção para fins comerciais exigirá outras fontes de financiamento e a preparação de dossiers técnicos** muito detalhados, e a posterior **autorização pela entidade responsável pelos medicamentos veterinários em Portugal** (DGAV).

Esta fase está, contudo, para além do horizonte do Projeto Figth-2 e do Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos, operacionalizados pelos Projetos +Coelho. A produção de uma vacina desta natureza é um processo complexo e, por isso, demorado, exigindo informação, conhecimento e compreensão por parte do sector. É por isso necessário gerir as expectativas sobre o tempo necessário para que a vacina venha a estar disponível no mercado.

UTILIZAÇÃO FUTURA

Pretende-se efetivamente que no futuro esta vacina possa ser utilizada pelas zonas de caça afetadas por esta virose, por forma a ajudar a controlar os surtos de doença e assim minimizar os seus efeitos redutores nas populações de coelho-bravo. Esta proteção poderá todavia exigir a re-vacinação periódica dos animais.

A vacina contra a RHDV2 deve por isso ser percecionada pelos gestores e proprietários rurais como mais **uma ferramenta de apoio ao controlo da RHDV2,** sempre enquadrada num conjunto mais vasto de medidas de boas práticas de gestão, e não como a panaceia para a resolução fácil desta problemática.

Há um conjunto de boas práticas **que podem e devem ser cumpridas e implementadas pelos proprietários rurais, gestores e caçadores por forma a minimizar o impacto da infeção por RHDV2 nas populações de coelho-bravo.** Este esforço, deve ser continuado e perdurar mesmo depois de existir uma vacina disponível no mercado.

A adoção de boas práticas de gestão está ao alcance dos gestores, proprietários rurais e caçadores e permite reduzir efetivamente a transmissão da infeção e as fontes de contaminação para animais saudáveis. O Sector não deve por isso descurar ou desvalorizar o seu contributo diário no controlo da doença hemorrágica viral dos coelhos. O cumprimento destas recomendações é útil e ajudará a conseguir melhores resultados imediatos e a longo prazo para a recuperação das populações de coelho-bravo. ■



A adoção de boas práticas de gestão está ao alcance dos gestores, proprietários rurais e caçadores.

caçavision

O único canal TV 100% de Caça em exclusivo no MEO

PROGRAMAÇÃO

Os melhores lances estão na Cazavisión
Em abril não perca...



Sexta-feira 3 de abril às 20:00 h. "Cães Estrela: Xena, uma braco com nota 10 para o Santo Huberto"
Viveremos uma jornada de caça em Terras de Ebro, onde Noelia Cartes nos mostrará uma sessão de treino para Santo Huberto, contando-nos todos os aspetos desta competição: a indumentária, o treino, a execução, a pontuação... Com ela, estará também a sua cadela Xena, uma fêmea de braco com quem teve de trabalhar muito para conseguir o binómio perfeito cão-caçador, e que as tornou campeãs de Santo Huberto.



Quarta-feira 8 de abril às 20:00 h. "Corço de Montanha"
Aproveitamos esta oportunidade para apresentar-vos 'A tiro', uma série conduzida pelo perito caçador Ramón Fitó, que nos abrirá o mundo da caça em montanhas. O primeiro desafio deste atirador profissional, um grande amigo desta casa há muito tempo, vai levá-lo a La Vall de Boí, nos Pirenéus Catalães. Nestes terrenos de caça, guiaremos o visor atrás de um exemplar de "duende". Mas, para além de tentar abatê-lo, Fitó estabeleceu como objetivo ensinar-nos algumas noções sobre como desmanchar, arranjar e cozinhar esta carne de caça.



Quinta-feira 16 de abril às 20:00 h. "Safari de antilopes e leão na África do Sul"
Se qualquer safari, por mais modesto que seja, pode ser o sonho de qualquer caçador, imagine um em que, além de inúmeros antílopes, se caça um leão. Sugestivo, não? Pois bem, na estreia desta noite, tornaremos possível este emocionante desafio, num dos paraísos cinegéticos do Continente Negro, a África do Sul.

JÁ PODE VER O CAÇAVISION
QUANDO E ONDE QUISER
Mais informações em:
www.cacavision.pt

CANAL 173
ADIRA JÁ AO MEO
Ligue 16 200
ou vá a uma loja MEO
MEO
É OUTRA VIDA
meo.pt



Os parceiros e as competências no Projeto Fight 2

O Projeto Fight 2 é um consórcio multidisciplinar envolvendo o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P (INIAV, instituição proponente), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), a Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) e a Universidade de Évora (UÉ). Estas quatro instituições, conectadas por vínculos históricos, têm fortes interesses estratégicos para implementar o projeto e estão em posição vantajosa para contribuir com o controlo do RHDV2 na vida selvagem através do desenvolvimento de uma vacina oral.

TEXTO: **MARGARIDA DUARTE (INIAV), CARINA CARVALHO (INIAV) ANTÓNIO ROLDÃO (IBET)** FOTOS: **ISTOCK**

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
COMPETE 2020 PORTUGAL 2020

O INIAV

O INIAV é um Laboratório de Estado do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR), que desenvolve atividades de investigação nos campos agrícola e veterinário, de suporte às políticas públicas, em defesa dos interesses nacionais e do aprofundamento das políticas comuns da Europa. O INIAV tem sede no seu Polo de Oeiras, onde se localizam os Laboratórios Nacionais de Referência para a Saúde Animal e Sanidade Vegetal, dispondo ainda de outros 7 Polos de Atividade (Alcobaça, Dois Portos, Elvas, Braga, Santarém, Tapada da Ajuda) e de Serviços desconcentrados (Leiria, Alter do Chão, Salvaterra de Magos, Coruche, Évora, Santiago do Cacém, Alvalade do Sado, Odemira), distribuindo-se assim por oito distritos nacionais.

O IBET

O iBET é uma entidade privada sem fins lucrativos fundada em 1989 e especializada na investigação nas áreas da Biotecnologia e ciências da vida. No iBET, a ciência e tecnologia são exploradas de forma a acelerar a aplicação translacional de competências desde a fase inicial da descoberta até à produção e processos finais. A experiência do iBET abrange, entre outras, as áreas dos biofármacos complexos, incluindo vacinas. Fazem parte do iBET 16 laboratórios de ponta, uma Unidade Piloto, uma Unidade de Serviços Analíticos com certificação GMP e tem acesso privilegiado a uma unidade produtora de biofármacos em GMP para testes pré-clínicos e clínicos (fase I/II/III), a GeniBET Biopharmaceuticals (spin-off detida em 45% pelo iBET).

A FMV

A FMV é a mais antiga escola de medicina veterinária portuguesa que promove o ensino de Ciências Veterinárias em Portugal desde 1830. Na componente de investigação, a FMV possui o Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal (CIISA), que abrange as quatro principais áreas de pesquisa em Ciências Veterinárias: Saúde e Prevenção; Medicina e Patologia; Segurança Alimentar e Biotecnologia e Produção Animal, estimulando e financiando dezenas de linhas de pesquisa em estreita colaboração com mais de 100 instituições, nacional e internacionalmente.
A Universidade de Évora está organizada em 4 escolas: Artes, Ciências e Tecnologia, Ciências Sociais e Enfermagem e oferece 41 cursos de graduação e 120 de pós-graduação. Os vários Centros de Investigação e Desenvolvimento (I&D) abrangem diversas áreas científicas por meio de uma rede de 14 Unidades de Investigação, todas submetidas a avaliação internacional, sob a coordenação do Instituto de Pesquisa e Estudos Avançados. Além disso, a Universidade de Évora estabeleceu três disciplinas em áreas de excelência: Biodiversidade, Energias Renováveis e Património, que são patrocinadas por detentores de capital privado.



Esta parceria aposta assim no desenvolvimento de uma vacina oral baseada em VLPs, adequada às populações selvagens, e extremamente segura, por não conter material genético do vírus da Doença Hemorrágica dos Coelhos. Este facto é extremamente relevante uma vez que o RNA viral deste vírus (o seu material genético) é, por si só, infecioso, e a sua presença poderia ainda potenciar eventos de recombinação, levando ao aparecimento de novos vírus.

TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE VACINAS

A tecnologia de produção das vacinas baseadas em VLPs (partículas de tipo viral), assenta na capacidade de se alterarem vírus de insetos (baculovírus), por forma a passarem a conter informação genética de outro vírus, neste caso o gene vp60 do RHDV2 (que codica a proteína VP60 que constitui a estrutura exterior do vírus, designada capside. Este vírus recombinante é então utilizado para infetar células de inseto que se cultivam em reatores em condições absolutamente controladas. Durante o processo de infeção pelo baculovírus recombinante, ocorre produção de inúmeras moléculas de proteína VP60, que espontaneamente se ligam entre si (processo de montagem) de forma semelhante à que ocorre na infeção natural nas células de coelho. No entanto, ao contrário do vírus selvagem, as VLPs produzidas nas células de inseto não possuem qualquer material genético, sendo por isso componentes muito seguros para o desenvolvimento de vacinas. Uma vez que ocorre produção simultânea de baculovírus, são necessários processos de separação e purificação, de alguma complexidade para se obterem VLPs suficientemente puras para integrarem vacina.

A vacina oral para a doença hemorragica viral dos coelhos, não permitirá a sua erradicação

As VLPs produzidas e purificadas serão posteriormente liofilizadas (i.e. retirar todo o conteúdo de água), e assim aumentar a sua estabilidade quando exposta a condições ambientais diversificadas de temperatura, exposição solar e humidade.

OS DESAFIOS E AS DIFICULDADES NA PRODUÇÃO DE VACINAS

As vacinas constituem ferramentas muito importantes no controlo das doenças em qualquer espécie animal, tendo permitido erradicar definitivamente alguns agentes, como é o caso do vírus da varíola humana.

No entanto, muito são os desafios técnicos, operacionais e financeiros subjacentes à vacinação de populações silvestres. Em espécies de pequeno porte e de relativa elevada abundância, como é o caso do coelho-bravo, a

via de administração tem necessariamente de ser a via oral, face à impossibilidade de se capturar, marcar e vacinar periodicamente uma percentagem elevada dos animais de cada população. Com efeito, para que a vacinação de uma população seja eficaz, cerca de 80% dos animais têm de ser vacinados por forma a que ocorra interrupção da circulação do vírus nessa população. No caso específico da doença hemorrágica viral dos coelhos, a eficácia de imunização por via oral em coelhos domésticos foi demonstrada, um aspeto absolutamente crucial para o sucesso de qualquer vacina oral. Para muitos outros vírus, a sua frágil estrutura e composição impossibilita o contacto dos seus componentes ainda ▸

A UÉ

A Universidade de Évora está organizada em 4 escolas: Artes, Ciências e Tecnologia, Ciências Sociais e Enfermagem e oferece 41 cursos de graduação e 120 de pós-graduação. Os vários Centros de Investigação e Desenvolvimento (I&D) abrangem diversas áreas científicas por meio de uma rede de 14 Unidades de Investigação, todas submetidas a avaliação internacional, sob a coordenação do Instituto de Pesquisa e Estudos Avançados. Além disso, a Universidade de Évora estabeleceu três disciplinas em áreas de excelência: Biodiversidade, Energias Renováveis e Património, que são patrocinadas por detentores de capital privado.



preservados com o sistema imunitário do hospedeiro uma vez que são destruídos no ambiente ácido do estômago.

Outra dificuldade diz respeito à dose vacinal necessária por animal (dose individual) para que se consigam induzir anticorpos com títulos protetores. Se esta dose se revelar elevada, pode comprometer a viabilidade financeira da produção da vacina. O processo de purificação (separação das VLPs dos restantes componentes presentes nas células de inseto) exigirá grandes esforços. Em última instância, é necessário que todos estes processamentos biotecnológicos permitam rendimentos elevados de obtenção das VLPs, a custos compatíveis.

Também a sua formulação das VLPs (liofilização de modo a melhorar a sua estabilidade) é um aspeto particularmente critico. A preservação da capacidade imunogénica da vacina (i.e. a capacidade de induzir uma resposta imunitária adequada) depois de adicionada à ração que lhe servirá de veiculo, é determinante para o sucesso da imunização. A vacina, depois de incorporada na ração, deverá ser estável e resistente para que se mantenha ativa mesmo quando exposta a algumas condições ambientais mais desfavoráveis de temperatura e humidade.

A dificuldade de distribuição homogénea da vacina pelos animais a que se destinam, e a mitigação do consumo indesejado por outras espécies simpátricas (co-habitantes), nomeadamente por pequenos roedores e aves, é também um aspeto a ter em conta.

Tal como muitos outros agentes patogénicos causadores de patologias animais (ex. Língua Azul) e humanas (ex. Malária), a erradicação não é possível e o controlo da doença é extremamente complicado por vários fatores como a resistência ambiental dos agentes infeciosos, a inevitabilidade das ações antropogénicas e das movimentações de pessoas e animais, e particularmente, o envolvimento de vetores na transmissão/disseminação destes agentes infeciosos.

MEDIDAS MITIGADORAS DO IMPACTO DO RHDV2

1. Intensificação das medidas de vigilância, nomeadamente pelo aumento da frequência das ações de prospeção de cadáveres e de lebres doentes no campo, particularmente nos concelhos afetados;
2. Recolha dos cadáveres de lebres, utilizando Kit Envelope (disponibilizado pelas Organizações do Setor da Caça ou solicitado ao INIAV); A entrega dos cadáveres deve ser feita nos pontos de recolha que integram a rede de epidemiovigilância do projeto +Coelho, assinalados no verso desta folha. Caso não efetue a entrega de imediato, se possível, congelar o cadáver (-20ºC) até à sua entrega;
3. Eliminação dos exemplares que não possam ser enviados para o laboratório, através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhamento para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;
4. Adoção de medidas de higiene, nomeadamente desinfeção do calçado e outros equipamentos, assim como das rodas dos veículos, aquando da saída das zonas de caça;
5. Limpeza e desinfeção periódica dos bebedouros;
6. Evisceração de animais em ato venatório sobre um plástico, para evitar contaminação de solos, e subsequente eliminação dos subprodutos através de enterramento, após cobertura com cal viva, ou encaminhados para unidade de tratamento de subprodutos aprovada;
7. Controlo de vetores (através de armadilhas para insetos), quando possível;
8. Não movimentação (captura, translocação, repovoamento) de lebres e de coelhos-bravos, provenientes de áreas afetadas;
9. Não introdução no território nacional de coelhos-bravos e de lebres oriundas de outros Estados Membros sem a respetiva certificação sanitária.
10. Interrupção da caça em zonas afetadas.



A relação entre o Plano de Ação; os Projetos +Coelho e Fight 2

Embora com financiamentos distintos, o Projeto Fight 2, financiado pela FCT, articula-se estreitamente com os Projetos +Coelho, financiados pelo FFP (ICNF), que operacionalizam o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos coelhos, determinado pelo Despacho 4757 /17 de 30 de maio.

TEXTO: **CARINA CARVALHO, ANTÓNIO ROLDÃO E MARGARIDA DUARTE**
FOTO: **ARQUIVO**

O desenvolvimento do Projeto +Fight-2 depende da monitorização longitudinal das populações de coelho-bravo, o que envolve a recolha sistemática de materiais biológicos de coelho-bravo, dos resultados laboratoriais gerados no âmbito do

3º eixo de intervenção do Plano de Ação (Medidas de Controlo Sanitário). A vigilância sanitária das populações de leporídeos, permite a deteção e identificação dos isolados de RHDV2 que circulam nas populações de coelhos-bravo em Portugal.

A subsequente caracterização molecular das estirpes e o conhecimento da genética das variantes deste vírus é crucial para que se escolham os subtipos virais mais representativos e atuais a incluir na vacina, por forma a que esta seja mais eficaz. ■

O desenvolvimento de uma ração adequada a Coelho-bravo, e a adaptação progressiva dos animais a este alimento composto, permitirá no future veicular a vacina

A DOENÇA

A doença hemorrágica viral dos coelhos é causada por um pequeno vírus, pertencente à família Caliciviridae, altamente resistente no meio ambiente e por isso capaz de persistir infecioso durante longos períodos de tempo na natureza, constituindo fonte para novas infeções e perpetuando a infeção das populações silvestres. Desde 2012 que em Portugal circula um vírus distinto o que emergiu inicialmente na Europa em 1986 (RHDV), conhecido por vírus de tipo 2 ou RHDV2. Os dados obtidos pelas avaliações sanitárias efetuadas pelo Grupo de Trabalho +Coelho têm revelado que numa percentagem muito significativa de coelhos-bravos de vida livre encontrados mortos em 2017 (52,78%, 19/36), 2018 (46,90%, 53/113) e 2019 (48,05%, 37/77), se deteta o RHDV2, evidenciando que este vírus continua a ser uma causa importante de mortalidade para o coelho-bravo.

MEDIDAS PREVISTAS CONTRA A DOENÇA

1. Desenvolvimento de uma vacina edível, inócua e ajustável à evolução do vírus
Identificação de marcadores de resistência no coelho-bravo à doença hemorrágica viral.
2. Desenvolvimento e operacionalização de um sistema nacional de recolha de dados demográficos e epidemiológicos da população de coelho-bravo e integração com as condições edafoclimáticas, de habitat, densidades de predadores, disponibilidade de alimento, gestão cinegética e presença de vetores.
3. Reconstrução da história demográfica de RHDV2 e desenvolvimento de modelos preditivos de transmissão.
4. Gestão de habitat: disponibilização de água e alimento e fomento de abrigo e moroiços de reprodução.
5. Medidas de controlo de predação e adequação da atividade cinegética.
6. Ações de fiscalização de movimentações de animais.
7. Ações de esclarecimento e divulgação sobre Gestão e exploração de recursos faunísticos.
8. Certificação genética dos indivíduos introduzidos.
9. Implementação de Medidas de Vigilância da DHV.
10. Implementação de medidas que favorecem o controlo da DHV.
11. Ações de esclarecimento sobre os fatores de risco de disseminação da doença.

EIXOS DE INTERVENÇÃO

Estes são os eixos de intervenção do plano de ação para o controlo da doença hemorrágica viral dos coelhos:
a) Programa de Investigação
b) Boas Práticas de Gestão
c) Medidas de Controlo Sanitário
d) Plano de comunicação

PROJETOS +COELHO

+Coelho 1: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral
+Coelho 2: Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal

GRANDES DESAFIOS

Grandes desafios técnicos, operacionais e financeiros da vacinação de populações silvestres. Em espécies de pequeno porte e de relativa elevada abundância, como é o caso do coelho-bravo, a **via de administração** tem necessariamente de ser a oral, face à impossibilidade de se capturar, marcar e vacinar periodicamente uma percentagem elevada dos animais de cada população (cerca de 80% dos animais têm de ser vacinados para se impedir, ou interromper, a circulação do vírus na população).
No caso específico da doença hemorrágica viral dos coelhos, foi demonstrada a eficácia de imunização por via oral em coelhos domésticos o que é absolutamente crucial para o sucesso desta vacina oral. A via oral não funciona para muitos outros vírus que, pela sua estrutura e composição são mais frágeis, sendo destruídos ao contactarem com o ambiente ácido do estômago.

ASPETOS CRÍTICOS DA PRODUÇÃO DO PROTÓTIPO DA VACINA

Outra das dificuldades existentes diz respeito à **dose necessária por animal** (dose individual) para que se consigam títulos de anticorpos protetores, e que, a ser muito elevada, pode comprometer a viabilidade financeira da produção da vacina. Um outro aspeto critico é a **estabilidade do antigénio vacinal.** A preservação da capacidade imunogénica desta vacina (i.e. a capacidade de induzir uma resposta imunitária adequada) depois de adicionadas à ração é determinante para o sucesso desta imunização. A vacina presente na ração deverá ser estável e resistente para se manter ativa depois de exposta a condições ambientais diversificadas de temperatura e humidade.
O **processo de produção** da vacina, baseada em partículas de tipo viral (VLPs) produzidas em células de inseto, é também uma etapa crítica, exigindo esforços na simplificação dos processos bastante dispendiosos de produção, purificação (i.e. separação das VLPs dos restantes componentes presentes nas células de inseto) e formulação (i.e. liofilização das VLPs de modo a melhorar a sua estabilidade). Em última instância, é necessário que todos estes processamentos biotecnológicos permitam rendimentos elevados de obtenção das VLPs, a custos compatíveis.
Uma vez produzidas as VLPs, um outro fator crítico é a dificuldade de **distribuição homogénea da vacina pelos animais** a que se destinam, e a mitigação do consumo indesejado por outras espécies simpatricas, nomeadamente por pequenos roedores e aves.

IMUNIZAÇÃO ATRAVÉS DA RAÇÃO

Uma vez que a vacina será veiculada por ração, o ato de vacinação dependerá da prévia adaptação das populações à ingestão desde alimento composto, pelo que é necessário também um trabalho preparatório no campo por parte dos gestores nesse sentido, algum tempo antes de a vacina vir a estar disponível.
Para tornar a ração de coelho-bravo mais apetecível para esta espécie, o GT +Coelho efetuou, em colaboração com a IACA e os seus associados (DeHeus, Rico Gado, Zêzere, Mazel, Soja de Portugal), um ensaio com três aromatizantes por forma a identificar o mais apreciado pela maioria das populações de coelho-bravo, para vir a ser incluído na ração veículo de vacina. Esses dados foram disponibilizados num relatório no site do INIAV.

DADOS SOBRE O PROJETO FIGHT 2

Designação do Projeto: FIGHT-TWO - Edible bait vaccine for rabbit haemorrhagic disease virus 2 control in wild rabbits.
PTDC/CVT-CVT/29062/201. Início: 01.10.2018 | Fim: 30.09.2021

Translocações e repovoamentos

importância da certificação genética e sanitária

do coelho-bravo

Em Portugal, tal como no resto da Península Ibérica, as populações de coelho têm decrescido nas últimas décadas devido à emergência de duas doenças de origem viral.

TEXTO: **MARGARIDA DUARTE, CARINA CARVALHO, FÁBIO SANTOS, JÉSSICA MONTEIRO (INIAV); PAULO CÉLIO ALVES, PEDRO MONTERROSO, NUNO SANTOS, ANA SERRONHA, JOÃO QUEIRÓS, JOANA ABRANTES, ANA LOPES, PEDRO ESTEVES (CIBIO-INBIO); PATRÍCIA TAVARES SANTOS, PEDRO MELO (DGAV); GONÇALO LOPES, ANA HORA (ICNF)**
FOTOS: **ISTOCK**

Aliados aos fatores sanitários, a excessiva pressão cinegética, as mudanças no uso do solo e a consequente alteração da cobertura vegetal, bem como o abandono das práticas agrícolas tradicionais e a intensificação da agricultura, reduziram progressivamente as populações selvagens de coelho-bravo, bem como as condições favoráveis de alimentação, reprodução e de refúgio outrora existentes.

Por forma a manter os ecossistemas naturais, os proprietários rurais, os gestores de caça, os caçadores, conservacionistas e investigadores concordam que a sustentabilidade das populações cinegéticas, e da biodiversidade em geral, depende de todos. Para atingir este fim, os intervenientes do mundo rural têm investido meios, disponibilizando frequentemente territórios e proporcionando **condições de habitat mais favoráveis** ao estabelecimento e equilíbrio das espécies cinegéticas através de múltiplas ações, principalmente focando o fomento de refúgio e a disponibilização de alimento através de sementeiras ou de distribuição de alimento em comedouros artificiais.

Com o propósito de assegurar resultados de exploração mais imediatos, quer para repor rapidamente densidades de coelho-bravo consideradas insuficientes, quer para satisfazer os resultados de exploração, a par de um conjunto de medidas muito positivas para a estimulação do crescimento das populações, são frequentemente adotadas algumas **práticas de gestão não recomendáveis.** Disto é exemplo a adquisição e/ou translocação de animais de forma ilegal e sem apoio técnico especializado que são praticadas sem uma prévia avaliação genética e/ou sanitária. Estas práticas de gestão colocam em risco sanitário as populações recetoras, pois pode ocorrer a introdução inadvertida de agentes patogénicos inexistentes anteriormente, bem como comprometer seriamente a integridade genética da subespécie *O. c. algirus.* conduzindo, a longo termo, a um decréscimo ainda mais pronunciado dessas populações. ▸



A excessiva pressão cinegética, as mudanças no uso do solo e a consequente alteração da cobertura vegetal, bem como o abandono das práticas agrícolas tradicionais e a intensificação da agricultura, reduziram progressivamente as populações selvagens, bem como as condições favoráveis de alimentação, reprodução e de refúgio outrora existentes.



É fundamental garantir que os animais introduzidos provenham de regiões de ocorrência da subespécie *O. c. algirus*, respeitando assim o património genético das populações locais. Na foto, um exemplar de *Orytolagus cuniculus cuniculus*.

RISCOS ASSOCIADOS À TRANSLOCAÇÃO DOS ANIMAIS

A translocação de animais consiste no movimento artificial promovido pelo homem de animais vivos da sua área de origem para libertação numa área recetora. No entanto, o seu sucesso depende da correta avaliação dos animais a serem translocados, da demografia da população recetora, das características do local de destino, e da capacidade dos animais translocados colonizarem a área, isto é, de se instalarem e se reproduzirem. Os aspetos sanitários e genéticos são, pois, de extrema importância na avaliação destes movimentos.

Assim, a **avaliação dos riscos, envolvendo uma análise cuidada das populações fonte e recetoras,** e seus habitats, é um pré-requisito que deve ser garantido em todas as ações de gestão cinegética que envolvem movimentação de animais.

As translocações de animais efetuadas no território nacional movimentam frequentemente espécimes oriundos de Portugal, mas também, e com elevada frequência, de Espanha e mesmo de França. É importante ressalvar que **a entrada de coelhos provindos de países terceiros, diretamente para repovoamento, é uma prática proibida por Lei** (explanada nos pontos 4, 5, 6, 7 e 8 do artigo 10º da portaria nº464/2001 de 8 de maio). Uma vez que esta prática não é acompanhada das Guias de Transporte de Espécimes Cinegéticos, não está quantificada. É fundamental garantir que os animais introduzidos provenham de regiões de ocorrência da subespécie *O. c. algirus,* respeitando assim o património genético das populações locais. Deve também assegurar-se a boa condição sanitária dos animais e a inexistência de doenças contagiosas, como a mixomatose e a doença hemorrágica viral, através da realização de testes serológicos e virológicos.

AVALIAÇÃO DO ESTADO SANITÁRIO DOS ANIMAIS

A avaliação do estado sanitário das populações de leporídeos silvestres, nas suas vertentes de vigilância ativa (baseada na análise de órgãos recolhidos de animais caçados em época venatória) e passiva (baseada na análise de cadáveres recolhidos do campo), deve ser efetuada, sempre que possível, nos Laboratórios de Referência para a Saúde Animal do INIAV, em Oeiras, uma vez que tanto a doença hemorrágica viral como a mixomatose são doenças de declaração obrigatória, na Europa e na comunidade internacional (https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/).

A avaliação da condição sanitária dos leporídeos em vida, envolve o exame clínico dos animais (que compreende a avaliação do estado geral do animal, da sua condição corporal, do estado da sua pelagem e da existência de eventual parasitismo externo), e o exame laboratorial (realizado em matrizes passiveis de serem colhidas sem comprometer a integridade e bem-estar animal). Neste contexto, os testes virológicos efetuados a partir de amostras de sangue ou soro (preparado a partir de uma amostra de sangue colhido por punção venosa da veia marginal ou da artéria central da orelha, veia safena ou veia jugular externa **(Figura 1.)**), de urina (recolhida por compressão do abdómen) ou de fezes (recolhidas da ampola retal, ou alternativamente por zaragatoa fecal), permitem detetar agentes patogénicos, ou os seus constituintes, possibilitando verificar se o animal está ou não infetado com agentes patogénicos relevantes, e se ocorre eliminação de vírus pelas fezes.



Figura 1. Recolha de sangue em vida. A recolha de sangue da veia jugular externa permite obter um volume maior do que aquele recolhido da veia marginal da orelha, mas constitui um ato médico pelos riscos associados.

A eliminação de vírus pelos excrementos ou pela urina, contribui para a transmissão e disseminação da doença, com efeitos potencialmente devassadores para as populações recetoras.

Os métodos virológicos utilizados para o rastreio do vírus da mixomatose e da doença hemorrágica dos coelhos em amostras de sangue, fezes e urina, são essencialmente moleculares pela sua elevada sensibilidade e especificidade, e capacidade de automatização e rapidez de execução **(Figura 2.).**

AVALIAÇÃO SEROLÓGICA

A avaliação serológica (deteção de anticorpos específicos) dos animais a translocar, é efetuada a partir de amostras de sangue nos LNR do INIAV ou nos laboratórios do CIBIO, e permite avaliar a ocorrência de contacto prévio dos animais com agentes infeciosos. O contacto anterior com um determinado agente, pode constituir uma mais-valia quando essa imunidade natural é protetora e não coexiste com infeção e eliminação de vírus. A avaliação do estado imunitário dos coelhos-bravos a translocar, ou das populações fonte, permite assim inferir o grau de imunidade às doenças víricas, nomeadamente à doença hemorrágica viral e a mixomatose, o que potencia a sobrevivência dos animais translocados.

A utilização de ferramentas moleculares de genotipagem, disponíveis para a avaliação genética das duas subespécies de coelho-bravo (*O. c. algirus e O. c. cuniculus,*) bem como do coelho doméstico, permite certificar previamente a integridade genética dos animais, e assim prevenir a potencial hibridação entre as duas subespécies, e com o coelho doméstico, que conduzirá à destruição do património genético das populações autóctones.

TESTES GENÉTICOS

Os testes genéticos, que envolvem a caracterização de vários marcadores moleculares, podem ser efetuados em laboratórios especializados em genética animal, como por exemplo no laboratório do CIBIO-InBIO, situado no Campus de Vairão em Vila do Conde. No caso dos testes genéticos, deverá ser recolhido tecido biológico, por exemplo uma biópsia da orelha. A amostra deverá ser colocada num pequeno frasco com álcool a 96%, numa proporção com pelo menos três vezes mais de álcool do que de tecido (ver Figura 3.). Deverá ser colocado o código do animal no rótulo do frasco para posterior correspondência com o resultado da análise. A amostra em álcool deverá ser mantida à temperatura ambiente, e posteriormente enviada para o laboratório, devidamente acondicionada.

Enquanto enquadrados no Projeto +Coelho, estes testes são realizados sempre que necessário, para o cumprimento das medidas previstas.

MAIS VALIAS DA CERTIFICAÇÃO

É, pois, **importante sensibilizar os gestores de caça, caso pretendam efetuar repovoamentos,** para a necessidade de valorizarem e solicitarem aos seus fornecedores evidências documentais da qualidade dos animais que estão a adquirir. De igual forma, é fundamental que os produtores de coelho-bravo, sejam eles próprios também certificados, enquanto produtores desta espécie cinegética, e compreendam as vantagens éticas e comerciais de proporcionarem aos seus clientes, certificados genéticos e sanitários no momento da venda, como prova da qualidade na produção. Apenas o cumprimento do conjunto de boas práticas referidas anteriormente, por parte de todos os intervenientes nas ações de repovoamentos e translocações, ajudarão a preservar as populações puras de *O.c. algirus,* e a combater o hibridismo nas áreas geográficas a que esta sub-espécie está limitada. ■



Figura 2. Processamento das amostras no no laboratório de Virologia do INIAV. As metodologias moleculares permitem a testagem de um número grande de amostras e pela sua sensibilidade e especificidade, constituem a primeira linha de diagnóstico virológico das doenças dos leporídeos.

COELHO-BRAVO: DUAS SUBESPÉCIES

O coelho-bravo, *Oryctolagus cuniculus,* é um pequeno mamífero herbívoro, pertencente à ordem dos Lagomorfos. Com origem na Península Ibérica, o coelho-bravo desempenha um papel chave na preservação dos ecossistemas mediterrânicos e da biodiversidade.

Existem duas sub-espécies: *Orytolagus cuniculus algirus,* com uma distribuição geográfica limitada ao Sudoeste da Península Ibérica, à Macaronésia e ao Norte de África, e *Orytolagus cuniculus cuniculus,* que ocorre na região nordeste da Península Ibérica, além de extensas áreas geográficas onde foi introduzido, nomeadamente na Inglaterra, Europa Central, Austrália, Nova Zelândia e também na América do Sul, e da qual derivam todas as espécies domésticas.

Recolha de material biológico para análise genética

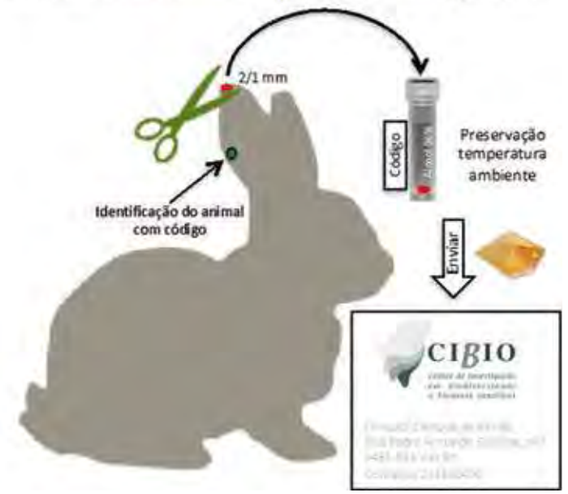


Figura 3. Procedimento para recolha de material biológico para posterior determinação da integridade genética da subespécie *Orytolagus cuniculus algirus.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matthee, C.A., van Vuuren, B.J., Bell, D., Robinson, T.J., 2004. A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. Syst. Biol. 53, 433–47.
2. Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. Conserv. Biol. 22, 1106–17.
3. Branco, M., Ferrand, N., Monnerot, M., 2000. Phylogeography of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. Heredity (Edinb). 85, 307–317.
4. Ferrand, N., Branco, M., 2007. The evolutionary history of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus): major patterns of population differentiation and geographic expansion inferred from protein polymorphism, in: Phylogeography of Southern European Refugia. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 207–235.
5. Fenner, F.; Ratcliffe, FN. 1965. Myxomatosis. Cambridge University Press
6. Ferreira, C.M.A. de C., Delibes-Mateos, M., 2010. Wild rabbit management in the iberian peninsula: state of the art and future perspectives for iberian lynx conservation. Wildl. Biol. Pract. 6.
7. Cancellotti, F.M., Renzi, M., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. Rev. Sci. Tech. 10, 409–22.
8. Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guérin, J.-L., Marchandeau, S., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. Vet. Rec. 168, 137–8. doi:10.1136/vr.d697
9. Duarte, M.D., Henriques, A.M., Barros, S., Luís, T., Fagulha, T., Ramos, F., Fevereiro, M., 2014a. New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic disease viruses in Portugal: retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008. Infect. Genet. Evol. 27, 149–55.
10. Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Melo, P., Correia, J.J., Ramada, M., Alves, P.C., Parra, F., Esteves, P.J., 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. Emerg. Infect. Dis. 19, 1900–2.
11. Moreno, S., Villafuerte, R., 1995. Traditional management of scrubland for the conservation of rabbits Oryctolagus cuniculus and their predators in Doñana National Park, Spain. Biol. Conserv. 73, 81–85.
12. Trout, R.C., Tittensor, A.M., 1989. Can predators regulate wild rabbit Oryctolagus cuniculus population density in England and Wales? Mamm. Rev. 19, 153–173.
13. Ferreira, C., Alves, P., 2009. Influence of habitat management on the abundance and diet of wild rabbit (Oryctolagus cuniculus algirus) populations in Mediterranean ecosystems. Eur. J. Wildl. Res. 55: 487.
14. Beja, P., Pais, M., Palma, L., 2007. Rabbit Oryctolagus cuniculus Habitats in Mediterranean Scrubland: The Role of Scrub Structure and Composition. Wildlife Biol. 13, 28–37. doi:10.2981/0909-6396(2007)13[28:ROCHIM]2.0.CO;2
15. Delibes-Mateos, M., Farfán, M.Á., Olivero, J., Vargas, J.M., 2010. Land-use changes as a critical factor for long-term wild rabbit conservation in the Iberian Peninsula. Environ. Conserv. 37, 169–176.
16. Monterroso, P., Queirós, J., Santos, N., Rodrigues, T.M., Rodrigues, M.M., Santos, E., Gonçalves, D. & Alves, P.C. 2016. Boas práticas na gestão cinegética. CIBIO/InBIO, ICNF & Câmara Municipal de Mértola.
17. Ferreira, C. & Alves, P.C. 2006. Gestão de populações de Coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus). Federação Alentejana de Caçadores.188pp.
18. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother. Jul;1(2):87-93.
19. Abade dos Santos FA, Carvalho CL, Peleteiro MC, Gabriel SI, Patrício R, Carvalho J, Cunha MV, Duarte MD. 2019. Blood collection from the external jugular vein of Oryctolagus cuniculus algirus sedated with midazolam: live sampling of a subspecies at risk. Wildlife Biology: wlb.00588.
20. Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. 2004. Experimental animal urine collection: a review. Lab Anim. Oct;38(4):333-61.
21. Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luís T, Duarte EL, Fevereiro M. 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). J. Virol. Methods.. 219, 90–95.
22. Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, Fagulha MT, Ramos F, Luís T, Fevereiro M. 2014b. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. J. Virol. Methods.. 196, 219–224.
23. Esteves, P., Alves, P.C. & Ferrand, N. 2006. O uso de marcadores na gestão e conservação de populações de coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus): 11-30. In: C. Ferreira & P.C. Alves (Coord.). Gestão de populações de coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus). Federação Alentejana de Caçadores.
24. Queirós, J., Carneiro, M., Lopes, S., Alves, P.C. 2019. Selvagem ou doméstico? Algirus ou cuniculus? Uma nova análise para inferir a integridade genética das subespécies de coelho-bravo em Espanha e Portugal. I Congresso Ibérico de Ciência Aplicada aos Recursos Cinegéticos (CICARC), 1-4 de julho de 2019, Ciudad Real, Espanha.

- Veterinaria Atual - https://www.veterinaria-atual.pt -

Os coronavírus dos animais e do Homem: das infeções assintomáticas às síndromes respiratórias agudas

Posted By *Ana Tavares* On 7 Abril, 2020 @ 8:00 In Destaques,Na Clínica | Comments Disabled

---

Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal, Laboratório de Virologia
Margarida D. Duarte* (Médica veterinária, investigadora)
Fábio A. Abade dos Santos* (Médico veterinário, estudante de doutoramento)
Teresa Fagulha (Médica veterinária)
Carina L. Carvalho (Médica veterinária, investigadora)
Fernanda Ramos (Médica veterinária)1

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (CIISA FMV)
Ana Isabel S. Duarte (Médica veterinária, professora associada)

Instituto de Medicina Molecular – João Lobo Antunes, Universidade de Lisboa
João Pedro Simas (Médico veterinário, professor associado)

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal e Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo
Patrícia Tavares Santos (Médica veterinária)
Pedro Canavilhas Melo** (Médico veterinário)

**membros do CIISA FMV*
*** Vetnatura-Lisboa*

Os coronavírus (CoV) são vírus de RNA não segmentado (de cadeia simples e polaridade positiva), por isso mais sujeitos a mutações dos que os vírus de DNA, e com capacidade de recombinação. Os seus grandes genomas de 27 a 32 kilobases, os maiores genomas de RNA viral conhecidos [1], propiciam a ocorrência e acumulação de erros (mutações) durante a replicação viral. Face a estes dois atributos geradores de variabilidade genética (elevada taxa de mutação e capacidade de recombinação), os coronavírus são reconhecidos entre os vírus com maior capacidade de evolução [2].

Estes vírus pertencem à família *Coronaviridae* e são caracterizados morfologicamente pela disposição das espículas proteicas que possuem na sua camada mais exterior – o invólucro, e que ao microscópio eletrónico lhes conferem a aparência de uma coroa, justificando o seu nome [3]. Dentro da subfamília *Orthocoronavirinae*, são reconhecidos quatro géneros, nomeadamente os *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma–* e *Deltacoronavirus* [4].

Estes vírus **infetam inúmeras espécies de mamíferos** (suínos, bovinos, equídeos, gatos, cães, ratos, morcegos, coelhos, furões, martas, etc.) **e aves** (galinhas, patos, perus, etc.), tanto domésticas como selvagens (Tabela 1) [5].

Doença	Vírus	Espécie suscetível	Hospedeiro reservatório	Espécies intermediárias	Género
Gastroenterite transmissível (TGE)	TGEV	suíno			*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória por coronavírus	PRCoV	suíno			*Alphacoronavírus*
Diarreia Epidémica porcina (PED)	PEDV	suíno			*Alphacoronavírus*
Síndrome da diarreia aguda dos suínos	SADS-CoV	suíno			*Alphacoronavírus*
Encefalomielite hemaglutinante porcina (PHE)	PHEV	suíno			*Betacoronavírus*
Delta coronavírus Porcino	PDCoV	suíno			*Deltacoronavírus*
Diarreia dos vitelos	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Diarreia de inverno	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Doença respiratória	BCoV	bovino			*Betacoronavírus*
Enterite por coronavírus	ECoV	equino			Betacoronavírus
Enterite por coronavírus e peritonite infeciosa (PIF)	FCoV	gato			*Alphacoronavírus*
Enterite por coronavírus	CCoV	cão			*Alphacoronavírus*
Tosse dos canis	CRCoV	cão			*Betacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV 229-E	homem	morcego	lama	*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV-NL63	homem	morcego		*Alphacoronavírus*
Doença Respiratória	HCoV-OC43	homem		ratinho	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS)	MERS-CoV	homem	morcego	dromedário/camelo	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS)	SARS-CoV	homem	morcego	civeta	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória Aguda Severa (Covid-19)	SARS-CoV-2	homem	morcego?	desconhecido	*Betacoronavírus*
Síndrome Respiratória	HCoV-HKU1	homem	ratinho		*Betacoronavírus*
Bronquite Infeciosa	IBV	galinha	aves selvagens		*Gammacoronavírus*
Coronavírus dos perus	TCoV	peru	galinha?		*Gammacoronavírus*
Coronavírus	QuaCoV, PiCoV, FalCoV	Várias espécies			*Deltacoronavírus*

[1]

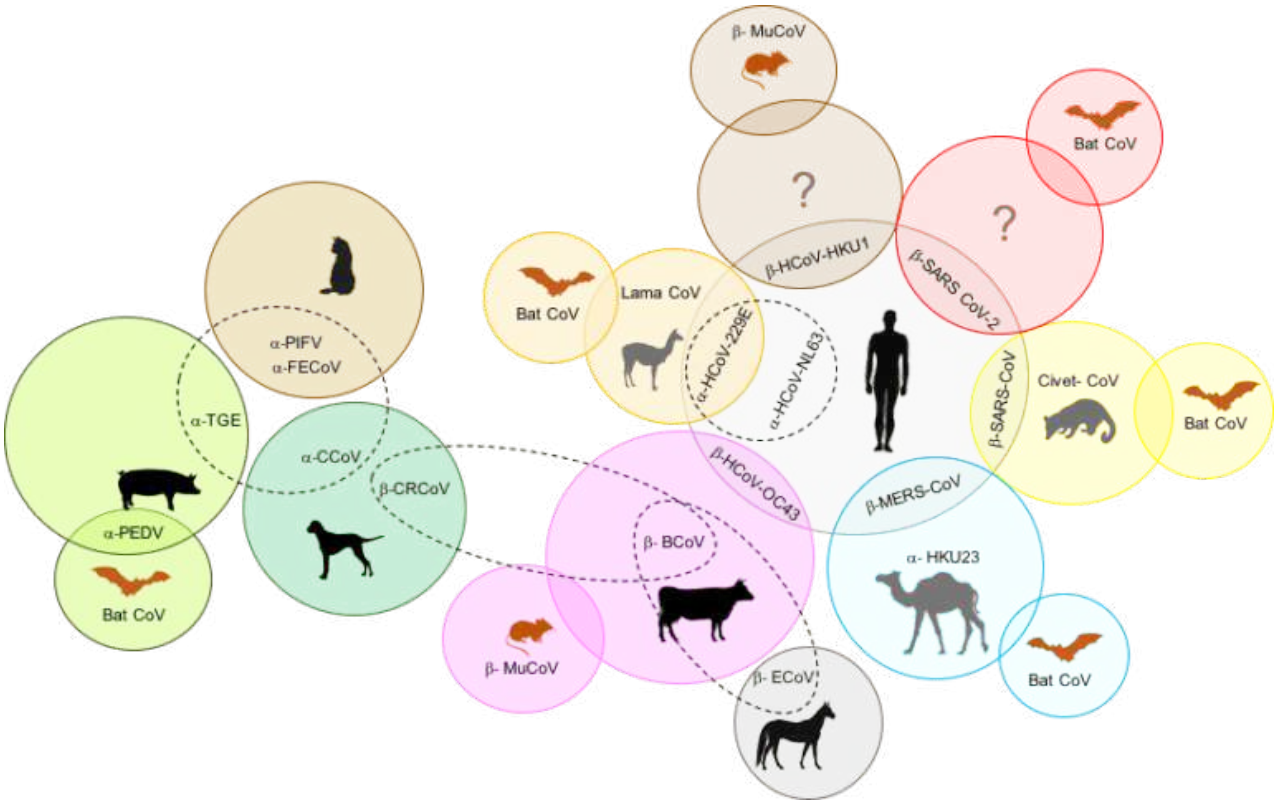
Tabela 1. Listagem dos principais coronavírus que afetam os animais de companhia, os animais de pecuária e o homem.

Os coronavírus **estão amplamente disseminados no meio ambiente** e têm distribuição mundial [6]. Por esta razão estima-se que, após o primeiro ano de vida, uma grande percentagem (cerca de 80%) das espécies domésticas, incluindo cães, gatos, ruminantes e suínos, já tenham sido infetados por algum coronavírus e desenvolvido anticorpos tornando-se seropositivos, sem terem, contudo, apresentado sinais clínicos associados à infeção [5]. De facto, muitas infeções causadas por coronavírus são subclínicas, i.e., assintomáticas, passando por isso despercebidas. No entanto, estes animais aparentemente saudáveis podem excretar coronavírus e funcionar como portadores, atuando como agentes de propagação e disseminação destes vírus [5].

Infetam vários tipos de células, preferencialmente células epiteliais como as que compõem a mucosa digestiva e a mucosa do trato respiratório. Causam doenças de gravidade muito variável, desde infeções inaparentes a síndromes respiratórias severas que podem ter desfecho fatal [6]. Devido ao tropismo celular destes vírus para os epitélios de revestimento, as doenças

resultantes manifestam-se geralmente na forma gastrointestinal (CCoV, FCoV, BCoV) ou respiratória (CRCoV, BCoV). Nesta última, podem afetar o trato respiratório superior, como é o caso das constipações comuns (HCoV 229-E), ou inferior causando broncopneumonias e pneumonias (SARS, MERS, Covid19) [9]. Alguns coronavírus causam doenças reprodutivas, polisserosites (inflamação das serosas), sialodacriloadenites (inflamação das glândulas salivares e lacrimais), hepatites, encefalomielites e nefrites [5].

Uma das consequências da grande plasticidade genómica dos coronavírus é a possibilidade de um determinado vírus **adquirir a capacidade de infetar novas espécies**. Os eventos de **salto de barreira de espécie**, que por vezes requerem uma **espécie intermediária** são, no entanto, raros. Requerem o alinhamento contemporâneo de uma série de fatores, nomeadamente de um **animal reservatório** (espécie onde o vírus replica, geralmente sem induzir patologia)**,** em fase ativa de excreção de grandes quantidades de vírus, e do contato muito próximo e repetido com a nova espécie potencialmente suscetível [7]. Os contatos frequentes, diretos ou indiretos, de humanos com animais reservatórios de coronavírus, como os morcegos [8] e os ratos, potencialmente infeciosos para o Homem, aumenta a probabilidade de transmissão viral entre espécies (Figura 1).



[2]

Figura 1. O diagrama ilustra as cadeias de transmissão para os hospedeiros suscetíveis pelas interceções dos círculos coloridos, a partir de hospedeiros reservatório (a vermelho), passando ou não, por espécies intermediárias (a cinzento). Os círculos tracejados agrupam coronavírus de diferentes espécies animais com relações genéticas próximas.

A relação entre um vírus e o seu hospedeiro é muito complexa, envolvendo uma infinidade de fatores virais e do hospedeiro, na infeção viral e consequente patogénese. Durante a infeção, o hospedeiro ativa várias linhas de mecanismos celulares de defesa. Enquanto parasitas intracelulares obrigatórios, que dependem de células ativas para se multiplicarem, os vírus

desenvolveram estratégias para sequestrar a maquinaria celular do hospedeiro, em prol da sua replicação e manutenção.

Durante anos, os HCoVs foram considerados agentes patogénicos causadores de doença respiratória leve que afetavam a população humana [2]. No entanto, o aparecimento do SARS-CoV veio mostrar que os coronavírus emergentes ou reemergentes podem constituir uma ameaça para saúde pública global.

Os extensos inquéritos epidemiológicos conduzidos na China permitiram localizar a origem do coronavírus da CoVid-19 num mercado de vida selvagem [9]. Em alguns países não-Europeus, estes mercados proporcionam efetivamente circunstâncias facilitadoras da transmissão interespecífica de agentes patogénicos. Essas condições incluem 1) a reduzida higiene, uma vez que estes espaços são frequentemente palco de abates no momento da venda dos animais, originando a contaminação de múltiplas superfícies com sangue e fezes dos animais, 2) a presença de animais altamente stressados pela captura e confinamento, o que acelera a excreção de vírus, 3) o contacto próximo e continuado entre várias espécies, extremamente improvável noutras circunstâncias pelo fato das mesmas serem originárias de locais remotos altamente inacessíveis, 4) a proximidade que estes mercados proporcionam entre o Homem e várias espécies domésticas (incluindo espécies pecuárias e animais de companhia) e 5) o facto dos animais (selvagens e pequenos animais domésticos) serem subsequentemente consumidos, por vezes crus ou mal cozinhados, promovendo o contato íntimo entre vírus e trato intestinal dos novos hospedeiros, proporcionando a infeção.

O **diagnóstico laboratorial** dos coronavírus faz-se por métodos moleculares, altamente sensíveis e específicos (ex. *real time* PCR), por isolamento de vírus em células suscetíveis ou por serologia, no caso de animais não vacinados. O diagnóstico em vida é possível a partir de fezes, sangue, excreções respiratórias, no caso da CoVid-19 e líquido ascítico no caso dos felinos com suspeita de PIF. As lesões macroscópicas *e* a histopatologia podem ser muito informativas *post-mortem*.

Reveem-se de seguida as características de alguns coronavírus dos animais domésticos, incluindo os animais companhia, e do Homem.

1. Coronavírus dos caninos

O **coronavírus entérico canino** (CCoV ou CECoV), pertence ao género Alphacoronavirus, e causa uma gastroenterite ligeira, caracterizada por diarreia, cuja transmissão se faz por via oro-fecal [5]. Esta infeção entérica é comum em cães (*Canis lupus familiaris*) em todo o mundo, tendo também sido registadas epidemias de enterite por coronavírus em cães selvagens [5]. Para além disso, foram detetados coronavírus semelhantes ou idênticos ao CCoV em raposas (*Vulpes vulpes*), cães-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) e gatos-bravos (*Felis silvestris silvestris*) [5]. A doença nos cães é semelhante à causada pelos coronavírus entéricos em outras espécies, ocorrendo destruição das células que revestem as vilosidades intestinais, causando má digestão e má absorção dos alimentos, e consequentemente diarreia [5]. A suspeita clínica de infeção por coronavírus canino deve ser sempre confirmada por testes laboratoriais, geralmente moleculares, uma vez que são muitas as causas possíveis de diarreia. A deteção de anticorpos nos cachorros não permite diagnosticar a doença, uma vez que estes podem ter tido origem no

colostro e representar imunidade passiva [5]. Existe no mercado uma vacina inativada para o controle da infeção pelo coronavírus canino, mas o seu valor protetor é controverso [5].



[3]Identificaram-se também **estirpes do coronavírus canino pantrópicas** (i.e., com tropismo para vários tecidos), atribuídas a doença sistémica grave em cães, caracterizada por febre, anorexia, depressão, vómito, diarreia, leucopenia e sinais neurológicos de ataxia e convulsões [5].

O **coronavírus respiratório canino** (CRCoV) foi identificado pela primeira vez em 2003 em amostras obtidas do trato respiratório de cães com doença respiratória infeciosa (tosse do canil) alojados em abrigos no Reino Unido [5]. Tem também sido frequentemente identificado em cães da Europa, América do Norte e Ásia.

A doença caracteriza-se por tosse seca e metálica. Embora contagiosa, a doença tem geralmente uma expressão ligeira e autolimitante, causando elevada morbilidade mas baixa mortalidade, e ocorrendo geralmente em populações de cães confinados, como por exemplo, em centros de recolha oficiais, alojamentos ou hospitais veterinários [5]. No entanto, a doença pode progredir para uma broncopneumonia potencialmente fatal.

A tosse do canil é considerada uma infeção complexa, multifatorial, na qual estão envolvidos vários agentes virais, nomeadamente o CRCoV, que participa nas fases iniciais da infeção, comprometendo as vias aéreas superiores e propiciando infeções secundárias por outros vírus (como o herpesvírus canino, o vírus da parainfluenza canina, o adenovírus canino tipo 1 e 2, o pneumovírus canino e o vírus da influenza canina), mas também bactérias como *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma spp, Streptococcus* sp, *Pasteurella* sp, *Pseudomonas* sp e vários coliformes [5].

O CRCoV está intimamente relacionado com o coronavírus bovino (BCoV) e o HCoV-OC43, com os quais apresenta identidade nucleotídica no gene que codifica as espículas do invólucro viral, de 97,3% e 96,9% respetivamente, sendo claramente distinto do Coronavírus entérico canino (CCoV ou CECoV) [5]. Tal como o BCoV e o HCoV-OC43, o CRCoV pertence ao género *Betacoronavírus*.

2. Coronavírus dos felinos

A grande maioria das infeções causadas por FCoV, pertencente ao género *Alfacoronavirus*, é benigna, não sendo detetadas ou causando diarreias leves decorrentes de enterite [5]. No entanto, os FCoVs podem ocasionalmente induzir enterites mais graves e infeções persistentes.

De acordo com as propriedades serológicas, os FCoVs são classificados em dois serótipos (I e II), ambos capazes de causar uma forma de doença progressiva, muito mais grave, designada peritonite infeciosa felina (PIF). A PIF pode apresentar-se numa forma "húmida", caracterizada por derrame abdominal característico, ou na forma "seca", sem derrame abdominal [5]. Menos de 10% dos gatos seropositivos a FCoV, desenvolvem PIF [11,12]. Assim, as [4]manifestações patológicas não são apenas uma propriedade específica de uma estirpe de vírus, pois as estirpes



de vírus individuais podem causar qualquer forma da doença em gatos. Com efeito, a patogénese da peritonite infeciosa felina é complexa e não se encontra totalmente esclarecida. A infeção intestinal por coronavírus entérico é central para o desenvolvimento da peritonite infeciosa [5]. A ocorrência esporádica de peritonite infeciosa felina é explicada pelo somatório de mutações do coronavírus entérico durante a infeção natural de gatos, resultando no aparecimento de um vírus com tropismo para as células da linhagem monócitos/macrófagos, ao invés do tropismo para as células epiteliais do intestino [5]. Contudo, em 1989, surgiram evidências de um aumento da infeção *in vitro*, dependente de anticorpos (ADE), em culturas primárias de macrófagos peritoneais de gato infetados por PIFV [13]. O exacerbamento da doença em gatos que foram infetados quando já possuíam imunidade humoral dirigida contra a proteína das espículas, e o facto de gatos imunizados com uma vacina recombinante expressando essa proteína terem morrido mais cedo do que os animais controlo, evidenciou que, também *in vivo*, se verifica um agravamento da doença decorrente da presença de anticorpos não-neutralizantes à medida que a resposta imunitária contra PIF é montada. Esta doença fatal, descrita pela primeira vez em 1963 [10], resulta assim de uma resposta imunitária exagerada à infeção viral, e não modulada, com consequente dano de vários tecidos, devido à formação e deposição de imunocomplexos nos pequenos vasos.

A grande maioria das infeções naturais que ocorrem na Europa e América é causada pelo serótipo I, enquanto que os FCoVs do serótipo II são mais frequentes nos países asiáticos, onde chegam a representar cerca de 25% das infeções naturais, sendo aparentemente mais virulentos [5].

Pensa-se que os coronavírus felinos do serótipo II tenham emergido por dupla recombinação entre o serótipo I do FCoV e o coronavírus dos cães (CCoV), em gatos simultaneamente infetados por estes dois vírus [14]. Nos vírus do serótipo II, um terço (10 kb) do genoma do FCoV serótipo I, foi substituído pelas regiões equivalentes do genoma do CCoV.

Uma vez que os locais em que ocorre a recombinação diferem nos diferentes isolados, percebe-se que os FCoV de ambos os serótipos surjam continuamente devido a episódios de recombinação independentes [5].

Nos FCoVs do serótipo II, a região do genoma que codifica a proteína de ligação ao recetor celular (a chave) tem origem no genoma do CCoV, justificando a utilização de diferentes recetores pelos dois serótipos (FCoV I e II).

Os animais persistentemente infetados eliminam o vírus por períodos prolongados, desempenhando um papel central na disseminação e manutenção de FCoVs nas diferentes populações de gatos. A transmissão ocorre por via fecal-oral [5].

3. Coronavírus dos suínos

A **gastroenterite transmissível dos suínos (TGE)** é uma doença altamente contagiosa dos suínos (*Sus scrofa domesticus*) com distribuição mundial [5], causada por um coronavírus que pertence ao gênero *Alphacoronavirus* [15]. O TGEV replica nos enterócitos intestinais afetando maioritariamente porcos jovens. É caracterizada por diarreia aquosa, vómitos e desidratação. A taxa de mortalidade em leitões recém-nascidos pode atingir os 100% [5], resultando em perdas económicas significativas para as explorações de porcos.

A imunização passiva via colostro, protege eficazmente os leitões recém-nascidos contra a infeção por TGEV, que pode ser alcançada através da imunização de porcas gestantes com vacinas inativadas ou atenuadas [5].

O coronavírus respiratório porcino (PRCoV) surgiu posteriormente, através de deleções genéticas do vírus entérico (TGEV) que resultaram na perda do seu tropismo entérico, adquirindo um padrão de tropismo e transmissão respiratória. Este novo vírus substituiu o seu ancestral entérico em muitas regiões do mundo [5]. Foi identificado pela primeira vez na Bélgica em 1984 e reportado em 1986 na Dinamarca, com base na seroconversão de suínos que se sabiam livres de gastroenterite transmissível. O TGEV está intimamente relacionado com o coronavírus entérico felino e o coronavírus canino. A doença respiratória causada por este coronavírus é geralmente leve ou mesmo subclínica.



[5]A **diarreia epidémica porcina (PED)** é uma doença diarreica de leitões descrita pela primeira vez em porcos na Inglaterra em 1971 [16], tendo-se posteriormente alastrado a outros países europeus e asiáticos [17] e da América do Norte [18]. A doença é causada por um Alphacoronavírus diferente (CV777). O PEDV pode infetar porcos de qualquer idade, de neonatos a porcos adultos, e também javalis. No entanto, a gravidade da doença difere de acordo com a idade, sendo muito mais severa em neonatos e em leitões pré-desmame, onde geralmente induz a morte por diarreia aquosa, às vezes precedida por vómitos. Nesta faixa etária, a mortalidade pode ser muito alta (até 80%) devido a desidratação. Em muitos surtos, os leitões mais velhos não são afetados. A infeção de suínos adultos é frequentemente assintomática, embora possa ocorrer diarreia esporádica [5]. O diagnóstico deve ser confirmado laboratorialmente. Algumas vacinas atenuadas estão disponíveis em alguns países.

A **síndrome da diarreia aguda dos suínos** (SADS), foi identificada pela primeira vez no sul da China, em janeiro de 2017, na sequência de um episódio de mortalidade de cerca de 24,000 leitões. É causada por um coronavírus, **SADS-CoV**, [19], também conhecido por **SeACoV** [20]. A doença caracteriza-se por diarreia aguda e vómito, causando uma mortalidade superior a 90% em leitões com menos de 5 dias de idade [5]. O genoma do SADS-CoV partilha uma identidade genética muito elevada (98,5%) com um coronavírus de morcegos pertencente do género *Rhinolophus*, que são também considerados os reservatórios do SARS-CoV. A identificação do

SADS-CoV poderá constituir a primeira evidencia de um "salto" viral (*spillover*) de uma espécie animal selvagem para uma espécie doméstica, sem requisito de espécie intermediária.

O **deltacoronavírus porcino** (PDCoV), é um vírus entérico dos suínos, com tropismo para o trato gastrointestinal, semelhante ao TGEV e PEDV, foi descoberto em animais saudáveis na China em 2012, no decurso de investigações epidemiológicas [21]. Dois anos depois, este vírus foi identificado em suínos com diarreia grave, vómitos e enterite atrófica nos Estados Unidos e na China [22]. As manifestações clínicas são semelhantes ao TGEV ou PEDV. Foram relatadas infeções graves em leitões nos Estados Unidos, em 2014, com alta mortalidade sem o envolvimento de outros agentes patogénicos [23]. No entanto, registam-se coinfecções com PEDV, rotavírus e PDCoV [24].

O vírus da **encefalomielite hemaglutinante porcina (PHEV)** é o único coronavírus porcino neurotrópico produzindo sintomas neurológicos em porcos suscetíveis, e alta mortalidade em leitões nas primeiras semanas de vida. A infeção ocorre por via oral-nasal, atingindo os plexos do nervo gástrico e entérico e causando glanglioneurite com comprometimento do sistema nervoso central (SNC) por encefalomielite. As manifestações clínicas incluem anorexia, tremor e paraparesia [5].

Devido às suas características, este vírus induz aglutinação de eritrócitos de várias espécies, como murganhos, ratos e galinhas.

4. Coronavírus dos bovinos

Os coronavírus dos bovinos (*Bos taurus*) foram identificados pela primeira vez como os agentes causais de diarreia dos vitelos nos Estados Unidos em 1973 [25] e, desde então, são reconhecidos mundialmente pela sua associação a três síndromes clínicas, com um impacto económico considerável, nomeadamente a diarreia dos vitelos, a disenteria de inverno com diarreia hemorrágica em adultos [26,27] e infeções respiratórias em bovinos de várias idades. Estas infeções pertencem ao complexo das doenças respiratórias dos bovinos ou febre de remessa de bovinos confinados. O BCoV é geneticamente muito próximo do HCoV-OC43, tendo sido sugerido que o vírus humano resultou de uma transmissão zoonótica do BCoV, a partir de bovinos infetados [28].



[6]

A **diarreia dos vitelos** que ocorre maioritariamente em bezerros com menos de 3 semanas de idade, após o declínio de anticorpos maternos, é causada pela coinfeção do BCoV em conjunto com outros agentes patogénicos entéricos, nomeadamente rotavírus, torovírus, criptosporídeos e estirpes *Escherichia coli* enterotoxigénicas, sendo a gravidade da diarreia resultante dos efeitos cumulativos dos vários agentes envolvidos [28]. A diarreia dos vitelos é geralmente sazonal, sendo mais comum no inverno, em parte devido à maior estabilidade do vírus a baixas temperaturas.

A **disenteria de inverno** (diarreia hemorrágica) é uma doença aguda e esporádica do gado adulto, que ocorre em todo o mundo, sendo causada pelo BCoV [5].

A doença é caracterizada por diarreia explosiva, geralmente com sangue, acompanhada de diminuição da produção de leite, depressão, anorexia e alterações respiratórias frequentes. As taxas de morbilidade variam de 20 a 100% nos núcleos afetados, mas as taxas de mortalidade são geralmente baixas (1–2%) [5]. Em outros ungulados em cativeiro e em estado livre, ocorre uma síndrome semelhante à disenteria de inverno associada a variantes de coronavírus bovino, o que sugere que certos ungulados selvagens (os) que partilham áreas de pastagem comuns com o gado, podem ser um reservatório para estirpes de coronavírus transmissíveis ao gado, ou vice-versa [29].

O coronavírus bovino causa também **infeções respiratórias em bovinos** de várias idades [5], sendo responsável por doença respiratória leve (tosse, rinite) ou pneumonia em bezerros com 2 a 6 meses de idade. Um estudo epidemiológico em bezerros desde o nascimento até às 20 semanas de idade confirmou a excreção fecal e nasal do coronavírus, com destaque para a diarreia na infeção inicial. Posteriormente, ocorreu eliminação intermitente pela via respiratória, com ou sem sinais de doença, o que sugere que a imunidade local a longo prazo no trato respiratório superior seja ineficaz na mediação da eliminação do vírus. Embora muitos coronavírus possuam uma gama de hospedeiro restrita, os *Betacoronavírus*, como é o caso dos coronavírus dos bovinos, e também do coronavírus do SARS, podem infetar outras espécies de

animais, incluindo a fauna selvagem. Com efeito, o BCoV pode também estar associado a doença respiratória nos cães e a episódios de doença intestinal ligeira nos humanos [5].

5. Coronavírus dos equinos

O **coronavírus equino** (ECoV) é um *Betacoronavírus* [5] com associação clínica e epidemiológica a febre, depressão, anorexia e menos frequentemente, cólica e diarreia em cavalos adultos. A via de transmissão é [7]provavelmente fecal-oral, ocorrendo eliminação de vírus pelas fezes dos cavalos infetados, quer estes exibam sinais de doença, quer sejam assintomáticos. As complicações mais graves são raras e incluem septicemia e endotoxémia por rotura da barreira gastrointestinal, e encefalopatia associada à hiperamonémia, O vírus infecta principalmente a mucosa do intestino delgado, causando enterite. A doença é geralmente autolimitada, ocorrendo habitualmente recuperação facilitada pela aplicação de suporte clínico. O ECoV é um vírus próximo do coronavírus bovino (BCoV) [30,31].



6. Coronavírus das aves

O **vírus da Bronquite Infeciosa** (IBV), pertence ao género Gamacoronavírus e é o agente etiológico de uma doença aguda das galinhas (*Gallus gallus*) [32]. Como outros coronavírus, caracteriza-se pela sua rápida disseminação e notável capacidade de alteração do seu genoma, quer por mutação quer por recombinação genética [33]. Outras aves, selvagens e domésticas, como perus, faisões e pintadas, são suscetíveis à infeção pelo IBV [33]. A taxa de morbilidade em galinhas atinge os 100% e a mortalidade pode ser superior a 50%, se ocorrerem infeções bacterianas secundárias [34]. Para além de causar doença respiratória e renal, este coronavírus aviário pode também afetar o aparelho reprodutor, levando a quebras acentuadas da produção e diminuição da qualidade dos ovos cujas cascas ficam quebradiças e rugosas. O IBV pode também originar proventriculites [35].

[8]O coronavírus aviário foi detetado pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em Massachusetts no ano de 1937, e durante muito tempo o serótipo "Mass" foi o único conhecido. Atualmente, o IBV tem distribuição mundial e conhecem-se vários serótipos e genótipos [36].



A bronquite infeciosa representa uma ameaça para a avicultura, a nível mundial [36]. As regras de biossegurança e a vacinação são as medidas utilizadas para o controlo desta doença. No entanto a variação antigénica do IBV contorna frequentemente a vacinação, porque os vários serótipos e genótipos não produzem, na maior parte das vezes, proteção cruzada [36].

A deteção de vírus IBV em aves selvagens saudáveis, tem reforçado a hipótese destas aves atuarem como reservatórios naturais destes vírus para as aves domésticas [37]. O aparecimento

na Europa da variante QX, originária da China, deve-se, muito possivelmente, à disseminação por aves selvagens migratórias [38]. A vigilância e a identificação das variantes virais em circulação, são essenciais para controlar a transmissão de variantes de IBV emergentes. Não há nenhuma descrição de infeção pelo IBV em humanos [39].

O **coronavírus dos perus** (TCoV) é o agente etiológico de uma doença entérica e aguda dos perus, denominada enterite dos perus ou enterite transmissível dos perus (*bluecomb disease* em Inglês) [40]. Esta doença afeta perus [9](*Meleagrisis gallopavo*) de todas as idades, mas a sua gravidade é maior nas aves mais jovens, provocando elevados danos económicos, decorrentes do aumento da taxa de mortalidade e do fraco índice de conversão alimentar [40]. O TCoV está presente no intestino e nas fezes, sendo a transmissão efetuada pela via fecal-oral. As aves que recuperam da doença, excretam o vírus nas fezes durante várias semanas, possibilitando a disseminação entre bandos e explorações avícolas [41]. Apesar de não haver registo de casos de doença entérica por TCoV em galinhas, alguns estudos experimentais comprovaram que o vírus tem capacidade para replicar no intestino desta espécie, levantando a hipótese de as galinhas poderem ser vetores da infeção para os perus [42].



O TCoV é também um dos agentes causais da síndrome da enterite e da mortalidade dos perus jovens, PEMS (*poult enteritis- mortality syndrome*), síndrome de etiologia multifatorial, onde estão implicados outros agentes virais [43]. Os perus com idade inferior a quatro semanas são os mais atingidos, apresentando atraso de crescimento, diarreia e disfunção imunitária. A taxa de morbilidade é elevada [44].

7. Coronavírus dos humanos

Foram identificados vários coronavírus capazes de infetar humanos (HCoV), causando geralmente infeções ligeiras. São eles, **o HCoV-229E, o HCoV-NL63, o HCoV-OC43 e o HCoV-HKU1**, que circulam globalmente na população humana, e são responsáveis por cerca de um terço das constipações que ocorrem em humanos [45]. Contudo, em casos graves, os quatro HCoVs acima referidos podem também causar pneumonias e bronquiolites graves, especialmente em idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas [46,47]. Para além dos sintomas respiratórios, estes coronavírus humanos podem causar doenças entéricas e neurológicas [48].

O coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (**MERS-CoV**) emergiu na Arábia Saudita em 2012, causando uma epidemia em humanos [51]. Os sintomas clínicos são semelhantes aos da SARS mas a taxa de mortalidade é bastante maior, de cerca de 35% [52]. A transmissão do MERS-CoV revelou-se, contudo, mais limitada. Os dromedários (*Camelus dromedarius*) foram identificados como a espécie intermediária destes vírus [51].

O **SARS-CoV-2**, cuja espécie reservatório é ainda desconhecida, emergiu em dezembro de 2019 na província de Wuhan, na China [53]. A doença é altamente contagiosa resultando numa pandemia que afeta atualmente 205 países, tendo, desde a sua descoberta, causado a morte a mais de 61 000 pessoas (5 abril 2020). A origem do SARS-CoV2 não está ainda esclarecida [53]. Embora o vírus tenha revelado uma elevada similaridade genética (96,3%) com um coronavírus previamente identificado numa espécie de morcegos-de-ferradura- (*Rhinolophus affinis*) no

sudoeste da China; este vírus (Bat-CoV-RaTG13) não possui o mesmo ligando (chave) que o vírus SARS-CoV-2 possui, não podendo por isso utilizar o recetor celular humano (designado ACE2) para a entrada nas células alvo. Por esta razão o Bat-CoV-RaTG13 não tem capacidade de infetar células humanas [54].



[10]

No decurso das investigações realizadas desde a emergência desta pandemia, verificou-se que a região do ligando ("chave" para entrada na célula) de um coronavírus de pangolim-malaio (*Manis javanica*), descoberto em 2019, apresentava elevada identidade com a "chave" do SARS-CoV-2, apoiando a hipótese de que o SARS-CoV-2 pudesse ter resultado de uma recombinação genética natural entre coronavírus com dois hospedeiros animais diferentes [55]. O genoma do Pangolim-CoV possui 91,02% de similaridade nucleotídica com o genoma SARS-CoV-2, tendo sido sugerido que os pangolins possam ser uma espécie candidata à origem da SARS-CoV-2 [56]. No entanto, é importante sublinhar que, nesta fase, quer o pangolim, quer outra espécie, não foram ainda consideradas espécies intermediárias ou de amplificação no surto de SARS-CoV-2.

Foi também levantada a hipótese de que este **vírus pudesse ser uma construção humana**, libertada no ambiente de forma deliberada ou acidental. Esta possibilidade foi rejeitada pela análise genómica do SARS-CoV2, que revelou claramente a origem natural deste vírus. Assim, constata-se que a evolução genética do SARS-CoV-2 lhe conferiu a capacidade de se ligar com elevada eficiência ao recetor ACE2 que está presente na superfície de vários tipos de células humanas. A eficiência e estabilidade desta ligação parece facilitar a dispersão viral de pessoa-para-pessoa e justificar a facilidade com que se transmite [54].

Estão a ser feitos esforços no sentido de se perceber qual o espetro de hospedeiros do SARS-CoV2. A capacidade do SARS-CoV-2 se transmitir e infetar outras espécies de mamíferos além do Homem foi avaliada por inoculação de várias linhas de células de mamíferos e simulada em computador, de acordo com a potencial capacidade do ligando viral se poder ligar ao recetor ACE2, que o SARS-CoV2 utiliza [57]. Entretanto também foram reportadas à OIE deteções de RNA viral em dois cães e em um gato, pertencentes a doentes Covid-19. Não havendo informação sobre cargas virais, a deteção de ácidos nucleicos em zaragatoas orais, nasais e fecais destes animais de companhia, não permite, contudo, excluir que possa ter ocorrido apenas transmissão passiva do Homem para estes animais, sem replicação viral. Nenhum destes animais desenvolveu sintomatologia respiratória durante o contacto com humanos infetados, e a tentativa de isolamento de vírus não foi bem-sucedida, pelo que não pode demonstrar a presença de vírus infecioso. Recentemente foi também divulgado um estudo, antes de sua avaliação e validação por especialistas, com dados de infeções experimentais de algumas

espécies animais com SARS-CoV-2. Com base neste ensaio, o SARS-CoV-2 infeta ineficientemente cães, porcos, galinhas e patos, mas eficientemente furões e gatos, podendo ocorrer nesta última espécie transmissão gato-a-gato por gotículas respiratórias [58].

Também o Laboratório Nacional Veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) reportou a noticia da infeção de um tigre do Parque Zoológico Bronx de Nova York, não disponibilizando, conquanto, a técnica [11]de diagnóstico utilizada. Embora apenas um tigre tenha sido testado, tanto este animal como outros tigres e leões do mesmo Zoo apresentaram sinais respiratórios de tosse seca. [12] Supõe-se que estes felídeos tenham sido infetados a partir de um tratador SARS-CoV-2-positivo, assintomático.



Decorrem na China ensaios de infeção de macacos-*rhesus* e ratinhos transgénicos que possuem o gene ACE2 humano e de furões na Austrália [59].

A elevada taxa de transmissão da doença entre humanos e o potencial patogénico não são as únicas preocupações relativamente ao SARS-CoV2. Os coronavírus são mais frágeis do que os vírus nus (vírus sem invólucro, como por exemplo os parvovírus e os calicivírus), mas bastante mais **resistentes no ambiente** [60] do que a maioria dos outros vírus com invólucro (como por exemplo, o vírus da gripe), o que dificulta o seu controlo. Alguns estudos permitiram esclarecer que o SARS-CoV2 é estável em plástico e aço inoxidável e pode persistir infecioso até 72 horas após a sua aplicação nestas superfícies, embora o título do vírus decaía no plástico de $10^{3,7}$ para $10^{0,6}$ TCID50/mL após 72 horas, e no aço inoxidável de $10^{3,7}$ a $10^{0,6}$ TCID50/mL em 48 horas [69]. Em superfícies de cobre, o vírus não se mantém infecioso ao fim de quatro horas, embora em papelão o vírus se mantenha infecioso por 24 horas [61].

A informação cientifica disponibilizada sobre os melhores **desinfetantes capazes de promover a inativação do SARS-CoV2** está já disponível [62].

As recomendações da OMS incluem a higienização frequente das instalações, através da utilização de água e detergente e a aplicação de hipoclorito de sódio (lixivia) a 0,1%. Para a desinfeção de superfícies menores (bancadas de trabalho, por exemplo) é recomendada a utilização de etanol a 70%. Para a descontaminação das mãos é recomendada a lavagem com água e sabão e a aplicação de etanol a 75% ou 80% ou 2-Propanol a 75%. Todas as medidas de controle devem ser realizadas frequente e consistentemente.

Considerações Finais

A globalização proporciona o continuado movimento de massa de pessoas por todo o mundo, cria novas oportunidades para a disseminação e estabelecimento de doenças infeciosas comuns na população a nível mundial. Determinadas práticas, de que são exemplo a proximidade ou o consumo de espécies animais selvagens de localização remota, algumas em perigo de extinção, e cujo estatuto sanitário é totalmente desconhecido, desempenham um papel importante na emergência de novas epidemias. A movimentação de animais dentro da União Europeia (UE)

obedece a legislação muito específica, exigindo a rastreabilidade e comprovativos sanitários para algumas doenças e quarentenas obrigatórias. Relativamente à entrada de espécies animais (e seus produtos) provenientes de países terceiros o seu controlo realiza-se ao nível dos Postos de Inspeção Fronteiriços, aplicando-se a legislação da UE harmonizada, a que os países terceiros se obrigam a cumprir, com base em informação recolhida por um sistema de vigilância epidemiológica que assegura a monitorização das doenças de animais domésticos e selvagens, tendo como base testes laboratoriais validados, bem como a implementação de medidas de controlo, como o isolamento pré-expedição ou imunização ativa. Para as espécies animais para as quais não há legislação harmonizada, aplica-se a legislação nacional, com base na análise de risco efetuada pela autoridade competente nacional.

No domínio de "Uma Só Saúde" (*One Health*), as infeções por coronavírus são alvos prioritários de abordagem sistemática no âmbito da medicina da conservação, uma ciência multidisciplinar com enfoque nas relações patogénicas entre o ser humano, a fauna e os ecossistemas. Apenas através do desenvolvimento e aplicação de práticas de gestão de saúde, de políticas públicas e programas científicos concertados, se poderá alcançar o equilíbrio ambiental essencial à saúde animal e humana. A identificação das variáveis de risco associadas à interconexão entre pessoas, animais, plantas e seu ambiente compartilhado, são fundamentais para se prever e prevenir a emergência e reemergência de epidemias por coronavírus ou por outros agentes patogénicos.

Referências Bibliográficas

Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Van Reeth K, Nauwynck H, et al. Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. J Virol. 2006;80: 7270–7274. doi:10.1128/jvi.02675-05

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses. An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. RNA Biol. 2011;8: 270–279. doi:10.4161/rna.8.2.15013

Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. Methods Mol Biol. 2015;1282: 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7

Wertheim JO, Chu DKW, Peiris JSM, Kosakovsky Pond SL, Poon LLM. A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses. J Virol. 2013;87: 7039–7045. doi:10.1128/jvi.03273-12

MacLachlan N., Dubovi EJ, editors. Fenner's Veterinary Virology. 5th ed. Elsevier; 2016.

de Groot R, Baker S, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya A, Holmes K, et al. Part II – The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses Family Coronaviridae. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. pp. 806–828. doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9

Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. Coronavirus humains (HCoV). Pathol Biol. 2009;57: 149–160. doi:10.1016/j.patbio.2008.02.018

Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses Coronaviruses: Emerging and re-emerging pathogens in humans and animals Susanna Lau Positive-strand RNA viruses. Virol J. 2015;12: 1–10. doi:10.1186/s12985-015-0422-1
Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. J Autoimmun. 2020; 102433. doi:10.1016/j.jaut.2020.102433
Holzworth J. Some important disorders of cats. Cornell Vet. 1963;53: 157–160.
ADDIE DD, JARRETT O. A study of naturally occuring feline coronavirus infections in kittens. Vet Rec. 1992;130: 133–137.
Kennedy M, Citino S, Hillis McNabb A, Serino Moffatt A, Gertz K, Kania S. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. J Vet Diagnostic Investig. 2002;14: 520–522. doi:10.1177/104063870201400615
Stoddart, C. A., and F. W. Scott. 1988. Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions. J. Leukocyte Biol. 44: 319-328.
Hohdatsu T, Okada S, Koyama H. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. Arch Virol. 1991;117: 85–95.
Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. Adv Virus Res. 2006;65: 193–292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol. 1978;58: 243–247. doi:10.1007/BF01317606
Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes. 2012;44: 167–175. doi:10.1007/s11262-012-0713-1
Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the united states. MBio. 2013;4: 1–8. doi:10.1128/mBio.00737-13
Zhou P, Fan H, Lan T, Yang X Lou, Shi WF, Zhang W, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. Nature. 2018;556: 255–259. doi:10.1038/s41586-018-0010-9
Pan Y, Tian X, Qin P, Wang B, Zhao P, Yang Y Le, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. Vet Microbiol. 2017;211: 15–21. doi:10.1016/j.vetmic.2017.09.020
Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. J Virol. 2012;86: 3995–4008. doi:10.1128/jvi.06540-11
Song C, Zhang S, Huang H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. Front Microbiol. 2015;6: 1–18.

doi:10.3389/fmicb.2015.01049
Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. Emerg Infect Dis. 2014;20: 917–919. doi:10.3201/eid2005.140195
Marthaler D, Jiang Y, Collins J, Rossow K. Porcine Deltacoronavirus from the United States. Genome Announc. 2014;2: 2–3. doi:10.1128/genomeA.00218-14.Copyright
Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus M. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. Amer J Vet Res. 1973;34: 145–150.
Saif LJ. Bovine Respiratory Coronavirus. Vet Clin North Am Food Anim Pr 2010. 2010;26: 349–365. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.005
Saif LJ. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? Cornell Vet. 1990;80: 303–311.
Kin N, Miszczak F, Diancourt L, Caro V, Moutou F. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. Infect Genet Evol J. 2015;40: 186–191. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.006
Amer HM. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. Anim Heal Res Rev. 2019. doi:10.1017/S1466252318000117
Miszczak F, Tesson V, Kin N, Dina J, Balasuriya UBR, Pronost S, et al. First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe. Vet Microbiol. 2014;171: 206–209. doi:10.1016/j.vetmic.2014.03.031
Pusterla N, Vin R, Leutenegger CM, Mittel LD, Divers TJ. Enteric coronavirus infection in adult horses. Vet J. 2018;231: 13–18. doi:10.1016/j.tvjl.2017.11.004
González JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. Arch Virol. 2003;148: 2207–2235. doi:10.1007/s00705-003-0162-1
Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res. 2007;38: 281–297. doi:10.1051/vetres:2006055
Jackwood A, Mark W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World Published By : American Association of Avian Pathologists Invited Review — Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. Avian Dis. 2012;56: 634–641.
Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, et al. Characterization of Three Infectious Bronchitis Virus Isolates from China Associated with Proventriculus in Vaccinated Chickens. Avian Dis. 2001;45: 416. doi:10.2307/1592981
Cook JKA, Jackwood M, Jones RC. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathol. 2012;41: 239–250. doi:10.1080/03079457.2012.680432

Miłek J, Blicharz-Domańska K. Coronaviruses in avian species-review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. J Vet Res. 2018;62: 249–255. doi:10.2478/jvetres-2018-0035
Franzo G, Massi P, Tucciarone CM, Barbieri I, Tosi G, Fiorentini L, et al. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. PLoS One. 2017;12: 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0184401
OIE. OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.3.2.-Avian Infectious Bronchitis. 2018.
Guy JS. Turkey Coronavirus Enteritis. 12th ed. In: Saif, Y.M., Fadly A.M., Glissen J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. SDE, editor. In: Diseases of Poultry. 12th ed. Wiley-Blackwell; 2008. pp. 330–338.
Jindal N, Mor SK, Goyal SM. Enteric viruses in turkey enteritis. VirusDisease. 2014;25: 173–185. doi:10.1007/s13337-014-0198-8
Ismail MM, Tang Y, Saif YM. Pathogenicity of Turkey Coronavirus in Turkeys and Chickens. Avian Dis. 2003;47: 515–522. doi:10.1637/5917
Ismail MM, Cho KO, Hasoksuz M, Saif LJ, Saif YM. Antigenic and Genomic Relatedness of Turkey-Origin Coronaviruses, Bovine Coronaviruses, and Infectious Bronchitis Virus of Chickens. Avian Dis. 2001;45: 978. doi:10.2307/1592877
Awe OO, Kang K, Ibrahim M, Ali A, Elaish M, Saif YM, et al. Age-Related Susceptibility of Turkeys to Enteric Viruses. Avian Dis. 2015;59: 207–212. doi:10.1637/10907-071514-reg
Groth L. Coronavirus Symptoms vs Cold: How Do They Compare? In: Coronavirus [Internet]. 2020 [cited 27 Mar 2020]. Available: https://www.health.com/condition/infectious-diseases/coronavirus/coronavirus-symptoms-vs-cold
Gerna G, Campanini G, Rovida F, Percivalle E, Sarasini A, Marchi A, et al. Genetic Variability of Human Coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-Like Strains and Their Association With Lower Respiratory Tract Infections of Hospitalized Infants and Immunocompromised Patients. J Med Virol. 2006;78: 938–949. doi:10.1002/jmv
Zhang S fen, Tuo J ling, Huang X bin, Zhu X, Zhang D mei, Zhou K, et al. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. PLoS One. 2018;13: 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0191789
Xu J, Zhong S, Liu J, Li L, Li Y, Wu X, et al. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in the Brain: Potential Role of the Chemokine Mig in Pathogenesis. Clin Infect Dis. 2005;41: 1089–1096. doi:10.1086/444461
Schneider E. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Netter’s Infect Dis. 2012; 537–543. doi:10.1016/B978-1-4377-0126-5.00089-6

Lam WK, Zhong NS, Tan WC. Overview on SARS in Asia and the World. Respirology. 2003;8: 29–32. doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00516.x
Sharif-Yakan A, Kanj SS. Emergence of MERS-CoV in the Middle East: Origins, Transmission, Treatment, and Perspectives. PLoS Pathog. 2014;10. doi:10.1371/journal.ppat.1004457
Alsolamy S, Arabi YM. Letter To the Editor. Can J Respir Ther. 2015;51: 102–103.
Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med. 2020;89: 44–48. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. CelPress. 2020; 1–6. doi:10.1016/j.cub.2020.03.022
Ping Liu, Wu Chen and Jin-Ping Chen,Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (Manis javanica) viruses
Tao Zhang, Qunfu Wu, and Zhigang Zhang, 2020, Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. Current Biology 30, 1346–1351 April 6, 2020 a 2020 Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022
Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. 2020; 1–10. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
Hualan C. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. 2020; 1–23.
Callaway E. Labs rush to study coronavirus in transgenic animals — some are in short supply. 2020. Available: https://www.nature.com/articles/d41586-020-00698-x
Rabenau HF, Kampf G, Cinatl J, Doerr HW. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. J Hosp Infect. 2005;61: 107–111. doi:10.1016/j.jhin.2004.12.023
Doremalen NV, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1. Medxriv. 2020. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020;104: 246–251. doi:10.1016/j.jhin.2020.01.022

Article printed from Veterinaria Atual: **https://www.veterinaria-atual.pt**

URL to article: **https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/os-coronavirus-dos-animais-e-do-homem-das-infecoes-assintomaticas-as-sindromes-respiratorias-agudas/**

URLs in this post:

[1] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Tabela-final-artigo-coronavirus.png**
[2] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Imagem-artigo-coronavírus.png**
[3] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2018/07/cão-Veterinária-Atual-1.jpg**
[4] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2019/09/gato-veterinária-atual.jpg**
[5] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2016/04/suínos-Veterinária-Atual.jpg**
[6] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2017/09/bovinos-Veterinária-Atual-.jpg**
[7] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2015/07/equino3.jpg**
[8] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2016/03/galinhas-Vida-Rural.jpg**
[9] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2015/07/perus.jpg**
[10] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/02/little-ant-eater-grazing-for-food-picture-id155261042-1.jpg**
[11] Image: **https://www.veterinaria-atual.pt/wp-content/uploads/sites/4/2020/04/Vet-Atual-tigre-da-Malásia.jpg**
[12] Embora apenas um tigre tenha sido testado, tanto este animal como outros tigres e leões do mesmo Zoo apresentaram sinais respiratórios de tosse seca.: **https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/um-tigre-em-nova-iorque-um-gato-na-belgica-qual-e-a-historia-do-sars-cov-2-e-dos-felinos/**

Copyright © 2015 Veterinaria Atual. Todos os direitos reservados.

Caça & Cães de Caça
7 de abril -
Em contacto permanente com a equipa de investigadores, face aos desenvolvimentos, resultados de investigações e informação disponibilizada pelos autores, atualizamos o artigo publicado no passado dia 31 de março.
Uma das preocupações dos caçadores e população em geral:

Os animais de companhia podem contrair ou transmitir o coronavírus causador de Covid-19?

Margarida D. Duarte, Médica Veterinária, Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

Ana Isabel S. Duarte, Médica Veterinária, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

Fábio A. Santos, Médico Veterinário, Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

Carina L. Carvalho, Médica Veterinária, Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Pedro C. Melo, Médico Veterinário, Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo, Direção Geral de Alimentação e Veterinária e Vetnatura-Lisboa

Patrícia Tavares Santos, Médica Veterinária, Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal, Direção Geral de Alimentação e Veterinária

Face à dimensão, impacto e imprevisibilidade sem precedentes da pandemia de Codiv-19, causada por um novo coronavírus (SARS CoV-2), alguns caçadores têm inquirido sobre o eventual risco dos animais de companhia, e em particular os cães de caça, poderem transmitir a doença a pessoas. No sentido de ajudarmos a esclarecer estes receios, disponibilizam-se os dados atuais sobre a deteção de material genético de SARS-CoV-2 em canídeos e felídeos, e revêm-se, muito sumariamente, as características dos vírus e os requisitos básicos para que consigam infetar determinadas células animais ou alargar as espécies alvo, com enfase ao seu potencial zoonótico (capacidade de infetar o Homem).

Enquanto **parasitas intracelulares obrigatórios**, uma vez que apenas se multiplicam dentro de células vivas, os vírus co evoluíram com as espécies hospedeiras que infetam, desde as suas origens, sendo delas indissociáveis. Os vírus dependem desde logo da capacidade de encontrarem no hospedeiro células com uma “fechadura” - o recetor celular-, que consigam “abrir”. O reconhecimento de um recetor celular adequado à ligação e subsequente entrada do vírus na célula é, pois, o primeiro passo da infeção, para que se complete um ciclo replicativo viral bem-sucedido. A parte do vírus que reconhece esse

recetor designa-se ligando, e funciona como uma “chave”, que tem de ser necessariamente compatível com a “fechadura”.
Alguns vírus, como o vírus da raiva, utilizam recetores (“fechaduras”), que pela sua função nas células, estão conservados em todos os mamíferos, podendo por isso infetar um larguíssimo espectro de hospedeiros. Outros, dependendo do tipo de recetores e de outros fatores relacionados com o hospedeiro, são específicos da espécie animal que infetam, como é o caso da maioria dos herpesvírus.

Um outro conceito importante para a compreensão da epidemiologia das doenças virais (quando, onde e porque emergem?), é o de “**hospedeiro reservatório**”, uma espécie animal onde o vírus se multiplica e se mantém, atuando como fonte de infeção para outras espécies podendo não apresentar sinais de doença. Uma vez que não ocorre geralmente infeção grave e/ou mortalidade dos hospedeiros reservatório, estas espécies animais garantem a perpetuação e sobrevivência do vírus. No caso do vírus da raiva, os membros da ordem Carnívora (particularmente cães e alguns carnívoros selvagens com coiotes, lobos, chacais e raposas), são considerados os principais reservatórios naturais deste vírus, desenvolvendo, contudo, sintomatologia grave ou muito grave, registando-se percentagens de mortalidade muito elevadas nos animais afetados. Várias espécies de morcegos insectívoros, guaxinins e gambás, são também considerados reservatórios para a raiva em alguns continentes. Relativamente aos coronavírus estão identificados os hospedeiros reservatórios para muitos dos vírus que infetam o homem. Uma vez adaptados à nova espécie, na qual causam doença de gravidade variável, verifica-se igualmente “**especificidade de hospedeiro**”.

A transmissão de um coronavírus da sua espécie reservatório, ou da espécie suscetível habitual para uma nova espécie designa-se “**salto de barreira de espécie**”, sendo este acontecimento raro, envolvendo uma alteração do vírus que lhe permita alargar o seu espectro de hospedeiros. Quando ocorre, provoca geralmente doença subclínica, não havendo por isso, na maioria dos casos, perceção de que o evento aconteceu.

Uma vez que os coronavírus são vírus que **evoluem muito rapidamente**, fruto de elevadas taxas de mutação decorrentes dos erros na duplicação do seu extenso material genético (RNA), e da capacidade de diferentes coronavírus recombinarem entre si (formando uma espécie de quimera), podem adquirir e perder propriedades, o que resulta eventualmente na alteração e/ou alargamento do seu espectro de hospedeiros. Se estas novas competências do vírus se alinharem com a existência de condições particulares que favoreçam o contacto prolongado e íntimo com espécies hospedeiras compatíveis com as alterações sofridas, os

coronavírus podem saltar a barreira de espécie e infetar uma nova espécie. Muitas vezes essas alterações que ocorrem nos vírus requerem a passagem por **hospedeiro intermediário**. A emergência da SARS (Síndrome Aguda Respiratória Severa) em 2002, causada pelo SARS CoV, e da (Síndrome Respiratória do Médio Oriente) MERS em 2012, causada pelo MERS CoV, são exemplos de dois saltos de barreira de espécie que envolveram a transmissão de coronavírus a humanos através de hospedeiros intermediários, nomeadamente a civeta de palmeira asiática, no caso do SARS e os dromedários, no caso do MERS. Ambas as epidemias tiveram um impacto tremendo no Homem em termos de saúde.

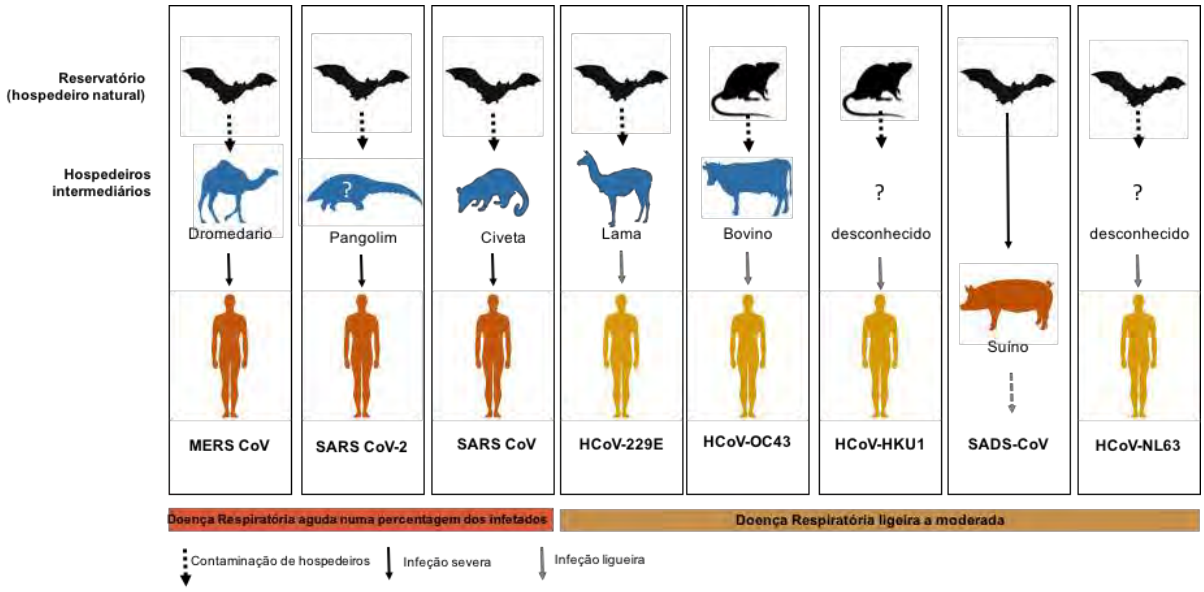


Figura 1. Algumas epidemias resultam da ocorrência de contacto entre o reservatório (morcego, rato, etc) de um determinado vírus com uma espécie que lhe é habitualmente distante, através de hospedeiros intermediários. A civeta constituiu o hospedeiro intermediário do SARS que emergiu em 2002, e o dromedário do MERS que emergiu em 2012.
Está ilustrada uma das hipóteses colocadas, mas não confirmada, para a origem do SARS Cov-2. Neste caso, o Pangolim poderá ter funcionado como hospedeiro intermediário, permitindo a passagem, do vírus dos morcegos para o Homem. Os saltos da barreira de espécie são raros em condições naturais. No caso do SARS-CoV-2 acredita-se ter acontecido devido à convivência, imposta pelo Homem, de várias espécies animais vivas.

Os coronavírus incluem-se na subfamília *Orthocoronavirinae*, onde são reconhecidos 4 géneros, nomeadamente os *Alpha*-, Beta-, *Gamma*- e *Deltacoronavírus*.

Os ***Alphacoronavírus***, incluem principalmente vírus de morcegos, mas também o coronavírus Felino (FCoV), nas suas duas formas clínicas (enterite benigna e peritonite infeciosa maligna), e o coronavírus canino (CCoV), geralmente causador de enterites.
Este grupo inclui ainda alguns coronavírus de humanos como o HCoV 229-E e o HCoV-NL63, frequentemente associados às constipações comuns, e de suínos, como é o caso do SADS-CoV, que causa diarreia aguda e vómito, sendo particularmente agressivo para leitões, onde se pode verificar mortalidade superior a 90%.

Os ***Betacoronavírus*** incluem coronavírus de carnívoros, ungulados, de ouriços e de morcegos. É a este grupo que pertencem os agentes etiológicos das três doenças emergentes na população humana acima referidos (MERS CoV, SARS CoV e SARS-CoV-2), causadores de síndromes respiratórias agudas em pessoas cujo sistema imunitário esteja fragilizado ou comprometido. Este grupo inclui também o HCoV-OC43, um dos agentes infeciosos mais prevalentes nas constipações comuns dos humanos e o HCoV-HKU1 associado a infeções do trato respiratório superior e inferior.

Os ***Gammacoronavírus*** incluem os coronavírus de cetáceos (beluga, golfinhos) e das aves.

Os ***Deltacoronavírus*** incluem maioritariamente coronavírus aviários e alguns coronavírus de suínos.

O SARS-CoV-2, o homem e os animais de companhia

Os dados da sequenciação genética revelam que o SARS-CoV-2, causador da Covid-19, é um parente próximo de coronavírus que circulam em algumas populações de morcegos, com os quais apresenta cerca de 96% de similaridade genética. No entanto, estes vírus de morcegos não possuem o ligando adequado para se ligarem aos recetores de células humanas. Por essa razão, os morcegos são considerados potenciais hospedeiros reservatórios para este vírus, requerendo o envolvimento de outra espécie como hospedeiro intermédio, que medeie a transmissão para os humanos. Embora inicialmente o pangolim tenha sido apontado como um potencial hospedeiro intermediário, o coronavírus detetado nesta espécie possui o referido ligando, pelo que permanece ainda desconhecido o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2.

A proximidade entre o homem e os animais de companhia gera alguma apreensão sobre a possibilidade de ocorrer transmissão de SARS-CoV-2 de, e para, o Homem. Os cães e gatos são, tradicionalmente, os animais de companhia mais comuns, e porventura aqueles com os quais o homem tem maior contacto físico e consequentemente maior probabilidade de partilha e troca bidirecional de microrganismos e de agentes patogénicos, caso sejam suscetíveis.

Não há atualmente evidências de que os cães ou os gatos possam funcionar como hospedeiros intermediários do SARS-CoV-2, mas alguns dados apontam para a possibilidade de a infeção poder ser transferida de humanos a estes animais, embora o inverso ainda não tenha sido reportado.

Os primeiros dados que relacionaram o SARS-CoV2 com o cão, **consistiram na deteção de genoma de SARS-CoV-2 em animais assintomáticos**. Estes casos foram reportados à OIE.

O primeiro cão, oriundo de Tai Hang (Distrito Islands, Hong Kong), foi colocado em quarentena em 26 de fevereiro de 2020, depois do seu dono ter sido hospitalizado devido à

infeção por COVID-19. Após exame veterinário, foram recolhidas zaragatoas nasais, orais e retais e o animal foi posto em quarentena. As amostras nasais e orais foram positivas a SARS-CoV-2 no teste de RT-PCR em tempo real, que deteta RNA viral. Os testes moleculares foram realizados no Laboratório Veterinário de Tai Lung e na Escola da Saúde Pública da Universidade de Hong-Kong. Foram colhidas novas amostras deste cão a 28 de fevereiro e 2, 5, 9, 12 e 13 de março de 2020. As amostras orais e nasais de 28 de fevereiro apresentaram resultados positivos sendo também positivas as de 5 e 9 de março.
Todas as amostras recolhidas nos dias 12 e 13 de março foram negativas, indicando já não haver presença de acido nucleico viral. No entanto, foram detetados anticorpos na amostra de soro recolhida durante a quarentena, confirmando que o cão foi infetado com SARS-CoV-2. O diagnóstico serológico foi efetuado na Escola de Saúde Pública da Universidade de Hong Kong (Laboratório Regional de Referência), e consistiu no teste de neutralização viral.
Este animal morreu dois dias após a liberação da quarentena, não tendo a morte sido diretamente relacionada com a infeção por SARS-CoV-2, mas associada à avançada idade do animal (17 anos).

O segundo caso foi registado em Pok Fu Lam (Distrito Southern, Hong Kong), e envolveu dois cães que iniciaram quarentena a 18 de março de 2020, depois do respetivo dono ter também sido hospitalizado devido a infeção por Covid-19. As zaragatoas nasal, oral e rectal de um dos cães, colhidas em 18 e 19 de março de 2020 apresentaram resultados positivos para SARS-CoV-2 no teste de RT-PCR. Os testes foram efetuados no Laboratório de Veterinária de Tai Lung (Laboratório Nacional).

A 27 de março foi divulgado um caso de diarreia, vômito e dificuldade respiratória num gato, cerca de uma semana após o proprietário adoecer com Covid-19 na Bélgica, e, foi também detetado SARS-CoV-2 nas fezes deste animal. Este caso não foi, contudo, reportado à OIE. Os sinais clínicos não foram correlacionados com a infeção por SARS-CoV-2, podendo ter ocorrido devido à infeção por outro agente patogénico.

Um outro caso, também reportado à OIE, refere-se a um gato de Aberdeen, (Distrito Southern, Hong Kong), que foi colocado em quarentena a 30 de março de 2020, depois do seu dono ter sido hospitalizado devido a Covid-19. Este gato testou positivamente a SARS-CoV-2 em zaragatoas nasal, oral e retal. O animal não exibiu nenhum sinal clínico específico. Em abril, as zaragatoas orais e nasais continuaram a testar positivamente. Os testes de RT-PCR foram realizados no Laboratório Veterinário Tai Lung, (Laboratório

Nacional) e Escola de Saúde Pública da Universidade de Hong Kong (Laboratório Regional).

Nos casos acima referidos ocorridos na China, as autoridades chinesas reportaram ter procedido à limpeza e desinfeção das instalações ocupadas pelo proprietário e pelos animais, salvaguardando as medidas de proteção pessoal adequadas. As mesmas autoridades recomendam que os animais de estimação, nomeadamente mamíferos, ao cuidado de famílias com casos confirmados de Covid-19, devam ser colocados sob vigilância de quarentena por um período de14 dias, com recolha e testagem de amostras para SARS-CoV-2.
Recentemente foram também disponibilizados alguns dados de infeções experimentais em seis espécies animais realizadas na China. Os resultados deste ensaio, que fazem parte de um manuscrito que ainda não foi revisto e validado por peritos da área, reportam que o SARS-CoV-2 infecta ineficientemente cães, porcos, galinhas e patos, mas eficientemente furões e gatos. No entanto, nenhum dos cães e gatos infetados durante este ensaio desenvolveu sintomas de doença e, dos três felinos saudáveis que foram postos em contacto com três animais infetados por via nasal, apenas num foi detetado RNA viral.

Dos Estados Unidos chega-nos a noticia da infeção de um tigre do Parque Zoológico de Nova York, testado depois de vários tigres e leões terem apresentado sinais respiratórios (tosse seca). Os restantes animais não foram testados para evitar submetê-los a anestesia. O tigre em causa apresentou os primeiros sinais de doença a 27 de março. Supõe-se que estes felídeos possam ter sido infetados a partir de um tratador infetado, mas assintomático, que com eles contactou durante a fase de excreção ativa de SARS-CoV-2. O diagnóstico foi feito no Laboratório Nacional Veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

Identificam-se as fragilidades dos dados atualmente disponíveis:

1- Em nenhum dos casos reportados, os cães ou gatos que conviveram com doentes Covid-19 exibiram sinais clínicos da doença. A inexistência de evidências clínicas de infeção sugere que os animais não desenvolvem doença por SARS-CoV-2. No entanto, não se pode excluir que o vírus possa induzir infeções subclínicas ou inaparentes nestas espécies.
2- Não houve menção, na noticia disponibilizada sobre o tigre de um Zoo de Nova York que testou positivamente a SARS-CoV-2, a terem sido efetuados testes adicionais no sentido de excluir a presença de outros agentes patogénicos compatíveis com os sinais de tosse.

3- Em todos os casos reportados à OIE em cães e gatos, o diagnóstico de SARS-CoV-2 foi obtido por testes moleculares (RT-PCR) que detetam moléculas de RNA viral e não partículas infeciosas. Um resultado positivo a RT-PCR nas amostras em causa (zaragatoas), não permite, portanto, diferenciar entre contaminação por fomites (presença inerte de vírus ou genoma viral) e infeção (multiplicação ativa do vírus no hospedeiro). Desconhece-se qual o teste efetuado para pesquisa de SARS-CoV-2 nas amostras do tigre.
4- Até ao momento não foi possível isolar o vírus vivo em células de linha suscetíveis a partir de amostras de cão, e não houve menção a tentativas de isolamento com as amostras de gato. A deteção de vírus infecioso nas amostras dos animais é um elemento fundamental para se poder concluir sobre a replicação (multiplicação) viral tanto nestas espécies, ou em outras.
5- Os resultados das infeções experimentais realizadas na China que sugerem a possibilidade de haver transmissão de SARS-CoV-2 entre gatos, carecem de validação.

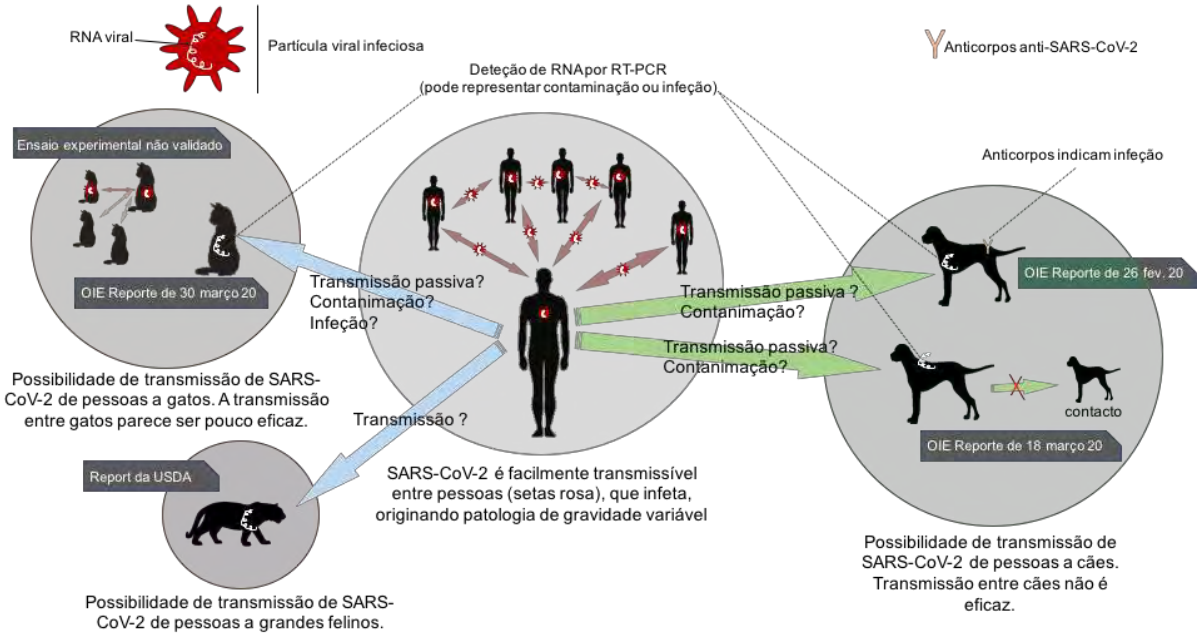


Figura 2. Diagrama representativo da transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos, e da possibilidade de transmissão do homem para cães e gatos

Em conjunto, os dados constantes nas notificações submetidas à OIE até à data, e os disponibilizados por meios não-oficiais, não permitem ainda concluir claramente sobre a

existência de transmissão eficaz do SARS-CoV-2 do Homem para outras espécies animais. A deteção de genoma viral em cães pode ter resultado de transferência passiva de vírus dos proprietários infetados para os animais de companhia (por contaminação), sem ter havido necessariamente infeção e replicação viral nestes animais. Contra este argumento está, no entanto, a deteção de anticorpos em um dos cães. Contudo, esta evidência foi reportada apenas em um único animal, e o título de anticorpos não foi revelado. A suscetibilidade dos cães à infeção parece ser baixa e a transmissão entre cães não parece ser eficaz.

Os dados sugerem, no entanto, que os felídeos sejam mais suscetíveis à infeção pelo SARS-CoV-2. No entanto, com base nos dados atualmente disponíveis, e até haver informação credível que aponte noutro sentido, não é possível afirmar-se com certeza que ocorra transmissão de vírus no sentido Homem-cão ou Homem-gato com infeção subsequente destes animais.

Não há atualmente nenhuma evidencia de transmissão do SARS-CoV-2 de cães, ou de gatos, ao Homem.

Medidas recomendadas pelas Autoridades Portuguesas

Como precaução geral, é sempre prudente que os detentores de animais sigam os **princípios básicos de higiene quando em contato com os animais**. Para além das medidas recomendáveis são as vulgarmente recomendadas para impedir a transmissão de outras doenças dos animais de companhia às pessoas (por exemplo, parasitárias), como a lavagem das mãos. A estas acrescem, contudo, alguns outros cuidados recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), e pela Ordem dos Médicos Veterinários de Portugal (OMV), no contexto da atual pandemia, e que aqui se compilam:

1. As atividades de interação (passeio, alimentação e brincadeira) com os animais de companhia, para pessoas sem Covid-19, podem fazer-se normalmente, desde que no cumprimento das medidas implementadas pelo atual estado de emergência;
2. Durante os passeios dos animais à rua, mantenha a distância recomendada de outros humanos, evitando tocar na cara, boca ou olhos com as mãos e lavando-as e desinfetando-as ao regressar a casa;
3. Embora o animal de companhia, à luz do conhecimento atual, não seja considerado um fator de risco, todas as pessoas que convivam com animais de companhia são aconselhadas a lavarem muito bem as mãos antes e depois de interagirem com eles;

4. Não permitir que os animais lambam a face das pessoas;
5. Não permitir que os animais tenham acesso às camas dos humanos;
6. É ainda recomendável a higienização das patas dos animais após os passeios no exterior;
7. Todos os equipamentos do animal devem se mantidos limpos e arrumados. As tigelas de comida e água, assim como a cama e os brinquedos do animal, devem ser lavados regularmente (idealmente todos os dias);
8. Por precaução, recomenda-se que os doentes com Covid-19 limitem o contato com animais de estimação até que mais informação sobre o vírus esteja disponível. Neste caso, o animal deverá ser cuidado por outro membro da sua família. Caso tenha um animal de apoio, ou se precisar de cuidar do seu animal de estimação não-obstante esteja infetado, use uma máscara facial, não compartilhe com ele comida, não o beije ou abrace e lave sempre as mãos antes e depois de qualquer contato com o animal;
9. No caso de contrair Covid-19 e já estar em contacto com seus animais de estimação, mantenha-os dentro de casa e longe de outras pessoas. Embora o risco de transmissão para, ou de um animal, seja baixo, deve evitar-se que um animal exposto elimine esse vírus fora de casa.
10. Mantenha-se e mantenha os seus animais de estimação afastados de pessoas incluídas no grupo de alto risco;
11. Tenha em casa alimento (e, se necessário, medicamentos) para o seu animal para pelo menos 15 dias. Identifique e combine com uma outra pessoa, para tratar do seu animal caso venha a ser necessário. Privilegie alguém que viva na sua casa, já que manter o animal no seu ambiente habitual não é um risco e representa sempre uma mais-valia;
12. Se o seu animal precisar de ir ao Médico Veterinário, contacte-o por via telefónica para solicitar instruções. Na situação atual, é natural que o seu Médico Veterinário tente resolver as situações menos graves sem necessidade de deslocar o seu animal;
13. Se estiver infetado com Covid-19 ou em quarentena, não leve o seu animal ao Médico Veterinário sem o contactar primeiro, devendo também contactar as autoridades sanitárias. É muito importante que o seu Médico Veterinário saiba que irá receber um animal proveniente de um local infetado ou suspeito.

Aconselham-se todos os caçadores e detentores de cães de caça e todos os detentores de animais de estimação a agirem com responsabilidade e consciência, cumprindo todas as **recomendações das autoridades competentes** e tomando todas as medidas necessárias

para se protegerem a si, aos seus e a todos. Considerando que a pandemia Covid-19 se encontra em fase de expansão, procure manter-se informado sobre a evolução da doença na comunidade. Vários “sites” estão acessíveis na internet, podendo ser úteis para adquirir informação relevante.

1. https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/
2. https://www.ecdc.europa.eu/en
3. https://wsava.org/news/highlighted-news/the-new-coronavirus-and-companion-animals-advice-for-wsava-members/
4. http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV
5. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019
6. https://www.efsa.europa.eu/en/news/coronavirus-no-evidence-food-source-or-transmission-route
7. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/faq.html#2019-nCoV-and-animals

Os animais de companhia e o coronavírus causador de COVID-19



Os animais de companhia podem contrair ou transmitir o coronavírus causador de COVID-19? Esta é uma das preocupações da população em geral e dos caçadores, em particular. Durante o período de confinamento obrigatório estivemos em contacto permanente com uma equipa de investigadores que nos foram alertando sobre os comportamentos a adoptar com os nossos companheiros caninos que fomos publicando na página de Facebook da revista e que agora publicamos.

TEXTO: MARGARIDA D. DUARTE (MÉDICA VETERINÁRIA, LABORATÓRIO DE VIROLOGIA, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA E CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM SANIDADE ANIMAL, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE DE LISBOA); ANA ISABEL S. DUARTE (MÉDICA VETERINÁRIA, CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM SANIDADE ANIMAL, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE DE LISBOA); FÁBIO A. SANTOS (MÉDICO VETERINÁRIO, LABORATÓRIO DE VIROLOGIA, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA E CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM SANIDADE ANIMAL, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE DE LISBOA); CARINA L. CARVALHO (MÉDICA VETERINÁRIA, LABORATÓRIO DE VIROLOGIA, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA); PEDRO C. MELO (MÉDICO VETERINÁRIO, DIREÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DA REGIÃO DE LISBOA E VALE DO TEJO, DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA E VETNATURA-LISBOA); PATRÍCIA TAVARES SANTOS (MÉDICA VETERINÁRIA, DIVISÃO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE ANIMAL, DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA)

FOTOS:

Face à dimensão, impacto e imprevisibilidade sem precedentes da pandemia de Codiv-19, causada por um novo coronavírus (SARS CoV-2), alguns caçadores têm inquirido sobre o eventual risco dos animais de companhia, e em particular os cães de caça, poderem transmitir a doença a pessoas. No sentido de ajudarmos a esclarecer estes receios, disponibilizam-se os dados atuais sobre a deteção de material genético de SARS-CoV-2 em canídeos e felideos, e revêm-se, muito sumariamente, as características dos vírus e os requisitos básicos para que consigam infetar determinadas células animais ou alargar as espécies alvo, com enfase ao seu potencial zoonótico (capacidade de infetar o Homem).

PARASITAS INTRACELULARES OBRIGATÓRIOS

Enquanto parasitas intracelulares obrigatórios, uma vez que apenas se multiplicam dentro de células vivas, os vírus "co" evoluíram com as espécies hospedeiras que infetam, desde as suas origens, sendo delas indissociáveis. Os vírus dependem desde logo da capacidade de encontrarem no hospedeiro células com uma "fechadura" - o recetor celular-, que consigam "abrir". O reconhecimento de um recetor celular adequado à ligação e subsequente entrada do vírus na célula é, pois, o **primeiro passo da infeção,** para que se complete um ciclo replicativo viral bem-sucedido. A parte do vírus que reconhece esse recetor designa-se ligando, e funciona como uma "chave", que tem de ser necessariamente compatível com a "fechadura".

Alguns vírus, como o vírus da raiva, utilizam recetores ("fechaduras"), que pela sua função nas células, estão conservados em todos os mamíferos, podendo por isso infetar um larguíssimo espectro de hospedeiros. Outros, dependendo do tipo de recetores e de outros fatores relacionados com o hospedeiro, são específicos da espécie animal que infetam, como é o caso da maioria dos herpesvírus.

HOSPEDEIRO RESERVATÓRIO

Um outro conceito importante para a compreensão da epidemiologia das doenças virais (quando, onde e porque emergem?), é o de "hospedeiro reservatório", **uma espécie animal onde o vírus se multiplica e se mantém,** atuando como fonte de infeção para outras espécies podendo não apresentar sinais de doença. Uma vez que não ocorre geralmente infeção grave e/ou mortalidade dos hospedeiros reservatório, estas espécies animais garantem a perpetuação e sobrevivência do vírus. No caso do vírus da raiva, os membros da ordem Carnívora (particularmente cães e alguns carnívoros selvagens com coiotes, lobos, chacais e raposas), são considerados os principais reservatórios naturais deste vírus, desenvolvendo, contudo, sintomatologia grave ou muito grave, registando-se percentagens de mortalidade muito elevadas nos animais afetados. Várias espécies de morcegos insectívoros, guaxinins e gambás, são também considerados reservatórios para a raiva em alguns continentes. Relativamente aos coronavírus **estão identificados os hospedeiros reservatórios para muitos dos vírus que infetam o homem.** Uma vez adaptados à nova espécie, na qual causam doença de gravidade variável, verifica-se igualmente "especificidade de hospedeiro".

SALTO DE BARREIRA DE ESPÉCIE

A transmissão de um coronavírus da sua espécie reservatório, ou da espécie suscetível habitual para uma nova espécie designa-se "salto de barreira de espécie", sendo este acontecimento raro, envolvendo uma alteração do vírus que lhe permita alargar o seu espectro de hospedeiros. Quando ocorre, provoca geralmente doença subclínica, não havendo por isso, na maioria dos casos, perceção de que o evento aconteceu.

Uma vez que os **coronavírus são vírus que evoluem muito rapidamente,** fruto de elevadas taxas de mutação decorrentes dos erros na duplicação do seu extenso material genético (RNA), e da capacidade de diferentes coronavírus recombinarem entre si (formando uma espécie de quimera), podem adquirir e perder propriedades, o que resulta eventualmente na alteração e/ou alargamento do seu espectro de hospedeiros. Se estas novas competências do vírus se alinharem com a existência de condições particulares que favoreçam o contacto prolongado e íntimo com espécies hospedeiras compatíveis com as alterações sofridas, **os coronavírus podem saltar a barreira de espécie e infetar uma nova espécie.** Muitas vezes essas alterações que ocorrem nos vírus requerem a passagem por hospedeiro intermediário. A emergência da SARS (Síndrome Aguda Respiratória Severa) em 2002, causada pelo SARS CoV, e da (Síndrome Respiratória do Médio Oriente) MERS em 2012, causada pelo MERS CoV, são exemplos de dois saltos de barreira de espécie que envolveram a transmissão de coronavírus a humanos através de hospedeiros intermediários, nomeadamente a civeta de palmeira asiática, no caso do SARS e os dromedários, no caso do MERS. Ambas as epidemias tiveram um impacto tremendo no Homem em termos de saúde.

O SARS-COV-2, O HOMEM E OS ANIMAIS DE COMPANHIA

Os dados da sequenciação genética revelam que o SARS-CoV-2, causador da Covid-19, é um parente próximo de coronavírus que circulam em algumas populações de morcegos, com os quais apresenta cerca de 96% de similaridade genética. No entanto, estes vírus de morcegos não possuem o ligando adequado para se ligarem aos recetores de células humanas. Por essa razão, os morcegos são considerados potenciais hospedeiros reservatórios para este vírus, requerendo o envolvimento de outra espécie como hospedeiro intermédio, que medeie a transmissão para os humanos. Embora inicialmente o pangolim tenha sido apontado como um potencial hospedeiro intermediário, o coronavírus detetado nesta espécie possui o referido ligando, pelo que permanece ainda desconhecido o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2.

A proximidade entre o homem e os animais de companhia gera alguma apreensão sobre a possibilidade de ocorrer transmissão de SARS-CoV-2 de, e para, o Homem. Os cães e gatos são, tradicionalmente, os animais de companhia mais comuns, e porventura aqueles com os quais o homem tem maior contacto físico e consequentemente maior probabilidade de partilha e troca bidirecional de microrganismos e de agentes patogénicos, caso sejam suscetíveis.

Não há atualmente evidências de que os cães ou os gatos possam funcionar como hospedeiros intermediários do SARS-CoV-2, mas alguns dados apontam para a possibilidade de a infeção poder ser transferida de humanos a estes animais, embora o inverso ainda não tenha sido reportado.

Os primeiros dados que relacionaram o **SARS-CoV2 com o cão,** consistiram na deteção de genoma de SARS-CoV-2 em animais assintomáticos. Estes casos foram reportados à OIE.

O primeiro cão, oriundo de Tai Hang (Distrito Islands, Hong Kong), foi colocado em quarentena em 26 de fevereiro de 2020, depois do seu dono ter sido hospitalizado devido à infeção por COVID-19. Após exame veterinário, foram recolhidas zaragatoas nasais, orais e retais e o animal foi posto em quarentena. As amostras nasais e orais foram positivas a SARS-CoV-2 no teste de RT-PCR em tempo real, que deteta RNA viral. Os testes moleculares foram realizados no Laboratório Veterinário de Tai Lung e na Escola da Saúde Pública da Universidade de Hong-Kong. Foram colhidas novas amostras deste cão a 28 de fevereiro e 2, 5, 9, 12 e 13 de março de 2020. As amostras orais e nasais de 28 de fevereiro apresentaram resultados positivos sendo também positivas as de 5 e 9 de março.

Todas as amostras recolhidas nos dias 12 e 13 de março foram negativas, indicando já não haver presença de acido nucleico viral. No entanto, foram detetados anticorpos na amostra de soro recolhida durante a quarentena, confirmando que o cão foi infetado com SARS-CoV-2. O diagnóstico serológico foi efetuado na Escola de Saúde Pública da Universidade de Hong Kong (Laboratório Regional de Referência), e consistiu no teste de neutralização viral.

Este animal morreu dois dias após a liberação da quarentena, não tendo a morte sido diretamente relacionada com a infeção por SARS-CoV-2, mas associada à avançada idade do animal (17 anos).

O segundo caso foi registado em Pok Fu Lam (Distrito Southern, Hong Kong), e envolveu dois cães que iniciaram quarentena a 18 de março de 2020, depois do respetivo dono ter também sido hospitalizado devido a infeção por Covid-19. As zaragatoas nasal, oral e rectal de um dos cães, colhidas em 18 e 19 de março de 2020 apresentaram resultados positivos para SARS-CoV-2 no teste de RT-PCR. Os testes foram efetuados no Laboratório de Veterinária de Tai Lung (Laboratório Nacional).

A 27 de março foi divulgado um caso de diarreia, vômito e ▸



dificuldade respiratória num gato, cerca de uma semana após o proprietário adoecer com Covid-19 na Bélgica, e, foi também detetado SARS-CoV-2 nas fezes deste animal. Este caso não foi, contudo, reportado à OIE. Os sinais clínicos não foram correlacionados com a infeção por SARS-CoV-2, podendo ter ocorrido devido à infeção por outro agente patogénico.

Um outro caso, também reportado à OIE, refere-se a **um gato de Aberdeen** (Distrito Southern, Hong Kong), que foi colocado em quarentena a 30 de março de 2020, depois do seu dono ter sido hospitalizado devido a Covid-19. Este gato testou positivamente a SARS-CoV-2 em zaragatoas nasal, oral e retal. O animal não exibiu nenhum sinal clínico específico. Em abril, as zaragatoas orais e nasais continuaram a testar positivamente. Os testes de RT-PCR foram realizados no Laboratório Veterinário Tai Lung, (Laboratório Nacional) e Escola de Saúde Pública da Universidade de Hong Kong (Laboratório Regional).

Nos casos acima referidos ocorridos na China, as autoridades chinesas reportaram ter procedido à limpeza e desinfeção das instalações ocupadas pelo proprietário e pelos animais, salvaguardando as medidas de proteção pessoal adequadas. As mesmas autoridades recomendam que os animais de estimação, nomeadamente mamíferos, ao cuidado de famílias com casos confirmados de Covid-19, devam ser colocados sob vigilância de quarentena por um período de14 dias, com recolha e testagem de amostras para SARS-CoV-2.

Recentemente foram também disponibilizados alguns dados de infeções experimentais em seis espécies animais realizadas na China. Os resultados deste ensaio, que fazem parte de um manuscrito que ainda não foi revisto e validado por peritos da área, reportam que o SARS-CoV-2 infecta ineficientemente cães, porcos, galinhas e patos, mas eficientemente furões e gatos. No entanto, nenhum dos cães e gatos infetados durante este ensaio desenvolveu sintomas de doença e, dos três felinos saudáveis que foram postos em contacto com três animais infetados por via nasal, apenas num foi detetado RNA viral.

Dos Estados Unidos chega-nos a notícia da infecção de um tigre do Parque Zoológico de Nova York, testado depois de vários tigres e leões terem apresentado sinais respiratórios (tosse seca). Os restantes animais não foram testados para evitar submetê-los a anestesia. O tigre em causa apresentou os primeiros sinais de doença a 27 de março. Supõe-se que estes felídeos possam ter sido infetados a partir de um tratador infetado, mas assintomático, que com eles contactou durante a fase de excreção ativa de SARS-CoV-2. O diagnóstico foi feito no Laboratório Nacional Veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

OS CORONAVÍRUS

Os coronavírus incluem-se na subfamília *Orthocoronavirinae,* onde são reconhecidos 4 géneros, nomeadamente os *Alpha-*, *Beta-, Gamma-* e *Deltacoronavírus.*

Os *Alphacoronavírus,* incluem principalmente vírus de morcegos, mas também o coronavírus Felino (FCoV), nas suas duas formas clínicas (enterite benigna e peritonite infeciosa maligna), e o coronavírus canino (CCoV), geralmente causador de enterites.

Este grupo inclui ainda alguns coronavírus de humanos como o HCoV 229-E e o HCoV-NL63, frequentemente associados às constipações comuns, e de suínos, como é o caso do SADS-CoV, que causa diarreia aguda e vómito, sendo particularmente agressivo para leitões, onde se pode verificar mortalidade superior a 90%.

Os B*etacoronavírus* incluem coronavírus de carnívoros, ungulados, de ouriços e de morcegos. É a este grupo que pertencem os agentes etiológicos das três doenças emergentes na população humana acima referidos (MERS CoV, SARS CoV e SARS-CoV-2), causadores de síndromes respiratórias agudas em pessoas cujo sistema imunitário esteja fragilizado ou comprometido.

Este grupo inclui também o HCoV-OC43, um dos agentes infeciosos mais prevalentes nas constipações comuns dos humanos e o HCoV-HKU1 associado a infeções do trato respiratório superior e inferior.

Os *Gammacoronavírus* incluem os coronavírus de cetáceos (beluga, golfinhos) e das aves.

Os *Deltacoronavírus* incluem maioritariamente coronavírus e alguns coronavírus de suínos.

DADOS ATUALMENTE DISPONÍVEIS

Identificam-se as fragilidades dos dados atualmente disponíveis:

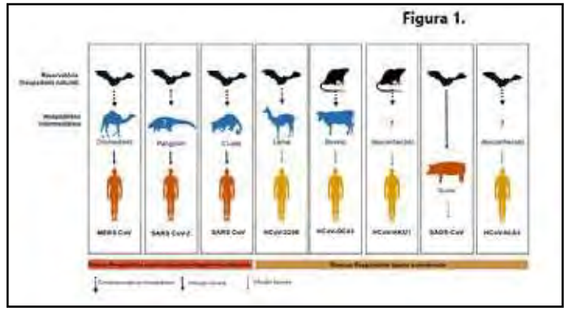
- Em nenhum dos casos reportados, os cães ou gatos que conviveram com doentes Covid-19 exibiram sinais clínicos da doença. A inexistência de evidências clínicas de infeção sugere que os animais não desenvolvem doença por SARS-CoV-2. No entanto, não se pode excluir que o vírus possa induzir infeções subclínicas ou inaparentes nestas espécies.
- Não houve menção, na notícia disponibilizada sobre o tigre de um Zoo de Nova York que testou positivamente a SARS-CoV-2, a terem sido efetuados testes adicionais no sentido de excluir a presença de outros agentes patogénicos compatíveis com os sinais de tosse.
- Em todos os casos reportados à OIE em cães e gatos, o diagnóstico de SARS-CoV-2 foi obtido por testes moleculares (RT-PCR) que detetam moléculas de RNA viral e não partículas infeciosas. Um resultado positivo a RT-PCR nas amostras em causa (zaragatoas), não permite, portanto, diferenciar entre contaminação por fomites (presença inerte de vírus ou genoma viral) e infeção (multiplicação ativa do vírus no hospedeiro). Desconhece-se qual o teste efetuado para pesquisa de SARS-CoV-2 nas amostras do tigre.
- Até ao momento não foi possível isolar o vírus vivo em células de linha suscetíveis a partir de amostras de cão, e não houve menção a tentativas de isolamento com as amostras de gato. A deteção de vírus infecioso nas amostras dos animais é um elemento fundamental para se poder concluir sobre a replicação (multiplicação) viral tanto nestas espécies, ou em outras.
- Os resultados das infeções experimentais realizadas na China que sugerem a possibilidade de haver transmissão de SARS-CoV-2 entre gatos, carecem de validação.

Em conjunto, os dados constantes nas notificações submetidas à OIE até à data, e os disponibilizados por meios não-oficiais, não permitem ainda concluir claramente sobre a existência de transmissão eficaz do SARS-CoV-2 do Homem para outras espécies animais. A deteção de genoma viral em cães pode ter resultado de transferência passiva de vírus dos proprietários infetados para os animais de companhia (por contaminação), sem ter havido necessariamente infeção e replicação viral nestes animais. Contra este argumento está, no entanto, a deteção de anticorpos em um dos cães. Contudo, esta evidência foi reportada apenas em um único animal, e o título de anticorpos não foi revelado. A suscetibilidade dos cães à infeção parece ser baixa e a transmissão entre cães não parece ser eficaz.

Os dados sugerem, no entanto, que os felídeos sejam mais suscetíveis à infeção pelo SARS-CoV-2. No entanto, com base nos dados atualmente disponíveis, e até haver informação credível que aponte noutro sentido, não é possível afirmar-se com certeza que ocorra transmissão de vírus no sentido Homem-cão ou Homem-gato com infeção subsequente destes animais.

Não há atualmente nenhuma evidência de transmissão do SARS-CoV-2 de cães, ou de gatos, ao Homem. ■

Figura 1.



Algumas epidemias resultam da ocorrência de contacto entre o reservatório (morcego, rato, etc) de um determinado vírus com uma espécie que lhe é habitualmente distante, através de hospedeiros intermediários. A civeta constituiu o hospedeiro intermediário do SARS que emergiu em 2002, e o dromedário do MERS que emergiu em 2012.
Está ilustrada uma das hipóteses colocadas, mas não confirmada, para a origem do SARS Cov-2. Neste caso, o Pangolim poderá ter funcionado como hospedeiro intermediário, permitindo a passagem, do vírus dos morcegos para o Homem. Os saltos da barreira de espécie são raros em condições naturais. No caso do SARS-CoV-2 acredita-se ter acontecido devido à convivência, imposta pelo Homem, de várias espécies animais vivas.

Figura 2.

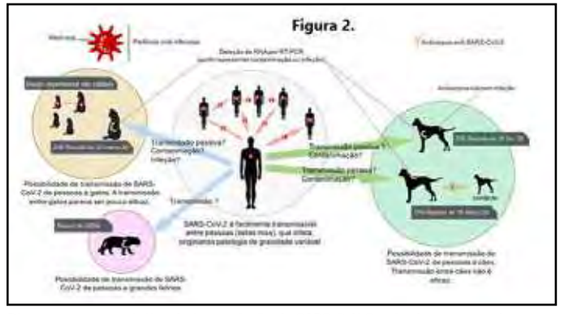


Diagrama representativo da transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos, e da possibilidade de transmissão do homem para cães e gatos.

MEDIDAS RECOMENDADAS PELAS AUTORIDADES PORTUGUESAS

Como precaução geral, é sempre prudente que os detentores de animais sigam os princípios básicos de higiene em contacto com os animais. Para além das medidas recomendáveis são as vulgarmente recomendadas para impedir a transmissão de outras doenças dos animais de companhia às pessoas (por exemplo, parasitárias), como a lavagem das mãos. A estas acrescem, contudo, alguns outros cuidados recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), e pela Ordem dos Médicos Veterinários de Portugal (OMV), no contexto da atual pandemia, e que aqui se compilam:

- As atividades de interação (passeio, alimentação e brincadeira) com os animais de companhia, para pessoas sem Covid-19, podem fazer-se normalmente, desde que no cumprimento das medidas implementadas pelo atual estado de emergência;
- Durante os passeios dos animais à rua, mantenha a distância recomendada de outros humanos, evitando tocar na cara, boca ou olhos com as mãos e lavando-as e desinfetando-as ao regressar a casa;
- Embora o animal de companhia, à luz do conhecimento atual, não seja considerado um fator de risco, todas as pessoas que convivam com animais de companhia são aconselhadas a lavarem muito bem as mãos antes e depois de interagirem com eles;
- Não permitir que os animais lambam a face das pessoas;
- Não permitir que os animais tenham acesso às camas dos humanos;
- É ainda recomendável a higienização das patas dos animais após os passeios no exterior;
- Todos os equipamentos do animal devem se mantidos limpos e arrumados. As tigelas de comida e água, assim como a cama e os brinquedos do animal, devem ser lavados regularmente (idealmente todos os dias);
- Por precaução, recomenda-se que os doentes com Covid-19 limitem o contato com animais de estimação até que mais informação sobre o vírus esteja disponível. Neste caso, o animal deverá ser cuidado por outro membro da sua família. Caso tenha um animal de apoio, ou se precisar de cuidar do seu animal de estimação não-obstante esteja infetado, use uma máscara facial, não compartilhe com ele comida, não o beije ou abrace e lave sempre as mãos antes e depois de qualquer contato com o animal;
- No caso de contrair Covid-19 e já estar em contacto com seus animais de estimação, mantenha-os dentro de casa e longe de outras pessoas. Embora o risco de transmissão para, ou de um animal, seja baixo, deve evitar-se que um animal exposto elimine esse vírus fora de casa.
- Mantenha-se e mantenha os seus animais de estimação afastados de pessoas incluídas no grupo de alto risco;
- Tenha em casa alimento (e, se necessário, medicamentos) para o seu animal para pelo menos 15 dias. Identifique e combine com uma outra pessoa, para tratar do seu animal caso venha a ser necessário. Privilegie alguém que viva na sua casa, já que manter o animal no seu ambiente habitual não é um risco e representa sempre uma mais-valia;
- Se o seu animal precisar de ir ao Médico Veterinário, contacte-o por via telefónica para solicitar instruções. Na situação atual, é natural que o seu Médico Veterinário tente resolver as situações menos graves sem necessidade de deslocar o seu animal;
- Se estiver infetado com Covid-19 ou em quarentena, não leve o seu animal ao Médico Veterinário sem o contactar primeiro, devendo também contactar as autoridades sanitárias. É muito importante que o seu Médico Veterinário saiba que irá receber um animal proveniente de um local infetado ou suspeito.
- Aconselham-se todos os caçadores e detentores de cães de caça e todos os detentores de animais de estimação a agirem com responsabilidade e consciência, cumprindo todas as recomendações das autoridades competentes e tomando todas as medidas necessárias para se protegerem a si, aos seus e a todos. Considerando que a pandemia Covid-19 se encontra em fase de expansão, procure manter-se informado sobre a evolução da doença na comunidade

Poderá encontrar mais informação relevante em www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV

O papel do médico-veterinário na caça menor

A profissão Médico-Veterinária contribui para a sociedade atual de múltiplas formas, desde a manutenção da saúde dos animais de companhia e de pecuária, ao diagnóstico laboratorial, à inspeção sanitária que precede o consumo e ao garante da Saúde Pública enquanto consumidores de produtos de origem animal, entre outras. No âmbito da investigação das patologias que mais afetam os animais, os Médicos Veterinários (MV) desenvolvem atividades de investigação nas áreas da prevenção, conservação, controlo, diagnóstico e tratamento de doenças dos animais e na interface de transmissão de doenças animais às pessoas (doenças zoonóticas).

TEXTO: **FÁBIO ABADE DOS SANTOS[1,2], CARINA CARVALHO[1], TERESA FAGULHA[1], JÉSSICA MONTEIRO[1], JORGE CORREIA[2], MARGARIDA DUARTE[1,2]**
[1] INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA, AV. DA REPÚBLICA, QUINTA DO MARQUÊS, 2780-157 OEIRAS
[2] CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM SANIDADE ANIMAL (CIISA) DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE LISBOA, AV. UNIVERSIDADE TÉCNICA, 1300-477 LISBOA
FOTOS: **ISTOCK**

Até à década de 50, a mortalidade na vida selvagem era habitualmente atribuída a fatores desfavoráveis de natureza não-infeciosa, como alterações das condições climáticas, escassez de alimento, predação excessiva, perturbações do habitat e uso excessivo ou descontrolado de fitossanitários e agroquímicos. Fruto da continuada falta de interesse dos MVs pelas doenças infeciosas que afetavam a fauna selvagem e silvestre, à exceção de patologias zoonóticas como a raiva que, pela sua gravidade, impunham atenção, esta área foi progressivamente objeto de interesse por parte de outras profissões.

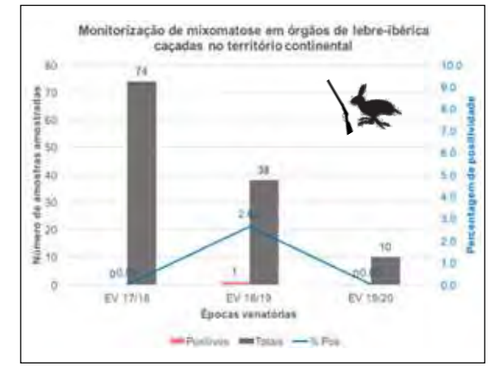
A emergência de doenças com grande impacto no equilíbrio da fauna silvestre, como a mixomatose na década de 50, e doença hemorrágica viral na década de 80, que reduziram abruptamente as populações de coelho-bravo, e de doenças zoonóticas afetando simultaneamente animais e pessoas, como a gripe aviária, a febre do Nilo ocidental, a BSE (encefalopatia espongiforme dos bovinos) e a leptospirose, ajudaram, contudo, a enfatizar a necessidade do envolvimento dos MV também na sanidade das populações selvagens.

É atualmente incontestável a necessidade de se constituírem **equipas multidisciplinares que consigam assegurar toda a cadeia do processo de avaliação e controlo das doenças das espécies silvestres** (monitorização, identificação de sinais de doença, diagnóstico clínico, recolha de amostras, diagnóstico laboratorial) e o desenvolvimento de estratégias e implementação de medidas no terreno. Estas equipas, que integram MVs enquanto responsáveis pela saúde de animal, não prescindem do aporte de outras áreas profissionais, nomeadamente de Biólogos para as vertentes ambientais e de genética populacional destes estudos, e dos Gestores cinegéticos e Caçadores que, enquanto vigilantes do terreno e conhecedores das espécies silvestres e das suas dinâmicas e necessidades, são elementos fundamentais na composição destas equipas para garantir o sucesso da ligação às realidades do terreno.



LEBRE-IBÉRICA

A lebre-ibérica (Lepus granatensis) é um mamífero herbívoro da ordem dos Lagomorfos e família dos Leporídeos, tal como o coelho. A lebre-ibérica é a única espécie de lebre existente em Portugal, estando presente em quase todo o território continental, e a mais abundante em Espanha, onde ocorre sobretudo no Sudoeste. A sua natureza é nervosa, solitária e furtiva. No domínio cinegético, a lebre-ibérica é uma espécie muito apreciada principalmente nas modalidades de caça a corrição e de cetraria. Embora em Portugal não existam dados suportados por censos, verificou-se uma redução das populações de lebre-ibérica nas últimas décadas, que acompanhou o declínio das populações de coelho-bravo. Em 2018 registaram-se surtos de mixomatose em lebre-ibérica, inicialmente em Espanha e depois em Portugal, causando uma onda de mortalidade alarmante nos dois países, que se estima ter levado à diminuição das populações na ordem dos 80%. Recentemente foi detetado e identificado um herpesvirus cujo impacto ainda é desconhecido.







Nos leporídeos caçados (coelhos-bravos e s lebres-ibéricas) durante as três ultimas épocas venatórias, a percentagem de animais positivos ao vírus da mixomatose ou ao vírus da doença hemorrágica (no caso dos coelhos) é bastante menor (sempre inferior a <5% por época venatória), confirmando a elevada virulência destes vírus, e a preocupante mortalidade associada às infeções.

A GESTÃO CINEGÉTICA DA CAÇA MENOR

Enquanto atividade mais antiga praticada pelo Homem, a caça condicionou profundamen- ▸







COELHO-BRAVO

O coelho-bravo é autóctone da Península Ibérica. Nas últimas décadas, as populações de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus* e *O. c. cuniculus*) sofreram uma diminuição acentuada, em número e distribuição geográfica. Estima-se que, atualmente, subsistam apenas 5 a 10% das populações que existiam há 50 anos atrás [9]. Na Península Ibérica, o coelho-bravo é uma das espécies chave dos ecossistemas mediterrânicos, sendo uma das principais presas de, pelo menos, 27 espécies de aves de rapina e 11 espécies de carnívoros, entre outras. Entre estas, destacam-se algumas espécies emblemáticas, como o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial (*Aquila adalberti*), ambas com estatuto de conservação ameaçado. O coelho-bravo integrou em 2019 a lista de espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN).



No coelho-bravo, a doença hemorrágica viral continua a constituir a causa de mortalidade mais relevante. Nos primeiros semestres de 2018 e 2019, 70% dos cadáveres encontrados no campo e remetidos para o INIAV, testaram positivamente a RHDV2.
Após a emergência de um novo vírus da mixomatose em lebres em finais de 2018, o número de casos aumentou progressivamente em Portugal. Em 83% das 53 lebres encontradas mortas entre julho e dezembro de 2019, foi detetado o vírus da mixomatose.

te a nossa evolução, garantindo o aporte proteico necessário a uma melhor saúde e resistência às doenças infeciosas e melhorando a capacidade de resposta a muitos desafios [8]. Efetivamente, é impossível adivinharmos o que teria sido o Homem sem a caça.

Atualmente, **a caça e as atividades que lhe são afins,** como o turismo cinegético, o turismo rural e a gastronomia, **constituem uma atividade económica e cultural muito relevante** e enraizada na Europa, particularmente na Península Ibérica. Contudo, é no seu domínio de intervenção sobre a preservação da natureza e conservação das espécies, que a caça se reveste da maior importância.

A alternativa à atividade cinegética para fins de conservação, seria um regime integralmente financiado pelo Estado o que é economicamente inviável

É inegável o profissionalismo e entrega com que muitos caçadores e proprietários rurais se dedicam à atividade cinegética, e aos processos que lhe estão a montante, investindo recursos próprios em atividades que não podem receber outro rotulo que não o de "conservação. Os seus esforços, por todo o território nacional, na disponibilização de alimentos, na alocação de áreas para reprodução dos animais, e no controlo da predação, são imprescindíveis no contexto atual para garantir a conservação de muitas espécies silvestres. O desaparecimento progressivo da atividade cinegética, que se vem verificando há já algumas décadas, trará seguramente inúmeros problemas de gestão de habitat e de espécies silvestres que dificilmente serão colmatados com outros meios.

O CONSUMO DA CAÇA MENOR

A legislação Portuguesa determina que **a inspeção de caça menor não é obrigatória desde que seja para consumo do próprio.** As disposições relativas à higiene do abate das aves, coelhos, lebres, codornizes e colocação no mercado das respetivas carnes, estão estipuladas na Secção IV do Anexo III do Reg. CE nº 853/2004 de 29/04.

As disposições relativas ao **comércio de pequenas quantidades** de espécimes de caça constam da Portaria n.º 74/2014 de 20 de março. Relativamente ao comércio de caça selvagem entre caçador e consumidor final, é possível realizar-se desde que em pequenas quantidades regulamentadas pelo artigo 7º da referida portaria, sendo por exemplo em número de uma lebre por dia, dois coelhos-bravos por dia e três exemplares de perdiz-vermelha por dia. Importa dizer que por parte do caçador, não é permitia outra operação para além da evisceração, que o fornecimento deve concretizar-se no prazo máximo de 24 horas e que devem ser acompanhados do documento de acompanhamento oficial (modelo Mod. 719A), da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

Os **produtores de espécies cinegéticas criadas em cativeiro,** tal como os caçadores ou suas associações e organizações, podem colocar no mercado para consumo humano as peças de caça resultantes da sua atividade, devendo para isso terem formação que os classifique como «pessoa devidamente formada», entendendo-se por isso estar "na posse de conhecimentos de anatomia, patologia e higiene" da espécie em causa. Acresce que, a carne de caça menor selvagem só pode ser comercializada se a carcaça for transportada para uma instalação de tratamento de caça logo que possível após o exame pela «pessoa devidamente formada». ■

PERDIZ-VERMELHA

A perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*), por ser relativamente abundante em quase todo o território nacional, e pelas suas características de voo é provavelmente a espécie cinegética mais apreciada pelos caçadores ibéricos, a par do coelho-bravo. Nesta espécie tem sido verificada também a diminuição abrupta em algumas áreas do território. A fragmentação dos territórios, também resultante da intensificação da agricultura, e a utilização sistemática de pesticidas nas culturas intensivas, conduziram também à deterioração dos habitats preferenciais para estas espécies. O hibridismo, com outras espécies introduzidas constitui uma preocupação para a preservação desta espécie.



A SAÚDE DA CAÇA MENOR

O coelho-bravo e a lebre-ibérica, enquanto espécies chave do nosso ecossistema, necessitam urgentemente de medidas que contrariem a sua diminuição populacional crónica. O coelho-bravo e a lebre-ibérica têm sido, nos últimos anos, alvo de estudo sistemático, só possível no âmbito do projeto +Coelho (Despacho n.º 4757/2017 de 31 de maio, MAFDR) que decorre desde agosto de 2017. A enorme fragilidade destas espécies e a dificuldade em responder eficazmente às expectativas e anseios do setor cinegético foram as primeiras constatações da equipe deste projeto. Este projeto tem permitido monitorizar as populações selvagens através de amostragens oportunistas em eventos venatórios e identificar a causa de morte em animais encontrados mortos. Até à data, os dados recolhidos permitem confirmar a relevância destas infeções na mortalidade de coelho-bravo, e monitorizar a emergência e evolução da mixomatose em lebre-ibérica. Está em curso o desenvolvimento e aplicação de medidas praticas para alavancar a recuperação destas espécies.

De entre as **doenças infeciosas que afetam os leporídeos**, são de destacar as de etiologia viral, nomeadamente a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral, por serem doenças epidémicas de grande impacto nas populações e cujo controlo na natureza é extremamente difícil.

Contudo, outras doenças de impacto persistente, que desafiam insidiosa e permanentemente os animais, merecem também a nossa atenção. Entre estas, podemos considerar os vírus com potencial imunossupressor, como o recém descrito herpesvírus na lebre-ibérica (LeHV-5), e algumas bactérias, como por exemplo a Pasteurela, frequentemente associada a infeções secundárias, ou alguns parasitas, como os Cisticercos (formas larvares da *Taenia pisiformis*), cujo potencial negativo é enorme tanto no coelho-bravo como na lebre-ibérica. De salientar igualmente que as lebres são sensíveis à infeção pela bactéria *Francisella tularensis*, agente da tularémia. Esta doença é uma zoonose, já identificada em Espanha e Portugal (neste último apenas em leporídeos silvestres, por métodos moleculares). Dependendo da rota de infeção estão descritas as formas ulceroglandular (mais frequente na Península Ibérica), glandular, oculoglandular, orofarígea, pneumónica, tifoide e séptica da doença. O rastreio desta doença é importante em Portugal, dada a perigosidade que apresenta para a saúde do Homem, sendo necessário o envio de cadáveres suspeitos para exame laboratorial.

No âmbito da estratégia sanitária das aves cinegéticas, destacam-se três doenças de etiologia viral, pelo seu impacto na conservação e rentabilidade das espécies selvagens e domésticas, e na saúde pública: a gripe aviária, que afeta múltiplas espécies (Homem, suínos, aves, equinos, etc), a febre do Nilo Ocidental, que afeta aves, equinos e o Homem, e a doença de Newcastle, que causa surtos com mortalidade elevada em rola-brava (*Streptopelia turtur*). De etiologia bacteriana devemos ainda realçar a tuberculose em pato trombeteiro (*Anas clypeata*), que surge com maior risco naquelas aves que efetuam grandes migrações na Europa que os predispõem ao contágio e infeção. Tratando-se também de uma zoonose perigosa para o Homem, é obrigatório um exame cuidadoso dos órgãos internos com rejeição das aves caçadas que apresentem granulomas sólidos com cerca de 5 mm de diâmetro e coloração amarela indicativos de tuberculose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- McDiarmid, A. (1972). British Veterinary Journal, 128(6), 277-283.
- Ross J. Br Vet J. 1972;128(4):172-176.
- Liu SJ et al. (1984). Anim Husb Vet Med, 16:253-255.
- Alexanderz DJ. Vaccine. (2007) Jul 26;25(30):5637-44.
- Hayes EB et al. (2005) CDC Emerg Infect Dis 11(8):1167-1173.
- WHO. Bovine spongiform encephalopathy. 2002. Archived from the original on 18 December 2012. Retrieved 27 October 2018.
- Shearer KE et al. Can Vet J. 2014;55(3):240-248.
- Liebenberg L. J Hum Evol. 2008;55(6):1156-1159.
- Smith, A.T. & Boyer, A.F. 2008. Oryctolagus cuniculus. The IUCN Red List of Threatened Species 2008.
- Delibes, M., et al. (Eds.), Proceedings of the World Lagomorph Conference (1979). University of Guelph, Ontario, pp. 654-663.
- Carvalho, CL., et al. (2020) Veterinary Record Case Reports.
- Abade dos Santos et al. (2020) PLoS ONE 15(4).
- Dias, A. 2006. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Gestão e Conservação da Natureza. Universidade do Algarve.
- Espinosa, J. et al. (2020). Animals, 10(1), 158.
- Munster, V.J. et al. (2007). PLoS Pathogens, 3, 0630-0638.
- Dimitrov KM et al. (2016) Infect Genet Evol,39:22-34.
- Fragoso, C. et al. (2019). Livro de Resumos da Cimeira da Fauna e Gestão Cinegética, em Oeiras, 28-29 de junho, pp. 55-56.

A importância dos leporídeos no equilíbrio das cadeias tróficas e na biodiversidade ibérica

Os leporídeos silvestres da Península Ibérica, o coelho-bravo e a lebre-ibérica, asseguram a transferência de biomassa vegetal para inúmeras espécies animais, garantindo a sua sobrevivência, o sucesso reprodutivo e estabilidade populacional. É fundamental assegurar a continuidade dos esforços que vêm sendo desenvolvidos a nível ibérico, e reforçá-los, para garantir a recuperação das populações de coelho-bravo e da lebre-ibérica, dada a enorme relevância dos leporídeos na salvaguarda da biodiversidade.

Carina Carvalho, Fábio A. Santos, Jéssica Monteiro, Margarida Duarte . Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P.

Paulo Célio Alves . Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos & Dep. Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Ana Hora, Gonçalo Lopes . Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas I.P.

Importância da biodiversidade

Biodiversidade é a variedade de formas de vida conhecidas no nosso planeta, e engloba a diversidade genética, de espécies e de ecossistemas existentes numa determinada área.

Contrariar a rápida erosão da biodiversidade é um dos maiores desafios que a sociedade humana enfrenta atualmente. A sua preservação depende, entre outros fatores, da constante adaptação das espécies às alterações dos ecossistemas, e só é possível se existir variabilidade genética nas populações de cada espécie. Os problemas genéticos decorrentes da existência de populações pequenas e altamente fragmentadas, conduzindo à consanguinidade e consequente perda da variabilidade genética, comprometem a capacidade de adaptação das espécies, aumentando, por isso, a possibilidade da sua extinção [1].

Todas as espécies, incluindo os humanos, são adversamente afetados pela perda da diversidade do planeta, cuja preservação é um dever de todos [1]. Em Portugal, ocorrem duas espécies de leporídeos, ambas endémicas da Península Ibérica: o coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*) (Figura 1) e a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) (Figura 2).

O coelho-bravo tem ampla distribuição na Ibéria, onde está presente em diversos ambientes, desde matagais do Mediterrâneo a agroecossistemas, áreas montanhosas, zonas litorais e dunas. Pela sua importância nas cadeias alimentares e enquanto regulador da vegetação, o coelho-bravo assume uma enorme relevância nos ecossistemas mediterrânicos da Península Ibérica. As populações de coelho-bravo podem ser agrupadas em duas subespécies genética, ecológica e morfologicamente distintas, *Oryctolagus cuniculus algirus* e *Oryctolagus cuniculus cuniculus*, que apresentam também distribuições geográficas distintas, e, de acordo com as suas distribuições naturais, apenas se encontram numa estreita zona de hibridação ao longo do eixo nordeste/sudoeste que divide a Península Ibérica [2]. Em Portugal, apenas ocorre de forma natural a subespécie *O. c. algirus*, que está adaptada principalmente aos ecossistemas mediterrânicos.

Relativamente à lebre, existem 3 espécies na Península Ibérica, a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), a lebre-europeia (*L. europaeus*) e a lebre-de-piornal



Figura 1 – Colónia de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*), Alentejo. (Fotografia de Fábio Abade dos Santos)



Figura 2 – Exemplar de lebre-ibérica (*Lepus granatensis*). (Fotografia de Henrique Pacheco)

(*L. castroviejoi*). A lebre-ibérica é a espécie de lebre mais amplamente distribuída, ocupando todo o território de Portugal continental e a quase totalidade do território de Espanha, estando apenas ausente nas regiões mais a norte, onde se encontram a lebre-europeia e a lebre-de-piornal [3].

O valor inestimável dos leporídeos silvestres na fauna da Península Ibérica

Na Península Ibérica, o coelho-bravo é uma espécie central em todos os debates sobre conservação e gestão ambiental. Embora todas as espécies interajam com o *habitat*, algumas influenciam profundamente as suas condições e a disponibilidade de recursos, afetando por isso outras espécies e todo o ecossistema. É o caso do coelho-bravo, uma espécie-chave no equilíbrio dos ecossistemas mediterrâneos da Península Ibérica, presa de mais de 20 espécies de predadores e considerado "engenheiro de ecossistemas" devido ao seu efeito na modulação da estrutura da paisagem [4]. O coelho-bravo altera a composição da flora e a estrutura da vegetação através da ingestão seletiva de plantas, da sua atividade escavadora e pelo efeito dispersor de sementes. As suas fezes fertilizam o solo, enquanto a urina condiciona a acidez do mesmo, acelerando o crescimento das plantas e fornecendo recursos alimentares para muitas espécies de invertebrados. As tocas dos coelhos oferecem também abrigo para múltiplas espécies de vertebrados e invertebrados [4].

Além de seu papel central na natureza, o coelho-bravo tem uma função económica e cultural nos países do Mediterrâneo, particularmente em Espanha e Portugal, onde é uma das espécies de caça menor mais apreciadas. A atividade cinegética, com grande tradição na Península Ibérica, contraria o abandono rural e a desertificação do interior, acelerando a economia local e criando riqueza direta, através de taxas dos caçadores e do mercado relacionado com o armamento, vestuário e acessórios, manutenção de cães de caça, e indireta, pelo impacto que tem na restauração e hotelaria local pelo interior do país durante o período venatório.

Fatores de redução dos leporídeos silvestres

Habitat desfavorável

O coelho-bravo seleciona o seu *habitat* com base na disponibilidade de alimento e abrigo para se proteger dos predadores. Esta espécie tem uma grande capacidade de adaptação, podendo atingir densidades bastantes elevadas em *habitats* com estruturas e características bastante diversificadas. Apesar disso, *habitats* considerados mais favoráveis para o coelho-bravo são em mosaico, incluindo zonas com vegetação arbustiva, onde encontra abrigo, e herbácea, onde encontra alimento [5]. A cobertura vegeta-

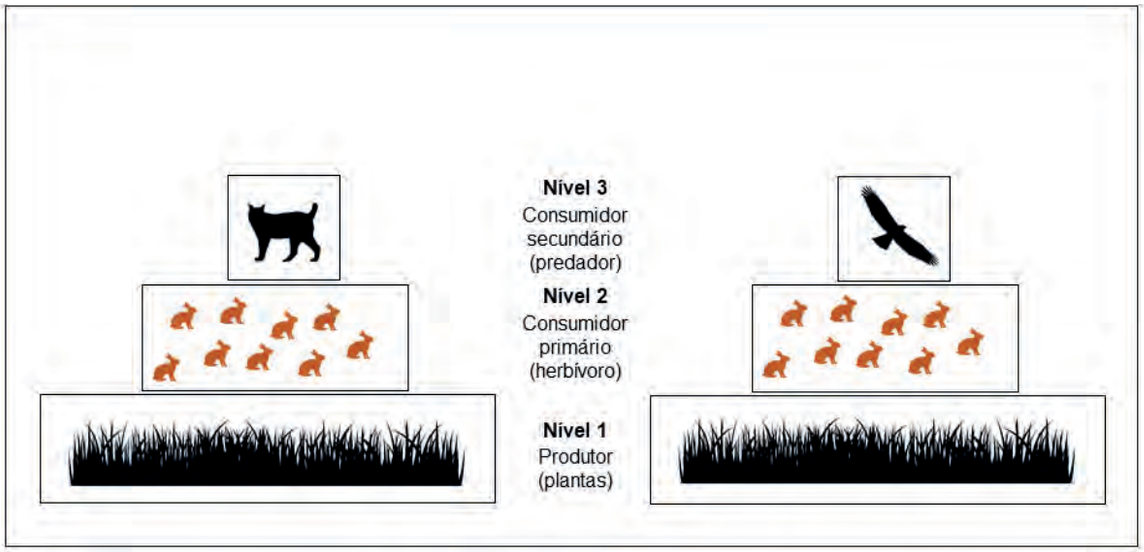


Figura 3 – Representação esquemática dos níveis tróficos de duas cadeias alimentares

tiva em mosaico está, assim, positivamente associada à abundância de coelho. A presença de cobertura arbustiva natural no interior de paisagens agrícolas é crítica para a manutenção da abundância do coelho [6]. A sua distribuição em diferentes paisagens é também influenciada pela topografia, pela dureza do solo, condições climatéricas e práticas agrícolas, nomeadamente pelo tipo de culturas e presença de alguns componentes da paisagem agrícola [6].

A deterioração e/ou fragmentação do seu *habitat* têm contribuído de forma significativa para o declínio desta espécie na Península Ibérica, desempenhando um papel cumulativo com a incidência das epizootias de etiologia viral e a predação. Nas regiões mediterrânicas, o abandono rural e dos terrenos agrícolas conduziram à perda e transformação do mosaico mediterrânico que caracterizava as paisagens agrícolas tradicionais da Península Ibérica e que constituía o *habitat* preferido do coelho-bravo [7].

A lebre-ibérica ocorre numa grande variedade de *habitats*, mas essencialmente em áreas abertas, desde zonas agrícolas de sequeiro a dunas em áreas costeiras e regiões húmidas de montanha [8]. Podem ocorrer em elevada densidade em áreas agrícolas de culturas de olival, vinha e girassol [9]. Vários fatores têm conduzido cumulativamente a modificações nos ecossistemas e à deterioração dos *habitats* preferenciais das lebres. As mudanças das práticas agrícolas, nomeadamente através da intensificação, existência de grandes áreas cultivadas sem orlas, e a ausência de pousios, têm conduzido à redução do *habitat* mais propício para as lebres. Também a expansão das áreas urbanas e industriais, bem como a construção de estradas, têm conduzido à fragmentação dos *habitats* e limitação dos movimentos de espécies selvagens. No caso concreto da lebre-ibérica, as mudanças climáticas e o reflorestamento de culturas antigas com a densificação de áreas de mato aberto têm contribuído sistematicamente para a diminuição da adequabilidade do seu *habitat* [10].

Em várias áreas do território, os proprietários rurais, os gestores de caça e os caçadores têm desempenhado um papel relevante no equilíbrio das populações cinegéticas e na consequente preservação da biodiversidade, garantindo a conservação de várias espécies silvestres. Estes agentes no terreno contribuem de forma muito relevante para a gestão do *habitat* de muitas destas espécies, investindo meios e recursos para a criação de abrigos e disponibilizando alimento através de culturas para a fauna ou pela distribuição de alimentos em comedouros, contribuindo desta forma para proporcionar condições de *habitat* mais favoráveis ao estabelecimento e equilíbrio de várias espécies.

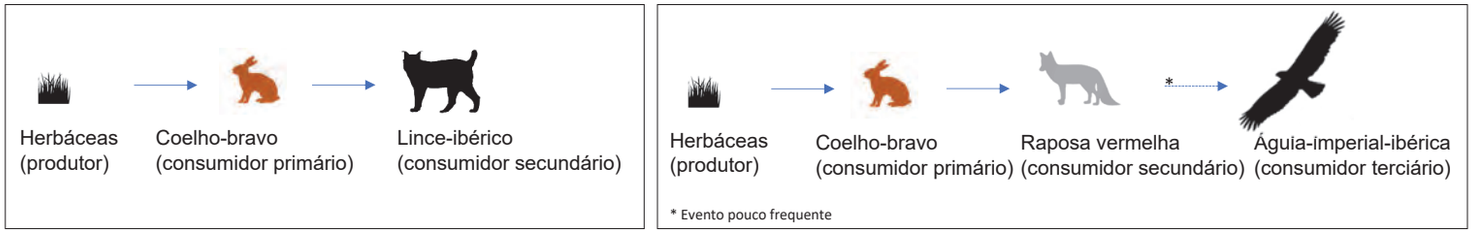


Figura 4 – Esquemas simplificados de cadeias alimentares envolvendo o coelho-bravo e o lince-ibérico (esquerda) e o coelho-bravo, a raposa e a águia-imperial (direita)

Doenças infeciosas

Apesar de, até meados do século XX, o coelho-bravo ter sido sempre abundante na Península Ibérica, reconhece-se, desde então, uma tendência negativa das suas populações naturais, sobretudo como consequência da perda de *habitat* e do impacto das epizootias de etiologia viral [7]. De facto, a emergência da mixomatose na Ibéria na década de 50 [11] e da doença hemorrágica viral em 1989 [12] acelerou significativamente este declínio. Mais recentemente, a emergência do vírus da doença hemorrágica de tipo 2 (RHDV2) em Espanha em 2011 [13] e em Portugal em finais de 2012 [14] teve um impacto muito expressivo nas populações naturais de coelho, que continuam em franco decréscimo [15]. Devido a estes fatores, em 2019, o coelho-bravo, principalmente nos ecossistemas mediterrânicos, passou a integrar a lista de espécies ameaçadas, sendo considerada "Em Perigo" pela União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN) [16].

Relativamente à lebre-ibérica, até meados de 2018 não estavam identificados agentes patogénicos relevantes para esta espécie, considerada naturalmente resistente às doenças de etiologia viral que têm afetado profundamente as populações de coelho-bravo e também ao vírus da síndrome da lebre castanha (EBHSV), uma doença hemorrágica causada por um lagovírus descrita, até à data, apenas na lebre-europeia e na lebre-da-montanha (*L. timidus*). No entanto, este paradigma viria a alterar-se com a emergência em 2018 de um vírus da mixomatose naturalmente recombinante capaz de infetar e causar mortalidade na lebre-ibérica. Este vírus foi detetado inicialmente em Espanha em meados de 2018 [17] e posteriormente em Portugal em finais do mesmo ano [18]. Acresce à identificação deste vírus, também a deteção em 2019 do primeiro herpesvírus em lebre-ibérica, e no género *Lepus*, cuja patogenicidade parece ser exacerbada nas lebres infetadas pelo vírus da mixomatose [19]. Apesar do verdadeiro impacto destes vírus na lebre-ibérica ser ainda desconhecido, a elevada mortalidade observada nas populações naturais de lebre-ibérica em Portugal e em Espanha sugerem que estes vírus têm tido um efeito muito relevante nestas populações, consideradas à data estáveis pela IUCN [10].

Predação excessiva

Nos ecossistemas a que pertencem, os organismos estabelecem relações alimentares em cadeia, transferindo matéria e energia através da nutrição. Cada etapa da cadeia alimentar é designada por nível trófico. De uma forma muito simplificada, uma cadeia alimentar inclui vários níveis tróficos que podem ser hierarquizados em pirâmide. Numa cadeia alimentar, as setas representam a transferência de biomassa de um organismo para outro (Figura 4).

Na base das pirâmides tróficas (primeiro nível), que corresponde à origem das cadeias alimentares, estão os produtores primários, seres autotróficos com capacidade de fotossíntese (plantas verdes) ou de quimiossíntese (bactérias do solo), que transformam energia solar em energia química (biomassa). Esta matéria orgânica é utilizada essencialmente pelo segundo nível trófico, constituído pelos consumidores primários (os herbívoros), que por sua vez servem de alimento aos consumidores secundários (predadores), que constituem o terceiro nível trófico. No último nível trófico encontram-se os superpredadores.

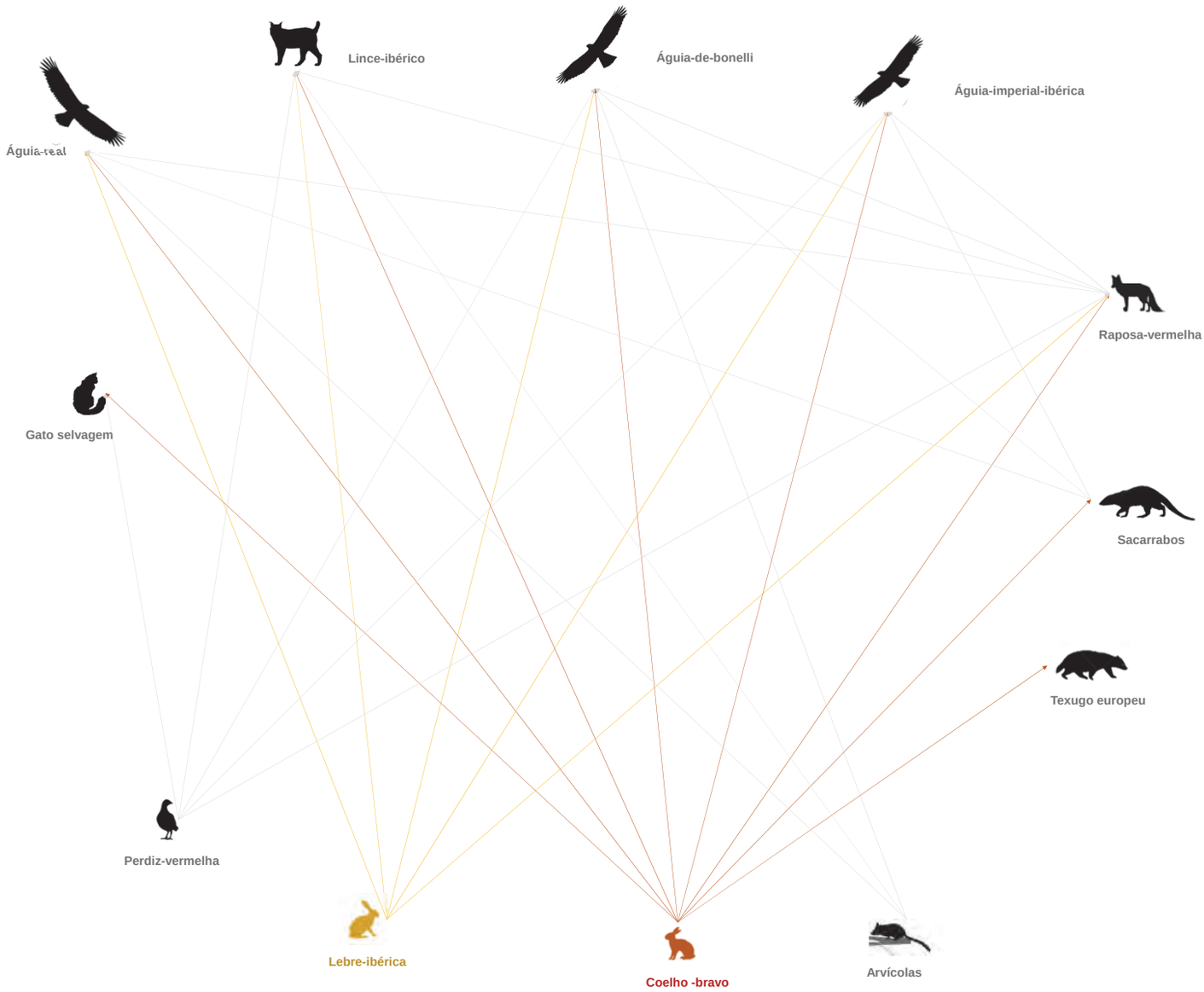


Figura 5 – Algumas ligações da teia trófica que envolve o coelho-bravo e a lebre-ibérica. As relações aqui representadas não refletem de todo a complexidade real desta teia na qual participam muitas outras espécies

Os decompositores, maioritariamente bactérias e fungos, sapróbios ou saprófagos, reciclam a matéria orgânica.

No caso do coelho-bravo, várias espécies de predadores, como, por exemplo, a águia-imperial-ibérica, podem ser simultaneamente consumidores secundários e terciários (Figura 3).

Dada a complexidade das interações que tentam representar, estas relações são explicadas de forma mais realista por teias alimentares, ou pelas redes ecológicas. No que toca aos leporídeos, as cadeias alimentares de inúmeras espécies de predadores entrecruzam-se numa complexa teia, parcialmente representada na Figura 5.

O processo de transferência de biomassa é enviesado, uma vez que apenas uma reduzida percentagem da biomassa ingerida pelos consumidores primários é novamente convertida em biomassa e transferida para o próximo nível trófico. Com efeito, cerca de 90% da biomassa ingerida é usada pelo nível trófico para produção de energia necessária aos processos fundamentais da vida como respiração, nutrição, locomoção, reprodução e excreção.

As elevadas densidades que o coelho-bravo pode atingir em diversas áreas influenciam de forma muito significativa o fluxo de nutrientes. A Figura 6 ilustra as percentagens de biomassa ingeridas por vários carnívoros ibéricos relativamente às

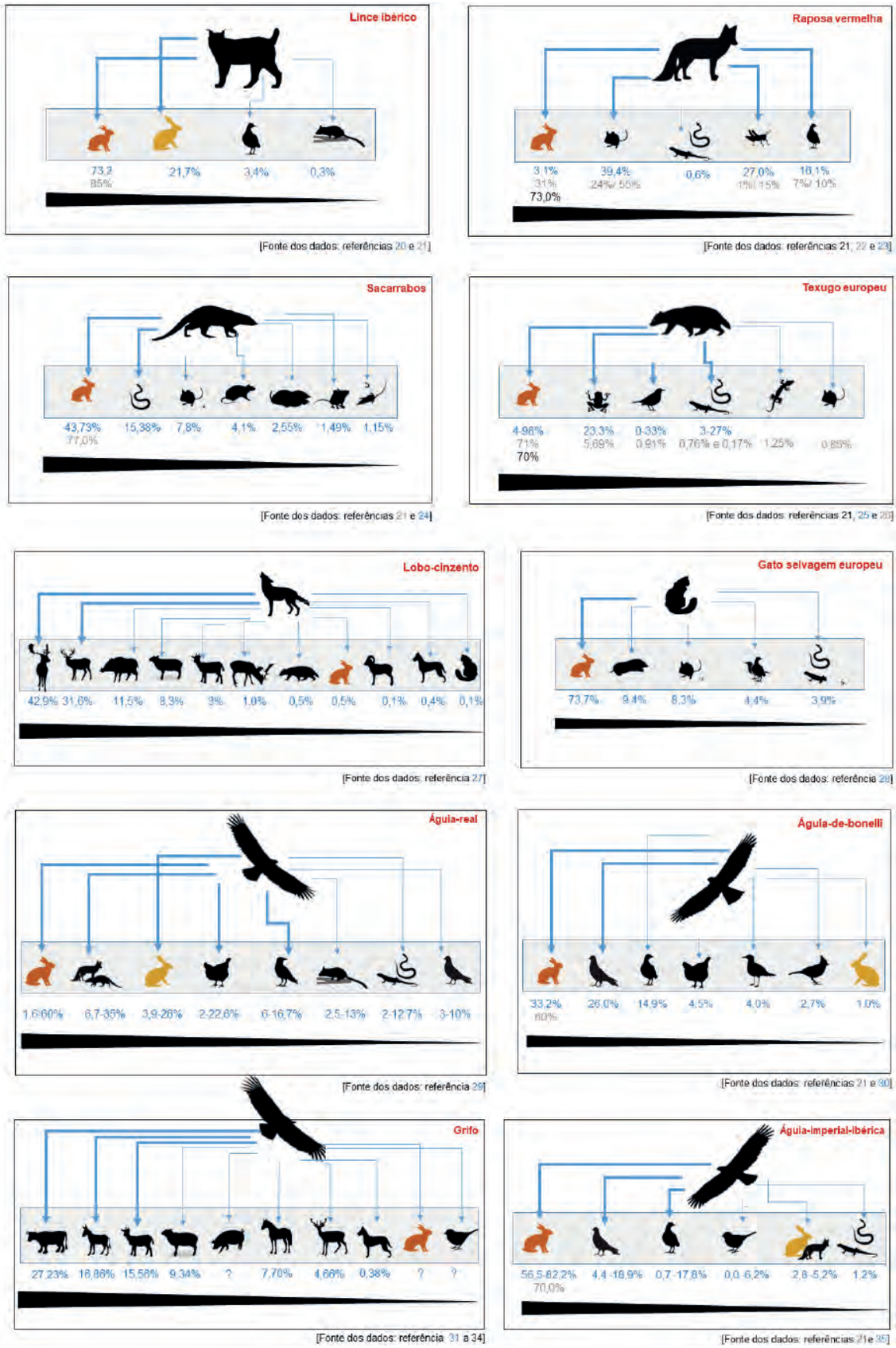


Figura 6 – Principiais presas e respetivos contributos percentuais para a biomassa total ingerida por cada uma de 10 espécies de predadores e necrófagos (6 terrestres e 4 aéreos), de acordo com alguns estudos realizados em áreas geográficas específicas de Portugal e de Espanha. As espécies predadas estão ordenadas da esquerda para a direita, em ordem decrescente de representatividade na biomassa total ingerida por cada espécie. As setas mais espessas indicam presas que contribuem com valores de biomassa superiores a 15%, de acordo com pelo menos um estudo. Para facilitar a consulta, os valores propostos pelos autores dos diferentes estudos para cada espécie predadora/necrófaga são apresentados na mesma cor da respetiva referência bibliográfica [20-35]

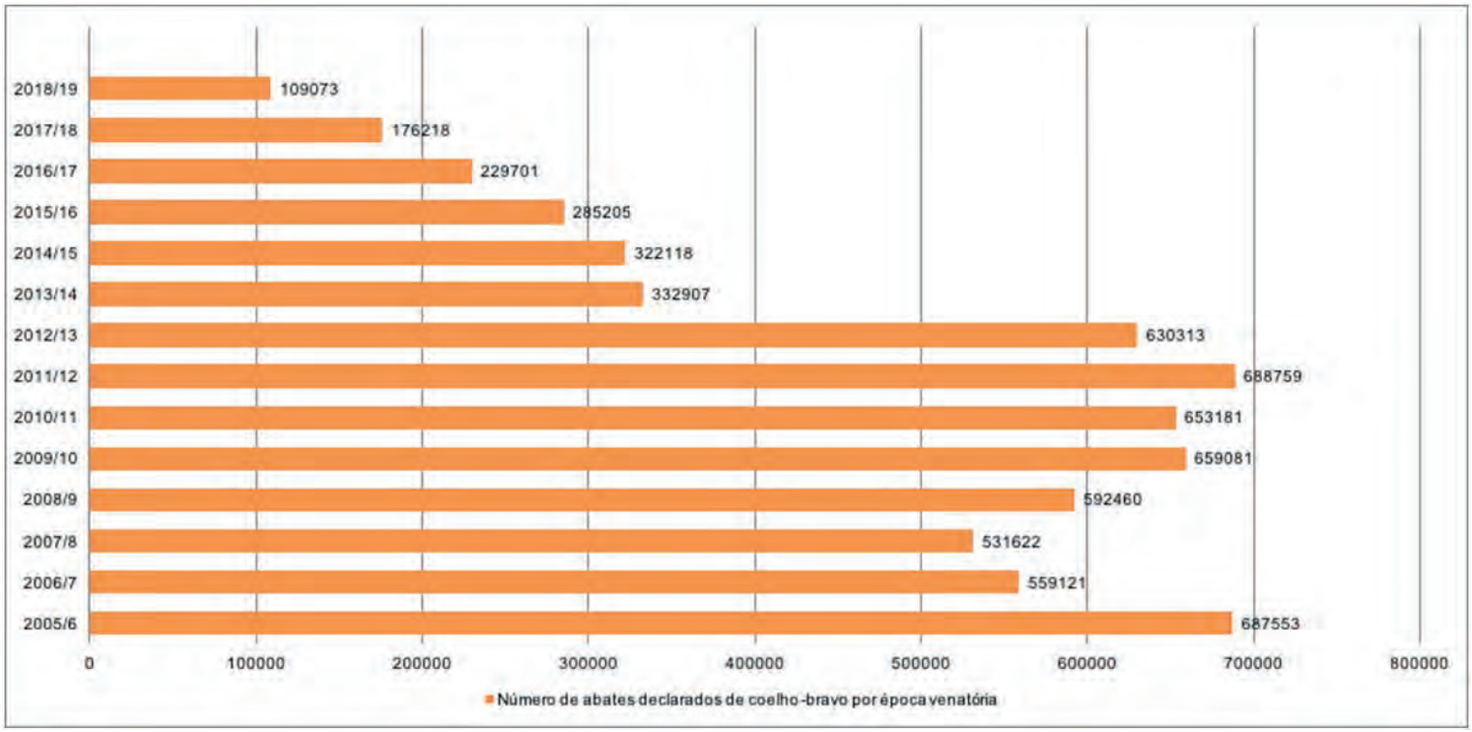


Figura 7 – Resultados de caça de coelho-bravo em Portugal (2005-2019). Dados fornecidos pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)

espécies presas preferenciais, de acordo com diferentes estudos realizados em localizações específicas da Península Ibérica. Predadores especialistas em coelho-bravo, como o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial (*Aquila adalberti*), tornaram-se ameaçadas em consequência do declínio das populações de coelho.

A raposa-vermelha (*Vulpes vulpes)*, à semelhança de outros carnívoros como o texugo (*Meles meles*) e o sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), é um predador generalista e oportunista, capaz de ajustar mais facilmente a sua dieta. No entanto, também nesta espécie, a maior diversidade da sua dieta está diretamente relacionada com a escassez de coelho-bravo. O coelho é igualmente uma espécie importante na dieta de algumas espécies necrófagas, como o abutre-preto, que ajusta a sua dieta em cenários de escassez de coelho. Inversamente, o grifo, que em condições normais se alimenta sobretudo de carcaças de ungulados domésticos e selvagens de grande porte, passou a incluir também cadáveres de coelho-bravo na sua dieta, devido à menor disponibilidade de carcaças daqueles animais.

Esforço de caça desajustado

Verifica-se, desde 2014, uma tendência muito evidente na diminuição dos resultados de caça, tanto de lebre-ibérica (Figura 7), como de coelho-bravo (Figura 8), refletindo uma tendência decrescente destas populações.

A adequação do esforço de caça à dimensão das populações é fundamental para garantir o seu equilíbrio e renovação, principalmente em anos em que as epizootias são mais graves. As avaliações populacionais continuadas, efetuadas com periodicidade bianual, fornecem elementos fundamentais para o conhecimento da tendência das populações, e para a gestão integrada das zonas de caça, devendo idealmente serem asseguradas pelos próprios gestores de forma independente.

Impacto do decréscimo dos leporídeos na biodiversidade

O coelho-bravo desempenha um papel de grande versatilidade na Península Ibérica. O seu desaparecimento, ou redução drástica, dos ecossistemas mediterrânicos da Península Ibérica teria efeitos dramáticos, ameaçando o seu equilíbrio, a biodi-

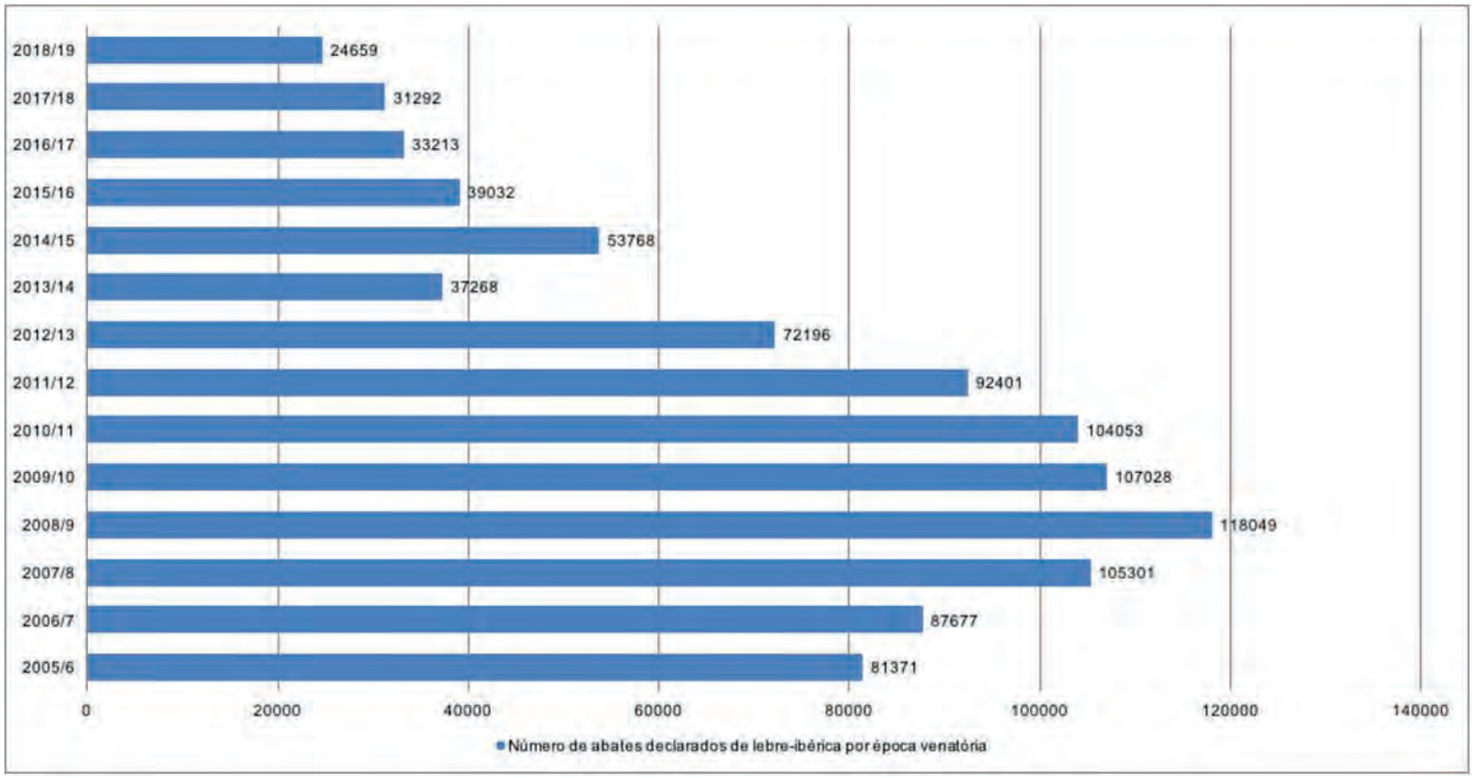


Figura 8 – Resultados de caça para lebre-ibérica (2005-2019). Dados fornecidos pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)

versidade e potencialmente precipitaria a extinção de outras espécies que encontram no coelho presa preferencial. Várias espécies de predadores, como o lince-ibérico (com estatuto ameaçado) e a águia-imperial-ibérica (com estatuto vulnerável), dependem de altas densidades de coelhos para a sua sobrevivência. Apesar de conseguirem encontrar presas alternativas, a abundância de coelho-bravo é essencial para sustentar as populações destas duas espécies de predadores, tendo sido demonstrado que a redução das populações de coelho, impacta na sua capacidade reprodutiva [4]. Acresce que o decréscimo das populações naturais de coelho-bravo impacta também em outras cadeias alimentares, inclusivamente impondo o estabelecimento de novas teias tróficas. Este desvio conduz a uma redução de outras espécies, como é o caso de pequenos répteis, como o sardão (*Timon lepidus*), onde os predadores do coelho-bravo encontram alimento alternativo para a sua sobrevivência (Ricardo Paiva (INIAV), comunicação pessoal).

Também a lebre-ibérica desempenha um papel muito importante enquanto presa de vários predadores, como a águia-imperial, sobretudo no atual contexto de declínio do coelho-bravo [3], pelo que a diminuição das suas populações naturais impacta também em espécies emblemáticas.

Resposta da comunidade

O coelho-bravo e os seus *habitats*, assim como a lebre-ibérica, constituem recursos naturais valiosos do nosso país. A gestão destes recursos é essencial para a conservação e preservação dos ecossistemas e da biodiversidade e também para a manutenção da identidade de muitas regiões rurais de Portugal. O contributo, principalmente a interação e ação consertada, entre os proprietários rurais, agricultores, caçadores, gestores e conservacionistas, são fundamentais para promover a sustentabilidade das populações de coelho-bravo e de lebre-ibérica, nomeadamente através da implementação de culturas para a caça, adequação do *habitat* pela promoção de refúgio para minimizar a predação e potenciar a reprodução, bem como através da monitorização anual das populações e da adequação das cotas de abate.

A comunidade científica ibérica tem respondido ao

desafio de contrariar o decréscimo das populações silvestres de leporídeos através do aprofundamento do conhecimento das duas espécies e dos agentes patogénicos que as afetam, pela implementação de programas de vigilância sanitária financiados pelos dois governos (como os projetos SOS-Coelho, +Coelho e o Programa Mixolepus), e pelo desenvolvimento de linhas de investigação aplicada, dirigidas à produção de ferramentas de prevenção (ex. vacinas) e controlo das doenças que mais os afetam. A criação de centros de reprodução e ações de proteção das características genéticas nativas pretendem assegurar a qualidade dos animais nas ações de translocação e garantir a sua preservação. A capacidade de resposta da comunidade científica depende, contudo, da existência de linhas de financiamento para a área da conservação e da sanidade das espécies silvestres, cuja priorização é, em ultima análise, uma decisão política, sensível às preocupações da sociedade.

Fonte de Financiamento:

Fundo Florestal Permanente (FFP), Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, através do Projeto +Coelho 2 (2019014300001), e Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/137067/2018, e do Projeto Fight-Two (PTDC/CVTCVT/ 29062/2017-PT2020).



Referências bibliográficas

[1] Frankham *et al.* (2010). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
[2] Branco & Ferrand (2000). *Heredity (Edinb)*, **85**:307-317.
[3] Gortazar *et al.* (2007). *Wildlife Biol.*, **13**:244-250.
[4] Delibes-Mateos *et al.* (2008). *Conserv. Biol.*, **22**:1106-17.
[5] Lombardi *et al.* (2007). *Basic Appl Ecol.*, **8**(5):453-463.
[6] Calvete *et al.* (2004). *Landascape Ecol.*, **19**:531-542.
[7] Ferreira & Delibes-Mateos (2010). *Wildl. Biol. Pract. 6.*
[8] Purroy (2011). *In: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A.; Cassinello, J. (Eds.).
[9] Duarte (2000). *Galemys*, 12:3-14.
[10] Soriguer & Carro (2019). https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T41306A2953195.en. Acedido em 26 de maio de 2020.
[11] Guixeras (1957). *Graf. Bat*, Salt, Girona: 126 pp.
[12] Villafuerte *et al.* (1995.) *Mammalia*, **59**:651-660.
[13] Dalton *et al.* (2012). *Emerg. Infect. Dis.*, **18**:2009-12.
[14] Abrantes *et al.* (2014). *Arch. Virol.*, **159**:321-326.
[15] Monterroso, P. *et al.* (2016). *Scientific Reports*, **6**:36072.
[16] Villafuerte & Delibes-Mateos (2019). https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T41291A45189779.en. Acedido em 26 de maio de 2020.
[17] García-Bocanegra *et al.* (2019). *Transbound and Emerg. Dis.*, **66**(6):2204-2208.
[18] Carvalho *et al.* (2020). *Vet Rec Case Rep.*
[19] Abade dos Santos, F.A. *et al.* (2020). *PLoS One. 2020*, **14**:1-20.
[20] Simón, M.A. *et al.* (2013). *Ten years conserving the Iberian lynx*. https://books.google.pt/books?id=VhFEETrncwEC.
[21] Gonçalves (2015). *Gestão de populações de Coelho-bravo: um caso de estudo – a Herdade da Espadaneira.*
[22] Pires (2001). *Ecologia alimentar da raposa [*Vulpes vulpes *(Linnaeus 1758)] no Parque Natural da Serra da Estrela.* Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
[23] Narváez *et al.* (2009). *Estudio de los carnívoros predadores de la ZEPA de la Sierra Norte de Sevilla.* (1), 241-254.
[24] Rosalino *et al.* (2009). *Eur J Wildl Res*, **55**:293-299.
[25] Rodriguez & Delibes (1992). *J Zool (Lond)*, **227**(2):347-350.
[26] Martín *et al.* (1995). *Oecologia*, **101**:45-50.
[27] Barja (2009). *Wildlife Biology*, **15**(2):147-154. https://doi.org/10.2981/07-096.
[28] Gil-Sánchez *et al.* (1999). *Acta Theriologica*, **44**(4):421-428. https://doi.org/10.4098/AT.arch.99-4.
[29] Aguila, D.E.L.; Aquzla, R.; Fernande, C. & Purroy, F.J. (1988). *Tendencias geograficas en la alimentacion del aguila real.*
[30] Palma (2008). Tese de Doutoramento pela Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. Universidade do Algarve.
[31] Fernandez *et al.* (1995). *Ardeola*, **21**:209-217.
[32] Xirouchakis (2005). *Raptor Res.*, **39**(2):179-183.
[33] Donazár *et al.* (2010). *Eur. J. Wildl. Res.*, **56**:613-621.
[34] Carneiro *et al.* (2015). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **113**:295-301.
[35] Sanchéz *et al.* (2009). *Acta Ornithologica*, **44**(1).
[36] Monterroso *et al.* (2016). *Boas práticas na gestão cinegética.* CIBIO/InBIO, ICNF & Câmara Municipal de Mértola.

Anexo VII-H

Capítulo no livro *"Lagomorpha characteristics"*: "*The Health and Future of the Six Hare Species in Europe: A Closer Look at the Iberian Hare"*

We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,900
Open access books available

124,000
International authors and editors

140M
Downloads

Our authors are among the

154
Countries delivered to

TOP 1%
most cited scientists

12.2%
Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?
Contact book.department@intechopen.com

Numbers displayed above are based on latest data collected.
For more information visit www.intechopen.com



Chapter

The Health and Future of the Six Hare Species in Europe: A Closer Look at the Iberian Hare

Margarida D. Duarte, Carina L. Carvalho, Fábio Abade dos Santos, Jéssica Monteiro, Madalena Monteiro, Paulo Melo Carvalho, Paula Mendonça, Patrícia Tavares Santos and Pedro C. Melo

Abstract

Although there are around 40 species of hares in the world divided into three different genera (*Lepus*, *Caprolagus*, and *Pronolagus*), only six species inhabit Europe, all belonging to genus *Lepus*. The conservation status of these six species was recently revised in the International Conservation Union (IUCN) Red List of Threatened Species. *Lepus castroviejoi* and *L. corsicanus* were attributed the status of "vulnerable". The other four species, *L. europaeus*, *L. timidus*, *L. capensis*, and *L. granatensis*, were considered of "least concern" although a declining trend was recognized for the last two species' wild populations. Here we review the major threats to the hare species in Europe, with emphasis on infectious diseases. Furthermore, we present the sanitary data regarding the Iberian hare populations from Portugal, which were severely affected by the emergence of a naturally occurring recombinant myxoma virus (MYXV), first reported in mid-2018. The recent detection in 2019 of a leporid herpesvirus (LeHV-5), which pathogenicity appears to be exacerbated in MYXV-infected hares, brings additional concerns to the health and conservation of the Iberian hare.

Keywords: hare species, Iberian hare, *Lepus granatensis*, viral diseases, myxomatosis, myxoma virus, MYXV, rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV2, leporid herpesvirus, LeHV-5

1. Introduction

1.1 Geographic distribution in Europe

The Lagomorpha order (belonging to the Mammalia class) includes the Ochotonidae family, with one sole genus designated *Ochotona*, and the Leporidae family, with 11 genera, namely, *Pentalagus*, *Bunolagus*, *Nesolagus*, *Romerolagus*, *Brachylagus*, *Sylvilagus*, *Poelagus*, *Pronolagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus*, and *Lepus*.

Like the other hare species in the world, the six hare species found in Europe are small herbivorous mammals belonging to the order Lagomorpha, family Leporidae, and genus *Lepus*.

These hare species, however, have different geographical distributions (**Figure 1**). The Iberian hare (*Lepus granatensis*) is endemic to the Iberian Peninsula and is found in almost all of the territories in Portugal and in southwest Spain (**Figure 2**) [1]. Although genetically and morphologically distinct from the Mountain hare (*Lepus timidus*), in evolutionary terms these two species are closely related [2]. However, the Mountain hare is adapted to cold climates, being found in northern continental Europe, Scotland, Ireland, and the Swiss Alps [3], while

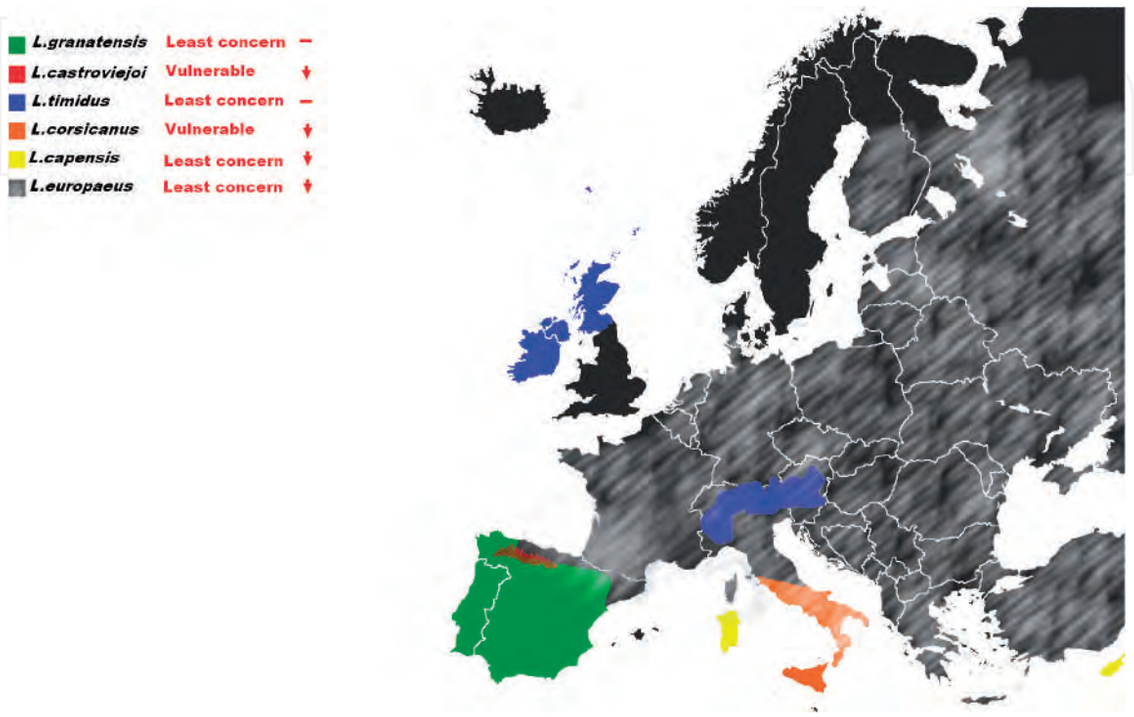


Figure 1.
Geographic distribution, conservation status (International Union for Conservation of Nature, IUCN), and trends of the populations of different hare species found in Europe. The distribution was inferred from the distribution on the IUCN maps, with low precision of the geographic distribution limits. Only distribution in Europe is shown. The distributions resulting from human introductions are not represented. For more information, see the individual page for each species on the website of the International Union for Conservation of Nature (IUCN).



Figure 2.
Adult male Iberian hare (photograph by Sebastião Miguel, 2019).

the Iberian hare's preferred habitat is composed of undergrowth plains, alternating with small areas of bush or grove for refuge [4]. In Spain, two other species are also present, namely, the Broom hare (*Lepus castroviejoi*), limited to the Castroviejo region of northern Spain [5], and the European or Brown hare (*Lepus europaeus*), the species with the widest geographical distribution, also found in the countries of Central and Eastern Europe [6]. The other two species that inhabit Europe are the Italian or Corsican hare (*Lepus corsicanus*), native to the southern coast of Italy and Sicily [7], and the Cape, Arabian, or desert hare (*Lepus capensis*), found in Sardinia. The latter originates from Africa, Asia, and the Middle East and, unlike the other five mentioned species, was introduced into Europe [8]. The six hare species and respective subspecies that inhabit Europe are identified in **Table 1**.

Species	Subspecies		Common names
Lepus europaeus	*L. e. europaeus*	*L. e. caspicus*	Brown hare
	L. e. connori	*L. e. creticus*	European hare
	L. e. cyprius	*L. e. cyrensis*	
	L. e. hybridus	*L. e. judeae*	
	L. e. karpathorum	*L. e. medius*	
	L. e. occidentalis	*L. e. parnassius*	
	L. e. ponticus	*L. e. rhodius*	
	L. e. syriacus	*L. e. transsylvanicus*	
Lepus timidus	*L. t. ainu*	*L. t. begitschevi*	Mountain hare
	L. t. gichiganus	*L. t. hibernicus*	Blue hare
	L. t. kamtschaticus	*L. t. kolymensis*	Tundra hare
	L. t. kozhevnikovi	*L. t. lugubris*	Variable hare
	L. t. mordeni	*L. t. orii*	White hare
	L. t. scoticus	*L. t. sibiricorum*	Snow hare
	L.t. sylvaticus	*L. t. timidus*	Alpine hare
	L. t. transbaicalicus	*L. t. varronis*	Irish hare
Lepus granatensis	*L. g. granatensis*		Granada hare
	L. g. gallaecius		Liebre ibérica (Spanish)
	L. g. solisi		Lebre-ibérica (Portuguese)
L.castroviejoi	No subspecies		Broom hare
Lepus capensis	**South Africa group**		Sardinian hare
	L. c. capensis	*L. c. aquilo*	
	L. c. carpi	*L. c. granti*	
	East Africa group		
	L. c. aegyptius	*L. c. hawkeri*	
	L. c. isabellinus	*L. c. sinaiticus*	
	East Africa group		
	L. c. arabicus		
	North West Africa group		
	L. c. atlanticus	*L. c. mediterraneus*	
	L. c. schlumbergeri	*L. c. whitakeri*	
Lepus corsicanus	No subspecies. Recently considered to be a distinct species from *L. europaeus*		Corsican hare Apennine hare Italian hare

Table 1.
Scientific and common names of the six hare species found in Europe. The recognizable subspecies for Lepus europaeus *(16 subspecies),* Lepus timidus *(16 subspecies),* Lepus granatensis *(3 subspecies) and* Lepus capensis *(13 subspecies) are shown.*

Southern Europe provides, therefore, suitable habitats for the largest number of hare species. Morphologically, the six species of hare that inhabit Europe are distinguishable and follow the Bergmann rule, which establishes a direct relationship between the adults of medium size and the colder environments, for a given taxonomic group with wide geographical distribution [9].

1.2 Favorite habitats

The Iberian hare occupies a wide variety of habitats [2], namely, coastal dunes, wet mountain forests, and dry areas [10]. Like the other species found in Europe, such as the European hare, generally it does not need open water to sustain its metabolism [11]. Besides the open fields, the greater species densities are registered in intensive agricultural areas [12, 13] such as olive tree, sunflower fields, and vineyards [14].

1.3 Morphological characteristics

The Iberian hare is smaller than the other sympatric species, namely, the European hare and Broom hare, with mean body weight ranging from 2.0 to 2.6 kg [15]. Females are bigger than the males [10]. The Iberian hare has an extensive white ventral area that extends partially to the forefeet and hindfeet. This species has an evident contrast between the fur color of the back (ochraceous brown/gray-brown) and the belly (white). It has large brown eyes and long ears (with dark extremities) as a heat dissipation mechanism. The tail is also black on the dorsal surface and white on the ventral side (**Figure 3**). The hind limbs are longer than the front ones [9]. These characteristics added to a cleft lip and second pair of incisors in the upper jaw allow for the differentiation of leporids from rodents.



Figure 3.
Lateral-caudal view of a juvenile male Iberian hare (photograph by Margarida Duarte, 2019).

1.4 Natural behavior

Hares are solitary, as they do not have a social organization nor inhabit burrows [14]. However, they can gather in groups following complex age-dependent patterns, mostly during feeding time, hence reducing predation risk and increasing feeding efficiency [16], or at the time of mating [17]. They do not have a territorial behavior, unlike other lagomorphs such as the wild rabbit [18].

Hares are active primarily during twilight and at night, though in summer they may be observed during the day [19]. During daylight, they seek refuge at the surface, in depressions a few inches deep, dug into the ground or in foxes and marmot's burrows [11].

The Iberian hare is highly specialized in camouflage and when chased by predators is capable of rapid escape, reaching around 70 km/hour [20]. It has a relatively lighter skeleton and larger heart than rabbits, which is only found in the fast-running species [9].

1.5 Reproduction

Reproductive parameters and breeding activities depend on the hare species and environmental conditions. A study on the reproductive strategies of genus *Lepus* compared the breeding season and litter size for distinct hare species, showing differences depending on the climatic conditions of the breeding areas. The species that occur in zones of greater latitude usually produce only a litter per year of about 6–7 young, while species in temperate climate zones have a longer reproductive period, with 3–4 litters of 2–5 leverets each. In the regions closer to the equator, there is no interruption in the reproductive period, with an average of 8-litter per year, each with 1–2 young [21].

The European brown hare, best studied due to its extensive geographic distribution, is a polyestrous seasonal breeder [22]. During the breeding peak, in the spring, mating leads to agglomerations of solitary hares, the so-called "March madness". This species produces an average of 3–5 litter per year [23]. The mean litter size appears to be dependent on the region occupied, ranging between 2.0 and 2.7, with a maximum of 6 [24]. European hares newborns have an average weight of around 100g and are fully furred, born with eyes open, and able to walk. Weaning occurs around 4–5 weeks when juvenile weight reaches around 1 kg. The European hare is fertile at around 4–5 months of age reaching maximum weight at 8 months. When in continental climates, the reproduction in the year of birth is frequent [11]. This species has an age expectancy of 8–12 years [25].

The principal breeding season of Mountain hare occurs from February to September. The gestation period is about 42 days, but this inter-birth interval can be of 36 days in case of superfetation [11]. The species has a mean litter size between 1.9 and 2.1 with a maximum of 5 leverets.

The reproduction period of Iberian hare occurs throughout the year, although there is a certain seasonality in its reproductive activity, peaking in March and April with a minimum in autumn [24]. The onset of sexual activity is not season dependent but rather depends on the size of the animals [10]. The Iberian hare reproductive strategy, of continuous procreation [24], is concordant with smaller litters and longer breeding seasons [26]. Gestation period is also around 42 days. The seasonal trend in the population of young depends on the percentage of pregnant females and litter size. The most frequent gestations involve one or two fetuses; however, litter size may range from one to seven leverets, the largest litter size reported in the wild [11, 27]. The mean annual litter size was estimated in 2.1 leverets per litter [27]. Based on embryo

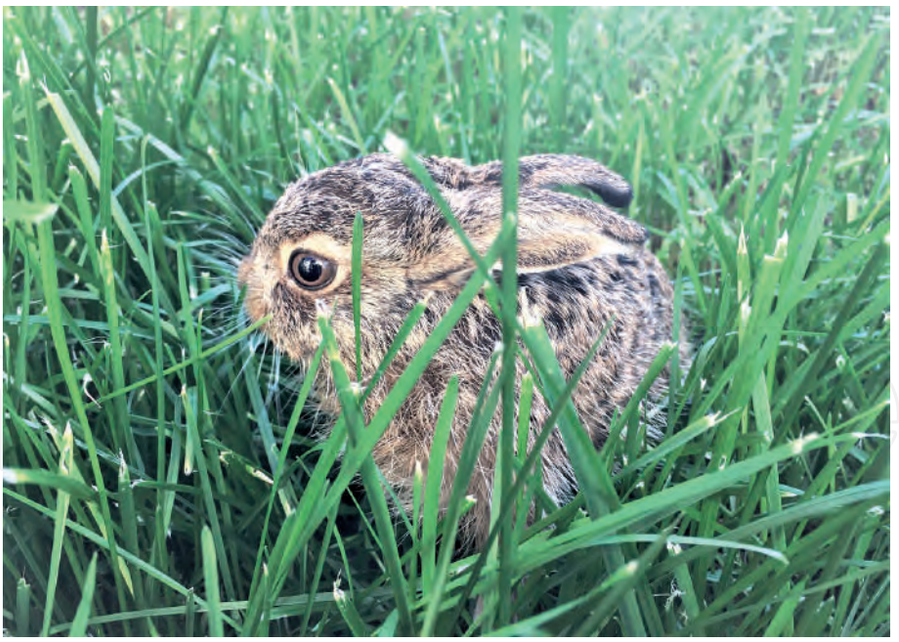


Figure 4.
Leveret of Iberian hare approximately one month of age (photograph by Margarida Duarte, 2019).

counts, the mean litter size was 1.58 (range 1–4). Annual changes in the environment impact on the reproduction of the Iberian hare causing seasonal variations [27]. Newborn Iberian hares are also fully furred, born with eyes open, and able to walk [11] (**Figure 4**). These characteristics differentiate hares from other lagomorphs [28]. The mean weight of newborn leverets in captivity is 128.6 g (range 123–140 g) [11].

1.6 Ecological relevance

Hares have an ecological substantial importance as prey of several species like the golden eagle (*Aquila chrysaetos*), the European wildcat (*Felis silvestris*), the red fox (*Vulpes vulpes*), the Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*), among others [29]. Due to the decrease in the number of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), the Iberian hare also plays an important role as prey for predators such as the *vulnerable* imperial eagle (*Aquila adalberti*) [30–32].

1.7 Importance as a small game species

As a game species, the Iberian hare is much appreciated by Portuguese and Spanish hunters (**Figure 5**). In Portugal, hare hunting is permitted from September to February by different modalities, namely, "salto" and "batida" (the name of two hunting processes in the Portuguese territory), and also standing, coursing, and falconry (Article 93, Decree-Law No. 202/2004 of 18 August); the last two are only allowed between January and February. The ability of high-speed endurance running is used in hare coursing (**Figure 6**), a modality that has led to the selection of the greyhound breed.

Although there is no hare population census-supported data from Portugal, the trends from the National Gamebag Census indicate a reduction in the Iberian hare populations in the recent decades that has accompanied the decline in the wild rabbit populations [33]. This decrease resulted from the combined and cumulative effect of several environmental factors that simultaneously affected the wild rabbit and the Iberian hare, along with the emergence of infectious diseases, namely, myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease (RHD).



Figure 5.
Portuguese hunter (Jacinto Amaro, President of the Portuguese Hunting Federation, Fencaça), collecting an Iberian hare from his dog (German Shorthaired Pointer x English Setter), Avis, Alentejo, 21st December 2017 (photograph by Margarida Duarte).



(A)



(B)

Figure 6.
Top: João Grave and his team performing field recognition before a race (Herdade da Bala, Évora, Alentejo, 20th February, 2016). Bottom: Greyhound dogs chasing an hare during a coursing race (Alentejo, 20th February, 2016). Photographs by José d' Oliveira e Sousa.

2. The top threats to hares in Europe

Most hare species have been subjected to a multitude of threats, which consequently have led to the reduction of the wild populations.

The International Union for Conservation of Nature (IUCN) has recognized as threatening factors to hares in Europe, the loss of habitats due to changes in the agriculture practices and development of urban areas, overhunting, poaching, trapping, agriculture pollution, human intrusions, and disturbances due to recreation activities. The impact of invasive non-native or problematic native species with consequent competition and hybridism has also been pointed out as treats to hare species.

The fragility of the hare species is also related to its own idiosyncrasies, such as the biology of its reproduction. The relatively small size of the litter and the characteristics of the shelters constructed above ground expose the juveniles to much higher predation rates than do rabbits.

Juvenile mortality is considered the most critical factor in the population dynamics. The hares' abundance is directly related to female breeding success and to juvenile survival rates [34], both directly dependent on habitat suitability [14]. The Iberian hare population dynamics is also greatly affected by food availability [35]. The highest juvenile mortality is observed after the maximum reproductive intensity period [14]. This mortality is due to, among other factors, agricultural landing, diseases, and predation [11]. Juvenile mortality of the European hare may reach 90% [36]. Data on the Iberian hare suggest that nearly 60% of the young die, corresponding to an increase of 40% in the population numbers [14]. More recently, prenatal mortality was estimated between 18% and 21% [24, 26]. One study refers to a minimum annual survival rate in young of 27.91% [27].

Below we detail some of the main threats to hares in Europe.

2.1 Habitat loss

Many factors have cumulatively led to ecosystem modifications and to the deterioration of the hares' preferential habitats. The changes in agricultural practices, namely, by the cultivation of annual and perennial non-timber crops, have played a major role in habitat reduction. In addition, the expansion of urban and industrial areas as well as of roads and railroads brought limitations and barriers to the natural habitats and movements of wild species [1, 3, 5–8].

A meta-study involving 12 European countries concluded that the primary cause of the European hare decline since 1910 was agricultural intensification [11]. The average density of the European hare in the original habitats was two individual per 100 ha, although densities of 275/100 ha have already been recorded in territories with favourable conditions [11]. The territory range is directly dependent of the agricultural intensity and can be less of 20 ha (well-structured habitat) or up to 300 ha in habitats subject to intensive agriculture [11].

In the case of the Iberian hare, climate changes and reforestation of old cultures with the densification of open scrubland areas have been contributing to lower habitat suitability [1].

2.2 Diseases

2.2.1 Management of wildlife diseases

Management strategies for wildlife disease encompass the prevention of introduction and spread of new diseases and control or eradication of an existing disease.

However, management of hares' diseases is hampered for several reasons. The high resistance of some pathogens in the environment, where they may persist infectious for long periods, the lack of identification of putative species' reservoirs, and their dissemination via arthropod vectors, such as the European brown hare syndrome virus (EBHSV), RHDV, RHDV2, and MYXV, potentiate new infections and make control very difficult.

Viral dissemination of leporid diseases has often been linked to anthropogenic activities [37, 38]. Changes in human activities, such as the introduction of cleaning and disinfection practices after hunting, the proper disposal of animal by-products, the periodic deworming of dogs, and the restriction of hare translocations to prevent disease spreading, can be easily implemented and impact positively on the recovery of the populations.

Immunization of wild populations, through oral bait vaccines, has been successful in the control of a few diseases such as rabies [39] and Aujeszky disease [40]. However, immunization is best suited for microparasitic exogenous infections with a low reproductive rate and in populations which have a low turnover [41], which is not the case of wild leporids. Several attempts to produce vaccines against RHDV for wild rabbits have been made in the past [42, 43].

Disease surveillance programs of wild animal populations are particularly crucial to obtain data regarding the animal health. The frequent movements of people through territories previously not occupied by man and the recurrent translocation of animals for hunting and conservation purposes increase the contact between wild and domestic animals and humans.

2.2.2 Importance of a conclusive diagnosis in decision-making

Despite its limitations, the implementation of appropriate infection control measures must always be supported by a conclusive diagnosis, for which laboratory testing is essential.

The clinical evaluation of sick animals for diagnosis and research purposes is particularly difficult in wild species, where samples usually reach the laboratories as cadavers or organ samples. In these cases, histopathology provides the only possible bridge to understand the physiopathology of the disease. However, many factors compromise the rigor of the histopathological evaluation, such as an advanced degree of autolysis, which is common in wild species, and the consequences of sample freezing, often done due to transportation and logistic difficulties. Nonetheless, an exhaustive and systematic necropsy is the basis for a successful and complete laboratory diagnosis.

Isolation of pathogens, namely, of viruses by multiplication in sensitive cell lines, facilitates diagnosis and research. However, some pathogens of leporids are not cultivable *in vitro*, such as RHDV [44] and RHDV2 [45].

Molecular methods, in use for many decades, provide the possibility of testing many samples in a few hours with high specificity and sensibility.

Serologic examination of wild species allows the assessment of the previous contact of a population with a particular pathogen (herd immunity).

2.2.3 Relevant hare pathogens

Until recently, unlike rabbits, infectious diseases were not considered a major threat to hares, except for the European brown hare syndrome (EBHS) [46].

Pathogens that infect hares may have an impact at individual or population level. Some are also zoonotic causing disease in humans.

Staphylococcosis (caused by the bacterium *Staphylococcus aureus*) and toxoplasmosis (caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*) may affect hares but generally do not have a major impact on their health from a population perspective. Cestodal or tapeworm infections within this group comprise *Paranoplocephala wimerosa*, *Andrya cuniculi*, *Andrya rhopalocephala*, *Cittotaenia denticulata*, *Mosgovoyia pectinata*, and *Mosgovoyia ctenoides*, all causing catarrhal enteritis with malabsorption in severe cases [47].

Examples of diseases that may have an impact at the population level are pasteurellosis, outbreaks of which, despite residing within the upper respiratory tract of most animals, can kill up to 80% of the population. Hares are also particularly vulnerable to coccidial infections. It is believed that Coccidia play an important role in leveret's mortality rate but it also affects adults. Several species of *Eimeria* were reported in hares, namely, *E. europea, E. hungarica, E. robertsoni, E. robertsoni, E. septentrionalis, E. stefanskii* and *E. townsendii*, which can cause severe catarrhal enteritis and gaseous distension of the gut being found within the epithelial lining of the intestines. *E. stiedae* is limited to the liver and is less important in hares than in rabbits [47].

The gastrointestinal nematode, *Graphidium strigosum*, resides within the stomach of up to 40–60% of hares and in massive infections may cause anemia. In addition, *Trichostrongylus retortaeformis*, a nematode that causes catarrhal enteritis, and *Trichuris leporis*, found inside the cecum which produces toxic metabolites responsible for necrotic lesions within the gut wall, may also be present in high percentages in hare populations, namely, 75.8 and 39.8%, respectively [47, 48]. As for lungworm parasitosis, there are reports of 42–60% of *Protostrongylus commutatus* infection within a hare population [47]. In severe cases, animals present dyspnea and seromucosal nasal discharge due to catarrhal pneumonia and pleuritis. Lungworm infections seem to predispose to contact with bacterial disease [47–49]. Kornaś et al. [50] found a higher prevalence of nematode infection among adult hares than in juveniles from Southern Poland.

The typical examples of the zoonotic disease group are tularemia, a bacterial disease caused by *Francisella tularensis* [51], and leishmaniasis, caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* that are transmitted through the bite of female sand flies [52]. *Francisella tularensis* is one of the most virulent microorganisms presently known as few as 10 microorganisms can cause potentially fatal disease in man and animals (reviewed in [51]). The most important pathogenic subspecies are *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) that occurs usually in North America and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) that occurs throughout the northern hemisphere (reviewed in [51]) and has been described in Iberia both in wild leporids [53] and humans [54]. Wild lagomorphs are one of the main reservoirs of *F. tularensis* in nature and are considered suitable sentinels for disease surveillance (reviewed in [51]). *Leishmania infantum* is responsible for both visceral and cutaneous zoonotic leishmaniasis in the Mediterranean Basin. Iberian hares were associated with an outbreak of 260 human cases of leishmaniasis affecting metropolitan Madrid, Spain, suggesting that hares may have an unexpected role in the epidemiology of *L. infantum* in Spain [52].

Brucellosis is another important zoonosis that can infect hares. In this species, it is caused by *Brucella suis* biovar 2 which can infect other wild or domestic animals and humans [47, 55]. Additionally, hares can also be infected with the zoonotic important *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* [56–58]. Pseudotuberculosis is another typical disease of lagomorphs with zoonotic potential. It is caused by *Yersinia pseudotuberculosis* and is one of the most important lethal infections in hare with population losses of up to 50% [47, 59, 60]. Generally, the zoonotic pathogens do not have a major impact on hares, which act mainly as reservoirs for humans [51, 52, 55].

Some pathogens, such as *Taenia pisiformis* (a cestode parasitosis) [61], and a few viruses, namely, EBHSV [17], rabbit hemorrhagic disease type 2 (RHDV2) [62–67], and the new natural recombinant myxoma virus [68–70], cause potentially devastating diseases in hares, constituting real threats to the preservation of the wild populations. These pathogens are described in more detail below.

2.2.3.1 Cysticercosis

Taenia pisiformis is known to cause a typical parasitosis of lagomorphs known as cysticercosis [33, 71]. The larval stage of this parasitic cestode is found particularly in rabbits and hares, having been described in the European brown hare [61] and in the Iberian hare [72]. Generally, cysticercosis does not give rise to clinically relevant signs in lagomorphs [61]. Light infections are unapparent, although heavy infections can cause abdominal distension and discomfort [73, 74]. Notwithstanding, a negative relation between cysticercosis and kidney fat index in Iberian hare and loss of prolificacy in New Zealand rabbits has been described [61, 75, 76].

There is little information on the prevalence and species diversity of cestode infections in rabbits because of their low pathogenicity and the limited opportunities available to diagnose infection [74]. In the European brown hare, the prevalence of *T. pisiformis* found in northern Italy was 14.8% (8/54) in 2013 and 3.28% (2/61) in 2015 [61]. In Portugal, cysticercosis has been frequently observed in the Iberian hare in some geographic areas from the south.

A combination of pathological-, parasitological-, and molecular-based techniques is usually employed for diagnostic purposes [74].

The presence of mature cysticerci within the abdominal cavity, the most common clinical presentation, can be observed during postmortem examination [77–79]. Yellowish-white parasitic cysts (2–18 mm) are observed in diverse locations, namely, in the peritoneum and liver surface. In massive infections, cysts may be found in the thorax, affecting the mediastinal space and pulmonary parenchyma, scrotum, small and large intestine, and renal capsule (**Figure 7**). Moderate to severe hepatomegaly may be observed.

Vesicles are covered by a membrane (thickness about 1 mm) containing clear liquid and an invaginated scolex of white cysticerci [80, 81]. In some cases, the migratory path of the larvae in the liver can be visualized as lighter colored areas. A host reaction to the parasite, with moderate interstitial lymphocytic hepatitis is observed. Liver parenchyma around protoscolex sections of cysts is usually surrounded by a



Figure 7.
Macroscopic view of the abdomen and thorax cavities of an adult female hare with numerous cysticerci (the larval stage of Taenia pisiformis), attached to the serosa of the intestines and to the liver surface (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

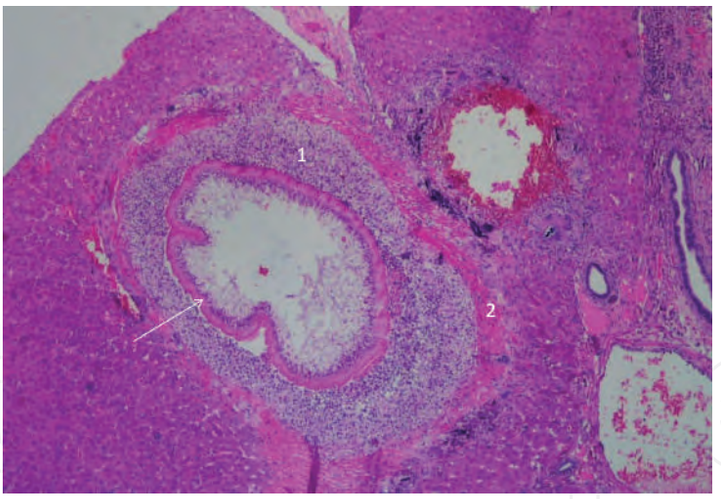


Figure 8.
Microscopic view of a cysticercus vesicle (arrow), in the liver of an Iberian hare. Inflammatory cell infiltration (1) and peripheral necrosis (2) around the vesicle. HE, 40× (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

fibrous reaction or granulomatous inflammation with multinucleated giant cells, macrophages, plasma cells, and many eosinophils (**Figure 8**). Multifocal to disseminated interstitial chronic hepatitis with diffuse biliary stasis may be observed [74].

At the parasitological examination, cysticerci appear as small, transparent, fluid-filled cysts with a broad anterior and narrow, tail-like posterior. Examination by light microscopy using staining techniques can reveal features consistent with described morphologies of *T. pisiformis* cysticerci, namely, corrugated tegument, apical tegument invagination, and invagination canal [74, 82–85].

The molecular diagnosis of *T. pisiformis* cysticercosis can be performed using a generic pair of primers described by Boubaker et al. [86]. This pair of primers was designed to amplify the *Taeniidae* mitochondrial 16S ribosomal RNA gene and is suitable for amplifying and distinguishing through sequence analysis 13 separate cestode species and theoretically for distinguishing further 10 cestode species, predominantly from the family *Taeniidae* [86].

2.2.3.2 European brown hare syndrome

European brown hare syndrome (EBHS) is caused by a single-stranded RNA non-enveloped virus (EBHSV) belonging to the *Lagovirus* genus, family Caliciviridae, which induces a disease in the European brown hare similar to rabbit hemorrhagic disease (RHD) in rabbits, characterized by hemorrhages in several organs and liver necrosis. Despite EBHSV emergence was recognised in the 1980s in the north of Europe [46], Duff et al. [87] reported descriptions of lesions consistent with EBHS in hares since 1976 in England. In addition, Lenghaus et al. [88] revealed that hunters in Scandinavia knew of the disease in the early 1970s. Until now, EBHSV is restricted to Europe having been registered in the European hare in Sweden [46], Italy [89], the United Kingdom [87, 90], France [91], Poland [92], Greece [93], and Slovakia [94].

EBHS causes severe necrotic hepatitis in both wild and captive hares (European brown hares and mountain hares) [46, 93, 95]. The infection has significant similarities to RHD in its epidemiology, symptomatology, and pathology [93, 96], being characterized by rapid progression, mild nervous symptoms (including depression, muscular tremors, and incoordination), presence of sero-haemorrhagic liquid at the nostrils, congestion and extensive haemorrhages on the lungs and on serosa and mucosa, severe necrotic hepatitis, and congestion of the spleen and kidneys [90, 92, 93, 96].

Severe congestion of the trachea may also be present. Splenomegaly and dark red-black discoloration of the spleen, kidney congestion, and hepatomegaly may

also be present. Liver is usually friable and discolored [93, 97]. Death occurs within 3 days after the onset of clinical signs, and mortality rates are extremely high and can reach 100% [90, 92].

Microscopically, necrosis may affect the whole hepatic lobule or be confined to peripheral or periportal areas. Hepatocytes nucleus appear swollen and lytic or may have completely disappeared. Coagulation necrosis can occur. Periportal and mid-zonal hepatocellular necrosis is the most consistent histopathologic finding. Nuclear degradation appears to be rare in EBHS contrary to what happens in RHD. The hepatocytes frequently contain fine iron granules.

Other findings are marked hyperemia irregularly distributed over the hepatic lobule and disruption of sinusoids with hemorrhage. In the necrotic and hemorrhagic areas, neutrophil infiltration and mesenchymal cell proliferation are observed.

Moderate dilatation of segments of the proximal and distal tubules with flattened epithelium and focal hydropic degeneration of the proximal tubules may be present. The tubules can contain pale eosinophilic protein casts of a slightly granular appearance. Congestion of spleen red pulp has been described. White follicles can appear depleted of lymphocytes, with karyorrhexis or pyknosis of B and T cells. Follicular hyperplasia can also occur [93, 97].

As with other lagoviruses, EBHSV cannot be isolated or propagated in rabbit and hare primary cell cultures or in cell lines (RK-13, PK-15, FL) [46, 98, 99]. The virus can be detected usually in the liver, which contains high viral loads, by electron microscopy, which shows 30–35 nm virions indistinguishable from those of RHDV [90, 100]. Other methods for virus detection include the hemagglutination (HA) test, using human type "A" or "O" red blood cells [46, 100], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based methods [46, 90, 96, 98], and RT-PCR. Bascuñana et al. [99] developed two conventional RT-PCR assays for the detection and differentiation of RHDV and EBHSV, both able to detect as few as 10 copies of cloned viral genomic fragments, with no cross-amplification between the two viruses. The system can be used for amplification of VP60 genomic sequences from fresh and fixed tissues. Primers were selected from similar regions of the VP60 genes to amplify a fragment of 316 nucleotides from the genome of RHDV and a region of 265 nucleotides from the genome of EBHSV. In addition, Le Gall-Reculé et al. [101] developed an immunocapture (IC)-RT-PCR for EBHSV diagnosis that can be carried out directly with the liver exudate. Viral particles present in the sample are captured by specific antibodies immobilized on a microtitration plate. After enzymatic disruption of virus-antibody complexes, viral RNA is released and subjected to RT-PCR. The assay combines the rapidity of an ELISA test (because immunocapture and the RT reaction are carried out in the same microtiter plate) and the sensitivity of PCR, being suitable for the processing of large numbers of samples and phylogenetic studies. In 2011, Zexiao et al. [102] also developed a RT-PCR for the detection of EBHSV with good specificity and sensitivity, able to detect about 50 copies of cloned viral genomic fragments (pGM-T-EBHSV), with no amplifications for RHDV.

2.2.3.3 Rabbit hemorrhagic disease

RHD is caused by two types of lagoviruses, namely, RHDV that emerged in China in 1986 in domestic rabbits [103] and RHDV2 (RHDVb or GI.2), a virus genetically related to but distinct from RHDV, that emerged in France in 2010 in rabbits [104]. RHDV2 quickly replaced the circulating strains of RHDV in most European countries, both in the wild and domestic populations. In the Iberian hare, Lopes et al. [105] reported RHDV only in two animals during a retrospective study. However, in the last decade, several cases of RHDV2 disease have been reported in

the European hare in France (2013) [64], Spain (2014), and Italy (2012) [65], in the United Kingdom (2018 and 2019) [67], in Australia (2015) [106], in Sweden (2016 and 2017) [38], and in the Netherlands (2017) (https://www.dwhc.nl/en/haas-rhdv-2-nederland/). RHDV2 was also reported in the Cape hare on the island of Sardinia (2011) [63] and in the Italian hare, in Sicily (2012) [34]. More recently (in 2019), cases of RHDV2 infection have been reported in the Mountain hare in Scotland [107] and Ireland (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=31386).

However, RHDV2 infections have never been described in the Iberian hare.

The clinical evolution of RHD can be peracute, acute, subacute or chronic. The clinical manifestations are mainly present in the acute form of infection though in the subacute form, similar but milder signs can be observed. In the peracute form, usually there are no clinical signs of disease [108]. Chronic and subacute forms are more frequent in RHDV2 infections [109], which also differ from RHDV in affecting rabbit kits as young as 11 days old that develop disease [104, 109, 110].

The incubation period may vary between 1 and 5 days. Death may occur 12–36 hours after the onset of fever (>40°C). The clinical signs observed include prostration, apathy, convulsion, ataxia, paralysis, opisthotonos, paddling, anorexia, dullness, groans and cries, dyspnea, frothy and bloody nasal discharge, and cyanosis of mucous membranes. Subacute cases may present with malaise, mild anorexia, apathy, weight loss, and jaundice [108].

RHDV2-infected hares exhibited clinical signs and lesions similar to those induced by EBHSV [64–66]. Epistaxis and a RHD-like disease was reported in the Italian hare [34] and in the Sardinian Cape hare [63].

The macroscopic findings in hares affected by RHDV2 include extensor rigidity, epistaxis, and hyperemia of the tracheal mucosa, where a foamy bloody mucous can be found. The liver can be pale or congested (light brown to orange-pink) or presenting a reticular enhancement pattern suggestive of zonal vacuolar hepatocellular degeneration and necrosis. Moderated to severe congestion or petechial hemorrhages (or multifocal to coalescing hemorrhage) can also be observed in the lungs and kidneys.

Microscopic lesions may comprise generalized hepatic necrosis, including coagulative necrosis and multifocal areas of lytic necrosis. Acidophilic bodies may be observed in the hepatocytes. Other findings may include fatty degeneration of hepatocytes and periportal mononuclear infiltration. Degeneration and necrosis of kidney proximal tubules cells or acute tubular nephrosis may also be registered. In some cases, it is possible to observe moderated lymphocytolysis in the spleen white pulp, and moderate to severe fibrin deposition and necrosis of the red pulp can be observed [62–64, 66, 67].

Different molecular assays for the detection of RHDV have been described since the late 1990s, including conventional RT-PCR assays [99, 111–113], immunocapture RT-PCR [110], real-time multiplex RT-PCR [114], and more recently, loop-mediated isothermal amplification [115] and SYBR green-based real-time PCR [116]. None is designed to specifically detect RHDV2 strains.

For the amplification of RHDV2, Le Gall-Reculé et al. [109] described specific primers which amplify a 794-bp sequence located in the C-terminal of the gene encoding the VP60 of RHDV2.

Duarte et al. [117] developed a specific real-time TaqMan RT-PCR for the detection of RHDV2. The system was designed to amplify a 127-nucleotide-long RNA region located within the *vp*60 gene, being able to detect as few as 9 RNA molecules. The method has proven a valuable tool to diagnose most of RHDV2 circulating strains and useful to monitor viral loads [118], disease progression, and vaccination efficacy [119]. The system figures in the OIE Manual as a

recommended method for nucleic acid detection (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf). Nearly 5 years since it was developed, the method remains suitable for the detection of the circulating field strains [120].

More recently, Dalton et al. [121] developed a diagnostic real-time RT-PCR for the detection of RHDVb strains targeting a 91-bp amplicon within the VP60 protein that covers nucleotides (nts) 6190–6280. The RT-PCR is carried out as a duplex using the endogenous amplification control of the beta-actin gene from a commercial kit (EXOPOL S.L.). The same authors also designed a conventional RT-PCR for the differentiation of RHDV2 strains from RHDV2 recombinants by subsequent sequencing of the amplicon. Primers were designed to cover a 449-nt region from the 3′ region of the RHDV polymerase (3D) to the sg promoter region. Degenerate primers were designed to bind at positions 4837–4856 and 5266–5286 in the RHDV2 genome [121].

2.2.3.4 Myxomatosis

Myxomatosis, caused by a double-stranded DNA enveloped virus belonging to the family *Poxviridae*, genus *Poxvirus*, was for a long time considered a disease of rabbits. Only a few sporadic cases were reported in the European brown hare in Spain in 1953 [122], France in 1954 [123], and the United Kingdom in 2014 [124]. However, this scenario changed radically in 2018, when outbreaks of myxomatosis in Iberian hare occurred in Spain [125] and in Portugal [126] https://www. oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=Map FullEventReport&reportid=28628, causing an alarming wave of mortality in wild populations [68, 126].

The hare myxoma virus (MYXV) is a recombinant with additional genetic material in comparison with the MYXV from rabbits. The inclusion of this supplementary material led to the disruption of one gene and to the duplication of four others. While the origin of this recombinant is not yet completely understood, some authors have suggested that the extra genes originated from a capri- or cervipoxvirus [69, 70], and others propose the translocation of genes from the rabbit myxoma genome itself [70].

In rabbits, when the typical signs and skin lesions develop, the clinical diagnosis is possible. These signs may include blepharitis, blepharoconjunctivitis, anorexia, listlessness, fever, and depression. In the dermatrophic form of myxomatosis, disseminated cutaneous and mucocutaneous lesions, accompanied by oedema, are usually present in the eyelids, nose, lips, ears, and genitals (vulva, or scrotum). Emaciation and dyspnea followed by death may occur within a few weeks [127, 128]. However, in peracute forms, sudden death may occur with no clinical signs of disease or unspecific signals such as lethargy, loss of appetite, fever, and eventually swelling of the eyelids [129]. The clinical diagnosis of the atypical amyxomatous forms of myxomatosis, characterized by minor cutaneous signs and intense respiratory distress, may be complicated as well [127, 129–131].

In hares, as for rabbits, the clinical diagnosis relies on the observation of the typical skin lesions, namely, small nodules and oedema, usually present in the eyelids, nose, and genitalia. The typical myxomas observed in the ears, eyelid, or other areas of the skin in rabbits are rarely observed in hares (**Figure 9**). Blepharoconjunctivitis and mucopurulent eye discharge are a common feature [68, 69, 126].

MYXV-infected hares can show good body condition, contrary to what is common in rabbits with myxomatosis.

Histopathological findings include epidermal hyperplasia and balonization of the epidermal keratocytes. Eosinophilic cytoplasmic inclusion bodies may be observed in the keratinocytes. In the dermis, an abundant basophilic myxoid matrix



Figure 9.
Iberian hare positive to myxoma virus, with nodular formations in the lips (arrows) (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

admixed with oedematous areas with inflammatory infiltrates of macrophages, lymphocytes, and polymorphonuclear cells may also be seen (**Figure 10**). A severe depletion of lymphocytes may be noted in the spleen [68, 132, 133]. As for rabbits, the clinical diagnosis of the atypical form of the disease in hares may be limited.

Molecular methods provide the possibility to detect a reduced number of viral DNA copies in multiple tissue samples such as nasal and conjunctival swabs, skin oedema, myxomas, crusts, lungs, and semen. The highly conserved regions of the MYXV genome are used for primer design for PCR-based assays, allowing for detection of the circulating virus strains. Several conventional [134] and real-time PCR methods [135–137] were described and can be used to detect MYXV.

The conventional PCR system by Cavadini et al. [134] is based on the MYXV genes *M071L, M140R,* and *M142R/M144R*. Primers were designed for PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) protocols, enabling

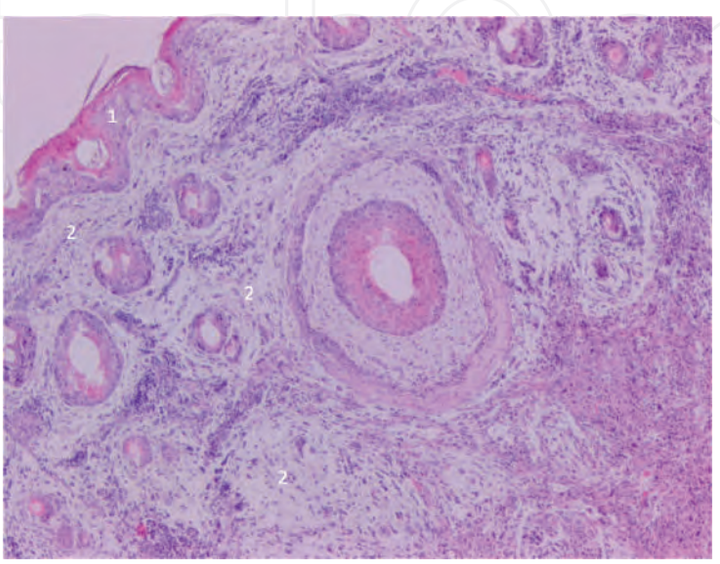


Figure 10.
Histopathology of the lip of an Iberian hare with myxomatosis showing moderate hyperplasia of the epidermis (1) and myxoid tissue in the dermis (2). HE, 40× (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

to discriminate vaccinated from naturally infected animals and to detect mixed infections caused by wild-type and vaccine MYXV strains.

Dalton et al. [138] developed a long-range PCR-RFLP method directed towards amplification of genomic MYXV DNA from the left and right terminal inverted repeat regions (TIRs) with subsequent differentiation of virus strains by RFLP. Two sets of primers were designed covering the entire TIRs and flanking sequences (*M009L* gene and genome regions from *M141R* to *M156R*). This method proved to be efficient in the identification of mutations, with potential application in phylogenetics.

Quantitative PCR systems (qPCR) allow the determination of viral copy number in the tested sample. In the PCR-based method developed by Albini et al. [136], primers and probe were designed to amplify a 147-bp fragment of the serpin (*Serp2*) gene, allowing the detection limit of 23 genome copies of MYXV DNA per reaction.

The TaqMan qPCR by Belsham et al. [135] that targets a *M029L* gene of MYXV was designed for detection and confirmation of suspected cases of myxomatosis. The assay detects efficiently as few as 10 copies of MYXV DNA, per reaction, while not producing amplification signals for other poxviruses.

A highly sensitive qPCR assay targeting nucleotide sequences within the MYXV gene *M000.5L/R* was developed by Duarte et al. [137]. This gene has two copies in the MYXV genome, in the right and left TIR, respectively. Hence, when compared to other PCR protocols targeting virus genes present in a single copy, this method shows a significantly higher sensitivity while enabling the detection of 2.6 genome copies of MYXV DNA per reaction. Furthermore, the *M000.5L/R* is a unique gene in the *Leporipoxvirus* genome [139] increasing the specificity of this PCR-based system. The method figures in the OIE Manual as a recommended method for nucleic acid detection (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_MYXO.pdf).

The systems described by Cavadini et al. [134] and Duarte et al. [137] were successfully used to detect the recombinant MYXV obtained from hares (*our results unpublished*).

For many years, the laboratorial diagnosis of myxomatosis was based on the isolation of the virus in cell culture. Isolation of MYXV can be accomplished in primary cultures of rabbit kidney (RK) cells or in cell lines (RK-13, Vero). This method is recommended by the OIE, particularly for the diagnosis of amyxomatous form of the disease. In this case, antemortem diagnosis can be done using nasal and conjunctival swabs [140].

The virus multiplies in the cytoplasm of the infected cells [141, 142]. For the classical MYXV strains from rabbits, a cytopathic effect (CPE) may develop in 24–48 hours or take up to 1 week, depending on the virulence of the strain [143]. CPE is usually characterized by the formation of syncytia and roundup and contraction of the infected cells. Later, when all cells are affected, the cell monolayer detaches completely.

Viral isolation of the Iberian hare recombinant MYXV strains is more difficult since CPE is less obvious, differing from the one induced by the rabbit MYXV strains.

2.2.3.5 Leporid herpesvirus

Recently a new leporid herpesvirus (LeHV-5) was detected by PCR [144] and electron microscopy in Iberian hares [132].

Herpesvirus DNA was detected in hares with myxomatosis, where, in most cases, herpetic-like skin vesicles were present in the nostrils and lips along with necrosis of the genitalia, most evident in males affecting the penile glans but also observed in females (**Figure 11**) [132].

However, LeHV-5 DNA was also detected in apparently healthy hares, testing negative to MYXV, probably representing the latent stage of infection.



Figure 11.
Small vesicle in the lips of an Iberian hare positive to herpesvirus (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

The penile and foreskin epithelia of some LeHV-5 positive hares was mostly necrotic and replaced by a thick band of necrotic cells, heterophils, and red blood cells. Severe heterophilic infiltrations of the stroma, in either a diffuse pattern or multifocal aggregates, are common.

Proliferation of pleomorphic spindle cells is observed, with some nuclei almost completely filled with slightly eosinophilic inclusion bodies, resembling Cowdry nuclear inclusions [132]. Coalescent intraepidermal and subepidermal vesicopustules filled with fibrin and necrotic cell debris and multifocal detachment of the eyelids, lips, and foreskin epidermis were seen (**Figure 12**) [132]. In the dermis, multifocal hemorrhages, intense infiltration by heterophils, and necrotic cells with accumulation of chromatin debris were present [132].

Clinical diagnosis of this disease is difficult and may pass unnoticed. During lytic replication (reactivation phase), small vesicles may be observed in the mucous membranes and skin, which may still be intact, or after erosion, mainly in the lips

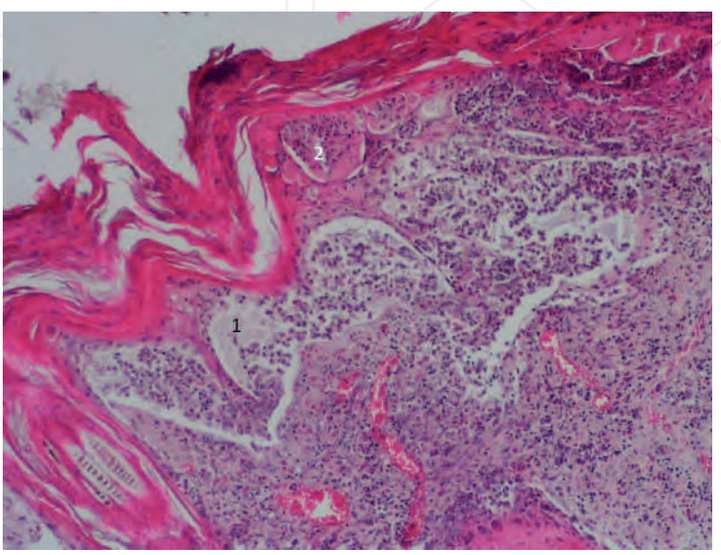


Figure 12.
Subepidermal vesicular-pustular lesion with detachment of the epidermis (1) and intradermal vesicular-pustular lesion (2), from a herpesvirus positive Iberian hare. HE, 100× (photograph by the INIAV I.P. Pathology team).

and nostrils. Necrosis of the genitalia may not be present. The conclusive diagnosis is achieved by PCR and sequencing or by electron microscopy.

2.3 Excessive predation

Predation can have a major impact on hare populations since, unlike the wild rabbit, hares generally do not burrow, except when subjected to high persecution pressure and without alternative escape, and are therefore more exposed to this phenomenon. The hares' natural predators include large birds of prey and wild canids and felids [29]. In fact, the Iberian hare is the preferred prey of some Iberian vertebrate predators, such as the Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) [145].

Some carnivorous bird species that can prey on hares have shown a progressive increase on the Iberian Peninsula. This is the case of the white stork (*Ciconia ciconia*) that between 1984 and 2004 showed a considerable increase in breeding numbers, as exposed by the number of occupied nests which increased about 401% in that period [146]. Furthermore, the number of wintering storks increased from 1187 individuals in 1995 to 14,434 in 2015 [147]. Large flocks of storks are presently found in many areas of mainland Portugal (**Figure 13**). The Eurasian or common magpie (*Pica pica*) is another omnivorous bird that may prey young hares [148].

The wild boar (*Sus scrofa*), a mammalian omnivore and one of the most widespread wildlife species which has entered a stage of continuous growth in Europe and could even be considered a pest species [149], can also have a potentially devastating impact on hare populations due to the easy predation of juvenile hares [150]. An increase in juvenile mortality reduces the recruitment of new individuals to populations, affecting their renewal.

2.4 Hunting pressure

Extrinsic factors threatening the conservation of hare populations include reduced size and quality of the habitat, which is particularly critical for hare species whose territories are restricted to very limited geographical areas, such as the northern Castroviejoi broom hare, in Spain, and the Italian hare, in Italy. In these small territories, excessive hunting pressure can pose a serious threat to the preservation of these species [5, 7].

In addition, the imbalance of the complex Iberian trophic chains resulting, among other aspects, from the reduction of wild rabbit populations, increases predation on hares by predators that preferentially feed on wild rabbit [31, 32].



Figure 13.
Flock of Skorts, Alentejo, 15th March 2020 (Photograph by Fábio Abade dos Santos).

2.5 Other causes

The mechanization of cereal harvesting was recognized as a cause of direct mortality of juvenile hares by their exposure on the soil surface. Also, the effect of pollution resulting from agricultural chemicals, agricultural and forest effluents [1], and road traffic pose additional threats to the species [10].

3. Sanitary surveillance of the Iberian hare in Portugal

In Portugal, an action plan to control rabbit viral hemorrhagic disease was set in place in August 2017 by a nine-institution partnership, following the Dispatch 4757/17 of May 31 of the Ministry of Agriculture. This partnership is comprised of the National Institute of Agrarian and Veterinary Research (INIAV. PI), the General Directorate of Food and Veterinary (DGAV), the Institute for Nature Conservation and Forests (ICNF), the Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources (CIBIO), the Institute for Experimental Biology and Technology (iBET), the Portuguese first sector hunting organizations (FENCAÇA, ANPC, CNCP), and the National Order of Veterinary Doctors (OMV). Since its implementation from August 2017 to the end of January 2020, 1507 wild leporids originating from almost 50 hunting reserves where sampled and systematically tested for the presence of RHDV, RHDV2, and MYXV to assess the population health during the hunting seasons. Of these, 89.93% (1099/1222) were wild rabbits, and 10.07% (123/1222) were hares. Furthermore, during the same period, 285 animals found dead in the field in mainland Portugal were also screened, of which 77.54% (221/285) corresponded to wild rabbits and 22.46% (64/285) were hares.

Hunting associations are authorized by permits emitted by the National Forest Authority, Institute for Nature Conservation and Forests (ICNF).

Below we present the virological examinations regarding the Iberian hare. Despite RHDV2 being detected in several hare species, none of the 187 hares investigated in Portugal between August 2017 and the end of January 2020 were positive, confirming the lack of susceptibility of Iberian hare to this virus.

As in domestic and wild rabbits, where RHDV has no longer been detected in Portugal since the emergence of RHDV2 in 2012, RHDV-RNA was not detected in Iberian hares [151].

MYXV was first detected in Portugal in October 2018 in an adult hare, found dead in a hunting reserve, located in the district of Évora, Alentejo Region, in the south mainland. The virological diagnosis was made by the National Reference Laboratory for Animal Diseases (INIAV, Oeiras, Portugal) in October 2018.

The first evidence of Iberian hare mortality by myxomatosis was noticed in early summer of 2018, in Spain. The affected hares showed clinical signs compatible with myxomatosis and were found dead or moribund in hunting reserves in the municipalities of Montalbán and La Rambla (Córdoba), in the south. The diagnosis was confirmed by the Central Veterinary Laboratory in Algete, Madrid, Spain in July 2018 (OIE report).

Before the detection of the first MYXV case in the Iberian hare in Portugal, within the scope of the national surveillance action plan as referred above, 91 hares where sampled and screened for the presence of MYXV, between August 2017 and end of October 2018. None of the animals tested positive, suggesting that the virus was not circulating in the populations sampled. After the first case, by the end of October 2018 until the end of January 2020, 107 Iberian hares were tested for MYXV, 58.88% (63/107) of which were found dead or moribund and 41.12% (44/107) were legally hunted. In the first group, 82.54% (52/63) animals were positive for myxomatosis, reflecting the significance of this infection as a cause of death in Iberian hares.

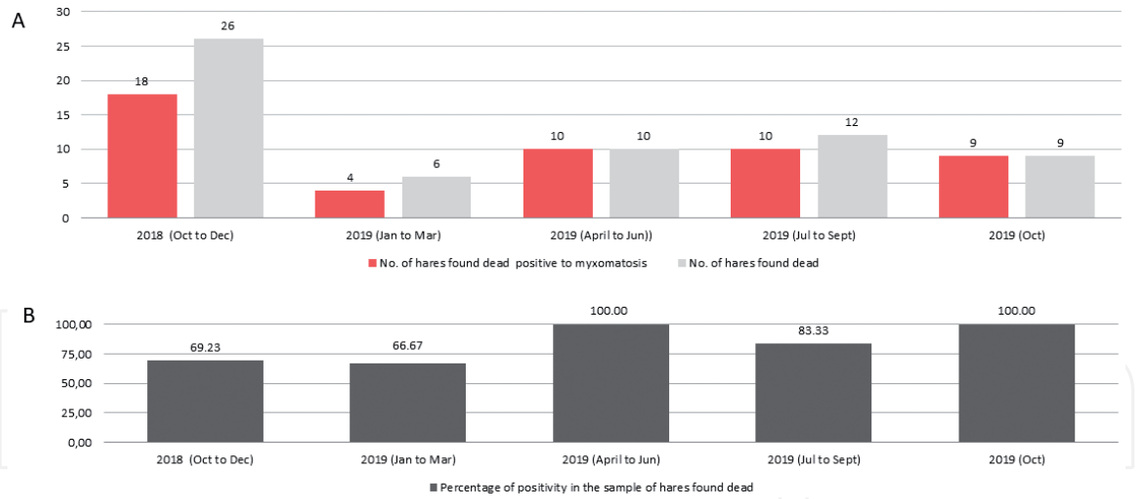


Figure 14.
Results of the surveillance of myxoma virus in 63 Iberian hares found dead in continental Portugal between October 2018 and October 2019, by trimester (A). Percentage of positivity in the same sample (B).

The percentage of positivity in the sample of hares found dead by trimester showed an increasing trend, suggesting the progressive spread of the disease (**Figure 14**).

In the group of 44 hunted animals, only 4 were positive (9.1%). Most of these samples (n = 39, 86.4%) were collected during the 2018–2019 hunting season. The small sample gathered during the 2019–2020 hunting season (n = 6, all collected in October 2019) does not allow to predict the trend of positivity for this group.

Since the non-recombinant rabbit MYXV is endemic in the entire national territory, our results suggest that the Iberian hare is not susceptible to the rabbit strains. However, serological data obtained from Iberian hares shows the presence of antibodies against RHDV2 and myxoma virus indicating the ability of these viruses to induce an immune response [151].

4. Conclusions

The progressive loss of habitat due to the deep changes in land use, excessive predation, and hunting poses serious threats to the conservation of hare species in Europe.

The development of effective strategies that trigger the continuous implementation of good practices is urgent to ensure the preservation of wild populations and to promote their recovery in the most affected areas. Such measures should safeguard the persistence/existence of favorable habitats for the species, particularly threatened in the geographical areas where their natural territories are reduced or in areas where farmers adopted super-intensive production methods.

In Portugal and in Spain, government research institutions, academics and field agents joined efforts through projects +Coelho and MIXolepus, respectively, to evaluate and counteract the effects of this emergent virus in Iberian hare.

At a time when the conservation status of the wild rabbit has recently been revised from "least concern" to "endangered," it seems inevitable that, in a near future, the status of some hare species, namely, the Iberian hare, will also be revised.

Apprehension on the preservation and sustainability of wild leporid populations in the Iberia is aligned with the concerns of many other wild species. According to the World Wildlife Fund (WWF) "Living Planet Report 2018" report, global wildlife populations have declined by an average of 60% over the past 40 years, demonstrating that the planetary biodiversity is threatened.

Infectious diseases, particularly those of viral etiology, have been gaining importance as disrupting factors for the stability of rabbits and hares. The potential evolution of the viral *hemorrhagic* disease virus (RHDV) to RHDV2 and the recent emergence of a recombinant myxoma virus, able to specifically infect hares, showed that these viruses were capable to alter their initial host specificity, acquiring the ability to infect some hare species, with very expressive morbidity and mortality rates. Furthermore, the recent detection of a new herpesvirus in Iberian hares, associated with genital pathology, raises addition concerns to the future of this species.

Acknowledgements

The authors thank all the hunters who participated in the collection of biological samples, represented by João Carvalho (ANPC), Jacinto Amaro (FENCAÇA), and Fernando Castanheira Pinto (CNCP). Funding was supported by Fundo Florestal Permanente (Government of Portugal) within the scope of the action plan for the control of rabbit viral hemorrhagic disease (+Coelho 2 project nº 2018044300001 - Desenvolvimento e implementação de medidas práticas impulsionadoras da recuperação dos leporídeos silvestres em Portugal - financed by the Fundo Florestal Permanente (FFP), Dispatch nº4757/2017 of 31st May) by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (grant SFRH/BD/137067/2018) and by the Interdisciplinary Research Centre on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL) (Project UID/CVT/00276/2013).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91876

IntechOpen

Author details

Margarida D. Duarte[1,2*], Carina L. Carvalho[1], Fábio Abade dos Santos[1,2,3], Jéssica Monteiro[1], Madalena Monteiro[4], Paulo Melo Carvalho[4], Paula Mendonça[4], Patrícia Tavares Santos[5] and Pedro C. Melo[5]

1 National Institute of Agrarian and Veterinarian Research, Virology Laboratory, Oeiras, Portugal

2 Interdisciplinary Research Centre on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL), Portugal

3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain

4 National Institute of Agrarian and Veterinarian Research, Pathology Laboratory, Oeiras, Portugal

5 General Directorate of Food and Veterinary, Epidemiology and Animal Health Unit, Lisbon, Portugal

*Address all correspondence to: margarida.duarte@iniav.pt

IntechOpen

© 2020 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. CC BY

References

[1] Soriguer R, Carro F. *Lepus granatensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41306A29531952019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.20191.RLTS.T41306A2953195.en (downloaded on 24 January 2020)

[2] Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F. Harris DJ, Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003;**27**:70-80

[3] Smith AT, Johnston CH. *Lepus timidus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T11791A451771982019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T11791A45177198.en (downloaded on 24 January 2020)

[4] Paupério J. Ecologia de lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) num Ecossistema de Montanha—Distribuição espacial, abundância e dieta de duas populações do Parque Natural da Serra da Estrela [Masters thesis]. Porto, Portugal: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2003

[5] Ballesteros F, Smith AT. *Lepus castroviejoi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T11797A5039082019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T11797A503908.en (downloaded on 24 January 2020)

[6] Hacklander K, Schai-Braun S. *Lepus europaeus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41280A451874242019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T41280A45187424.en (downloaded on 24 January 2020)

[7] Randi E, Riga F. *Lepus corsicanus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41305A29529542019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T41305A2952954.en (downloaded on 24 January 2020)

[8] Johnston CH, Robinson TJ, Child MF, Relton C. *Lepus capensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41277A451867502019. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T41277A45186750.en (downloaded on 24 January 2020)

[9] Chapman JA, Flux JEC. Chapter 1: Introduction and overview of the lagomorphs. In: Chapman JA, Flux JEC, editors. Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action Plan. Gland, Switzerland: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources; 1990. pp. 1-13

[10] Purroy FJ. Liebre ibérica—*Lepus granatensis*. In: Salvador A, Cassinello J, editors. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2011. Available from: http://www.vertebradosibericos.org/

[11] Smith AT, Johnston CH, Alves PC, Hackländer K, editors. Pikas, Rabbits and Hares of the World. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2018. LCCN 2017004268; ISBN: 9781421423401 (hardcover);ISBN: 1421423405 (hardcover); ISBN: 9781421423418 (electronic); ISBN: 1421423413 (electronic)

[12] de la Calzada E, Martínez FJ. Requerimientos y selección de hábitat de la liebre mediterrânea (*Lepus granatensis*) en un paisaje agrícola mesetario. Ecología. 1994;**8**:381-394

[13] López JMA, Hernández FJ, Purroy Y, Robles JL. Datos sobre la biología de la reproducción de la liebre Ibérica (*Lepus granatensis*) en agrosistemas cerealistas de la provincia de León (NW de España). Revista Florestal. 1996;**9**(1):49-60

[14] Duarte J. Liebre ibérica (*Lepus granatensis* Rosenhauer, 1856). Galemys. 2000;**12**:3-14

[15] Palacios F. Biometric and morphologic features of the species of the genus *Lepus* in Spain. Mammalia. 1989;**53**:227-263

[16] Marboutin E, Péroux YR. Some aspects of the spatial distribution of hares (*Lepus europaeus*) at night. Gibier Faune Sauvage. 1999;**16**(2):143-158

[17] Péroux R. Le lièvre d'Europe. Bulletim Mensusel de l'Office National la Chasse. 1995;**204**:1-96

[18] Chapman JA, Flux JEC, editors. Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action Plan. 1990. IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group. IUCN/SSC Action Plans for the Conservation of Biological Diversity; Imprint: Gland: IUCN; 1990. ISBN: 2-8317-0019-1

[19] Holley AJF. The daily activity period of the brown hare (*Lepus europaeus*). Mammalian Biology. 2001;**66**:357-364

[20] Lovegrove B. Fires of Life. Endothermy in Birds and Mammals. New Haven, CT: Yale University Press; 2019

[21] JEC F. Reproductive strategies in the genus *Lepus*. In: Myers K, MacInnes CD, editors. Proceedings of the World Lagomorph Conference. Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph; 1981. pp. 155-174

[22] Roellig K, Goeritz F, Fickel J, Hermes R, Hofer H, Hildebrandt TB. Superconception in mammalian pregnancy can be detected and increases reproductive output per breeding season. Nature Communications. 2010;**1**:78. DOI: 10.1038/ncomms1079

[23] Holley AJ, Greenwood PJ. The myth of the mad March hare. Nature (London). 1984;**309**:549-550

[24] Alves PC, Gonçalves H, Santos M, Rocha A. Original investigation reproductive biology of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, in Portugal. Mammalian Biology. 2002;**67**:358-371. DOI: 10.1078/1616-5047-00051

[25] Parker SP. Grzimek's Encyclopedia of Mammals. New York: McGraw Hill Publishing Company; 1990

[26] Fernandez A, Soriguer R, Castien E, Carro F. Reproduction parameters of the Iberian hare *Lepus granatensis* at the edge of its range. Wildlife Biology. 2008;**14**:434-443. DOI: 10.2981/0909-6396-14.4.434

[27] Farfán MA, Vargas JM, Real R, Palomo LJ, Duarte J. Population parameters and reproductive biology of the Iberian hare Lepus granatensis in southern Iberia. Acta Theriologica. 2004;**49**(3):319-335

[28] Corbet GB. A review of classification in the family Leporidae. Acta Zoologica Fennica. 1983;**174**:11-15

[29] Taylor M. The Way of Hare. England: Bloomsbury Natural History, Bloomsbury Publishing Plc; 2017. p. 288. ISBN: 9781472909893

[30] BirdLife International 2019. *Aquila adalberti*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T22696042A152593918. 10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T22696042A152593918.en (downloaded on 12 February 2020)

[31] Gortazar C, Millán J, Acevedo P, Escudero MA, Marco J, de Luco DF. A large-scale survey of brown hare *Lepus europaeus* and Iberian hare *L. granatensis* populations at the limit of their ranges. Wildlife Biology. 2007;**13**:244-250. DOI: 10.2981/0909-6396(2007)13[244:ALSOBH]2.0.CO;2

[32] Acevedo P, Melo-Ferreira J, Real R, Alves PC. Past, present and future distributions of an Iberian endemic, *Lepus granatensis*: Ecological and evolutionary clues from species distribution models. PLoS One.

2012;**7**(12):e51529. DOI: 10.1371/journal.pone.0051529. [Epub: 13 December 2012]

[33] Francisco CARRO Ramón C. SORIGUER. Long-term patterns in Iberian hare population dynamics in a protected area (Doñana National Park) in the southwestern Iberian Peninsula: Effects of weather conditions and plant cover. Special subsection: Animal Behavior and Ecology. 2016. 10.1111/1749-4877.12212

[34] Marboutin E, Bray Y, Péroux R, Mauvy B, Lartiges A. Population dynamics in European hare: Breeding parameters and sustainable harvest rates. Journal of Applied Ecology. 2003;**40**:580-591. DOI: 10.1046/j.1365-2664.2003.00813.x

[35] Carro F, Beltrán JF, Pérez JM, Márquez FJ, Iborra O, Soriguer YRC. Dinámica Poblacional de la Liebre ibérica (*Lepus granatensis*) en el Parque Nacional de Doñana. Segovia: Resúmenes IV Jornadas SECEM; 1999. p. 20

[36] Voigt U, Siebert U. Living on the edge—Circadian habitat usage in pre-weaning European hares (*Lepus europaeus)* in an intensively used agricultural area. PLoS One. 2019;**14**(9):e0222205. DOI: 10.1371/journal.pone.0222205

[37] Duarte MD, Carvalho CL, Bernardo B, Barros SV, Benevides S, Flor L, et al. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. Infection, Genetics and Evolution. 2015;**35**:163-171. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.005. [Epub: 04 August 2015]

[38] Carvalho CL, Silva S, Gouveia P, Costa M, Duarte EL, Henriques AM, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016-2017). Virus Genes. 2017;**53**(6):922-926. DOI: 10.1007/s11262-017-1483-6. [Epub 21 June 2017]

[39] Brown LJ, Rosatte RC, Fehlner-Gardiner C, Bachmann P, Ellison JA, Jackson FR, et al. Oral vaccination and protection of red foxes (*Vulpes vulpes*) against rabies using ONRAB, an adenovirus-rabies recombinant vaccine. Vaccine. 2014;**32**(8):984-989. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.12.015. [Epub: 24 December 2013]

[40] Maresch C, Lange E, Teifke JP, Fuchs W, Klupp B, Müller T, et al. Oral immunization of wild boar and domestic pigs with attenuated live vaccine protects against Pseudorabies virus infection. Veterinary Microbiology. 2012;**161**(1-2):20-25. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.07.002. [Epub: 10 July 2012]

[41] Wobeser G. Disease management strategies for wildlife. Revue Scientifique et Technique. 2002;**21**(1):159-178

[42] Bárcena J, Morales M, Vázquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, et al. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. Journal of Virology. 2000;**74**:1114-1123

[43] Martín-Alonso JM, Castañón S, Alonso P, Parra F, Ordás R. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. Transgenic Research. 2003;**12**:127-130

[44] Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. Journal of Virology. 1990;**64**:4013-4015

[45] Carvalho CL. The role of wild leporids as reservoirs of infectious agents [PhD thesis]. Portugal: University of Évora; 2017. p. 431.

[46] Gavier-Widén D, Mörner T. Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 1991;**10**:453-458

[47] Wibbelt G, Frölich K. Infectious diseases in European Brown hare (*Lepus europaeus*). Wildlife Biology in Practice. 2005;**1**(1):86-93

[48] Lukešová D, Langrová I, Vadlejch J, Jankovská I, Hlava J, Válek P, et al. Endoparasites in European Hares (*Lepus europaeus*) Under Gamekeeping Conditions in the Czech Republic. Košice: Institute of Parasitology, SAS; 2012

[49] Diakou A, Sokos C, Papadopoulos E. Endoparasites Found in European Brown Hares (*Lepus europaeus*) Hunted in Macedonia, Greece. Research Note. Košice: Institute of Parasitology, SAS; 2014

[50] Kornaś S, Wierzbowska IA, Wajdzik M, Kowal J, Basiaga M, Nosal P. Endoparasites of European brown hare (*Lepus europaeus*) from southern Poland based on necropsy. Annals of Animal Science. 2014;**14**(2):297-305

[51] Carvalho CL, Zé-Zé L, Lopes de Carvalho I, Duarte EL. Tularaemia: a challenging zoonosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2014;**37**(2):85-96. DOI: 10.1016/j.cimid.2014.01.002. [Epub: 13 January 2014]

[52] Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. Eurosurveillance. 2013;**18**(30):20541

[53] Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, Barandika JF, Respicio-Kingry LB, Garcia-Amil C, et al. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. Ticks Tick Borne Diseases. 2016;**7**(1):159-165. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.009. [Epub: 19 October 2015]

[54] Martín C, Gallardo MT, Mateos L, Vián E, García MJ, Ramos J, et al. Outbreak of tularaemia in Castilla y León, Spain. Eurosurveillance. 2007;**12**(11):E071108.1. DOI: 10.2807/esw.12.45.03302-en

[55] Gyuranecz M, Erdélyi K, Makrai L, Fodor L, Szépe B, Mészáros AR, et al. Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). Journal of Comparative Pathology. 2011;**145**(1):1-5. DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.11.013

[56] Schantz PM, Cruz-Reyes A, Colli C, Lord RD. Sylvatic echinococcosis in Argentina. I. On the morphology and biology of strobilar *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic animal hosts. Tropenmedizin und Parasitologie. 1975;**26**(3):334-344

[57] Craig P, Mastin A, van Kesteren F, Boufana B. *Echinococcus granulosus*: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. Veterinary Parasitology. 2015;**213**(3-4):132-148. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.07.028

[58] Chaignat V, Boujon P, Frey CF, Hentrich B, Müller N, Gottstein B. The brown hare (*Lepus europaeus*) as a novel intermediate host for *Echinococcus multilocularis* in Europe. Parasitology Research. 2015;**114**(8):3167-3169. DOI: 10.1007/s00436-015-4555-3

[59] Magistrali CF, Cucco L, Pezzotti G, Farneti S, Cambiotti V, Catania S, et al. Characterisation of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from animals with yersiniosis during 1996-2013 indicates the presence of pathogenic and Far Eastern strains in Italy. Veterinary Microbiology, 166. 2015;**180**:161. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.08.020

[60] Fratini F, Verin R, Ebani VV, Ambrogi C, Bertelloni F, Turchi B, et al. Experimental infection with *Yersinia pseudotuberculosis* in European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.

2017;**10**(3):285-291. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.03.008

[61] Stancampiano L, Ravagnan S, Capelli G, Militerno G. Cysticercosis by *Taenia pisiformis* in Brown hare (*Lepus europaeus*) in Northern Italy: Epidemiologic and pathologic features. The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2019;**9**:139-143. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.04.004

[62] Camarda A, Pugliese N, Cavadini P, Circella E, Capucci L, Caroli A, et al. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). Research in Veterinary Science. 2014;**97**:642-645. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.10.008

[63] Puggioni G, Cavadini P, Maestrale C, Scivoli R, Botti G, Ligios C, et al. The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). Veterinary Research. 2013;**44**:96. DOI: 10.1186/1297-9716-44-96

[64] Le Gall-Reculé G, Lemaitre E, Bertagnoli S, Hubert C, Top S, Decors A, et al. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Veterinary Research. 2017;**48**(1):70. DOI: 10.1186/s13567-017-0473-y

[65] Velarde R, Cavadini P, Neimanis A, Cabezón O, Chiari M, Gaffuri A, et al. Spillover events of infection of brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European Brown Hare Syndrome-*like* disease in Italy and Spain. Transboundary and Emerging Diseases. 2017;**64**(6):1750-1761. DOI: 10.1111/tbed.12562

[66] Neimanis AS, Ahola H, Larsson Pettersson U, Lopes AM, Abrantes J, Zohari S, et al. Overcoming species barriers: An outbreak of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (*Lepus timidus*). BMC Veterinary Research. 2018;**14**(1):367. DOI: 10.1186/s12917-018-1694-7

[67] Bell DJ, Davis JP, Gardner M, Barlow AM, Rocchi M, Gentil M, Wilson RJ. Rabbit haemorrhagic disease virus type 2 in hares in England. The Veterinary Record. 2019. Jan 26;184(4):127-128. DOI: 10.1136/vr.l337.

[68] García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, Dalton KP, Caballero-Gómez J, Agüero M, et al. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*). Transboundary and Emerging Diseases. 2019;**66**(6):2204-2208. DOI: 10.1111/tbed.13289

[69] Águeda-Pinto A, Lemos de Matos A, Abrantes M, Kraberger S, Risalde MA, Gortázar C, et al. Genetic characterization of a recombinant myxoma virus in the Iberian hare (*Lepus granatensis*). Viruses. 2019;**11**(6). pii: E530. DOI: 10.3390/v11060530

[70] Dalton KP, Martín JM, Nicieza I, Podadera A, de Llano D, Casais R, et al. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. Transboundary and Emerging Diseases. 2019;**66**(6):2218-2226. DOI: 10.1111/tbed.13296

[71] Jones A, Pybus MJ. Taeniasis and echinococcosis. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA, editors. Parasitic Diseases of Wild Mammals. Ames, USA: Iowa State University Press; 2001. pp. 150-192

[72] Contreiro J. Prevalência de Taenia pisiformis/Cysticercus pisiformis em três zonas de caça do Baixo Alentejo [MSc thesis]. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Faculdade de Medicina Veterinária Lisboa; 2014

[73] Helminths SEJL. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. Baltimore: Williams and Wilkins; 1968

[74] Graham-Brown J, Gilmore P, Harcourt-Brown F, Eastham H, Williams D. Veterinary Record Case Reports. 2018. Published Online First. DOI: 10.1136/vetreccr-2018-000634

[75] Hallal-Calleros C, Morales-Montor J, Orihuela-Trujillo A, Togno-Peirce C, Murcia-Mejía C, Bielli A, et al. *Taenia pisiformis* cysticercosis induces decreased prolificacy and increased progesterone levels in rabbits. Veterinary Parasitology. 2016;**229**:50-53. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.09.015

[76] Alzaga V, Vicente J, Villanua D, Acevedo P, Casas F, Gortazar C. Body condition and parasite intensity correlates with escape capacity in Iberian hares (*Lepus granatensis*). Behavioral Ecology and Sociobiology. 2008;**62**:769-775

[77] Harcourt-Brown FM. Infectious diseases of domestic rabbits. In: Textbook of Rabbit Medicine. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2001. p. 363

[78] Saunders RA, Rees-Davies R. Notes on Rabbit Internal Medicine. Oxford: Blackwell; 2005. pp. 146-147

[79] Varga M. The rabbit-friendly practice. In: Meredith A, Lord B, editors. BSAVA Manual of Rabbit Medicine. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2014. p. 66

[80] Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. The Biology of the Laboratory Rabbit. 2nd ed. London: Academic Press Limited. ISBN: 0-12-469235-4

[81] Van Praag, E. Cysticercosis and Hydatid Echinococcosis, Dangerous Parasitic Larval Forms in Rabbits. 2015

[82] Shield JM, Heath DD, Smyth JD. Light microscope studies of the early development of *Taenia pisiformis* cysticerci. International Journal for Parasitology. 1973;**3**(4):471-480. DOI: 10.1016/0020-7519(73)90042-8

[83] Khalil A, Noor El Din S, Radwan N, et al. Cysticercus pisiformis: Ultrastructural transformation of the tegument during development from oncosphere to cysticercus. Parasitologists United Journal. 2014;**7**:13

[84] Solomon SG. Some points in the early development of cysticercus pisiformis (Bloch 1780). Journal of Helminthology. 1934;**12**:197-204

[85] Heath DD. The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. International Journal for Parasitology. 1971;**1**:145-152. DOI: 10.1016/0020-7519(71)90008-7

[86] Boubaker G, Marinova I, Gori F, Hizem A, Müller N, Casulli A, et al. A dual PCR-based sequencing approach for the identification and discrimination of *Echinococcus* and *Taenia* taxa. Molecular and Cellular Probes. 2016;**30**(4):211-217. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.05.004

[87] Duff JP, Whitwell K, Chase D. The emergence and epidemiology of European brown hare syndrome in the UK. In: Proc, 1st International Symposium on Caliciviruses ESVV, Reading, UK. 1997. pp. 176-181

[88] Lenghaus C, Studdert MJ, Gavier-Widden D. Calicivirus infections. In: Williams ES, Barker IK, editors. Infectious Disease of Wild Mammals. 3rd ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 2001. pp. 280-291

[89] Scicluna MT, Lavazza A, Capucci L. European brown hare syndrome in northern Italy: Results of a virological and serological survey. Revue Scientifique et Technique.

1994;**13**(3):893-894. DOI: 10.20506/rst.13.3.801

[90] Chasey D, Lucas M, Westcott D, Williams M. European brown hare syndrome in the UK: A calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits. Archives of Virology. 1992;**124**(3-4): 363-370. DOI: 10.1007/bf01309816

[91] Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, Portejoie Y, Rasschaert D. Molecular epidemiology of European brown hare syndrome virus in France between 1989 and 2003. Archives of Virology. 2006;**151**(9):1713-1721. DOI: 10.1007/s00705-006-0754-7. [Epub: 07 April 2006]

[92] Frölich K, Meyer HH, Pielowski Z, Ronsholt L, von Seck-Lanzendorf S, Stolte M. European brown hare syndrome in free-ranging hares in Poland. Journal of Wildlife Diseases. 1996;**32**(2):280-285. DOI: 10.7589/0090-3558-32.2.280

[93] Billinis C, Knowles NJ, Spyrou V, Sofianidis G, Psychas V, Birtsas PK, et al. Genetic analysis of the first European Brown hare syndrome virus isolates from Greece. Wildlife Biology in Practice. 2005;**1**(2):118-127. DOI: 10.2461/wbp.2005.1.14

[94] Frölich K, Fickel J, Ludwig A, Lieckfeldt D, Streich WJ, Jurcik R, et al. New variants of European brown hare syndrome virus strains in free-ranging European brown hares (*Lepus europaeus*) from Slovakia. Journal of Wildlife Diseases. 2007;**43**(1):89-96

[95] Syrjälä P, Nylund M, Heinikainen S. European brown hare syndrome in free-living mountain hares (*Lepus timidus*) and European brown hares *(Lepus europaeus*) in Finland 1990-2002. Journal of Wildlife Diseases. 2005;**41**(1):42-47. DOI: 10.7589/0090-3558-41.1.42

[96] Capucci L, Scicluna MT, Lavazza A. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. Revue Scientifique et Technique. 1991;**10**:347-370

[97] Fuchs A, Weissenböck H. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). Journal of Comparative Pathology. 1992;**107**(1):103-113

[98] Wirblich C, Meyers G, Ohlinger VF, Capucci L, Eskens U, Haas B, et al. European brown hare syndrome virus: Relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. Journal of Virology. 1994;**68**(8):5164-5173

[99] Ros Bascuñana C, Nowotny N, Belák S. Detection and differentiation of rabbit hemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by amplification of VP60 genomic sequences from fresh and fixed tissue specimens. Journal of Clinical Microbiology. 1997;**35**(10):2492-2495

[100] Duff JP, Chasey D, Munro R, Wooldridge M. European brown hare syndrome in England. The Veterinary Record. 1994;**134**(26):669-673. DOI: 10.1136/vr.134.26.669

[101] Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Portejoie Y, Le Gall G. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and European Brown Hare Syndrome viruses. Journal of Virological Methods. 2001;**97**(1-2):49-57. DOI: 10.1016/s0166-0934(01)00336-6

[102] Zexiao Y, Lirui L, Yin W, Xueping Y, Xueqing H, Zengqi Y, et al. Development of a RT-PCR for the detection of European brown hare syndrome virus. Advanced Materials Research. 2011;**271-273**:410-416

[103] Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Qian NH. A new viral disease of rabbits. Animal Husbandry & Veterinary Medicine. 1984;**16**:253-255

[104] Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. The Veterinary Record. 2011;**168**:137-138. DOI: 10.1136/vr.d697

[105] Lopes AM, Marques S, Silva E, Magalhães MJ, Pinheiro A, Alves PC, et al. Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): Earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. Veterinary Research. 2014;**45**:94. DOI: 10.1186/s13567-014-0094-7

[106] Hall RN, Peacock DE, Kovaliski J, Mahar JE, Mourant R, Piper M, et al. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. The Veterinary Record. 2017;**180**(5):121. DOI: 10.1136/vr.104034

[107] Rocchi M, Maley M, Dagleish M, Boag B. Rabbit haemorrhagic disease virus type 2 in hares in Scotland. The Veterinary Record. 2019;**185**(1):23. DOI: 10.1136/vr.l4481

[108] World Organisation for Animal Health (OIE) Technical Disease Cards. Rabbit Haemorrhagic Disease. Aetology, Epidemiology, Diagnosis, Prevention and Control References. 2015. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RHD.pdf

[109] Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. Veterinary Research. 2013;**44**:81. DOI: 10.1186/1297-9716-44-81

[110] Dalton KP, Nicieza I, Balseiro A, Muguerza MA, Rosell JM, Casais R, et al. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. Emerging Infectious Diseases. 2012;**18**:2009-2012. DOI: 10.3201/eid1812.120341

[111] Guittré C, Baginski I, Le Gall G, Prave M, Trepo C, Cova L. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. Research in Veterinary Science. 1995;**58**:128-132. DOI: 10.1016/0034-5288(95)90065-9

[112] Tham KM, Barnes SM, Hunter SN. Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. Virus Genes. 1999;**18**(3):235-242. DOI: 10.1023/a:1008020303036

[113] Yang L, Wang F, Hu B, Xue J, Hu Y, Zhou B, et al. Development of an RT-PCR for rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and the epidemiology of RHDV in three eastern provinces of China. Journal of Virological Methods. 2008;**151**:24-29. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.003

[114] Gall A, Hoffmann B, Teifke JP, Lange B, Schirrmeier H. Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. Veterinary Microbiology. 2007;**120**(1-2):17-32. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.10.006

[115] Yuan D, Guo D, Liu J, Si C, Jiang Q, Lin H, et al. Development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method for detection of rabbit hemorrhagic disease virus. Journal of Virological Methods. 2013;**187**:274-277. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.11.020

[116] Niedzwiedzka-Rystwej P, Hukowska-Szematowicz B, Dzialo J, Tokarz-Deptula B, Deptula W. Real time PCR detection of rabbit haemorrhagic disease virus in rabbits infected with different European strains of RHDV. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2013;**16**:39-43. DOI: 10.2478/pjvs-2013-0006

[117] Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). Journal of Virological Methods. 2015;**219**:90-95. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.03.017

[118] Carvalho CL, Duarte EL, Monteiro M, Botelho A, Albuquerque T, Fevereiro M, et al. Challenges in the rabbit haemorrhagic disease 2 (RHDV2) molecular diagnosis of vaccinated rabbits. Veterinary Microbiology. 2017;**98**:43-50. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.006

[119] Carvalho CL, Duarte EL, Monteiro JM, Afonso C, Pacheco J, Carvalho P, et al. Progression of rabbit haemorrhagic disease virus 2 upon vaccination in an industrial rabbitry: A laboratorial approach. World Rabbit Science. 2017;**25**:73-85

[120] Carvalho CL, Abade dos Santos F, Fagulha T, Duarte MD. The aptitude of the specific RT-qPCR method used for RHDV2 detection: *In silico* analysis. In: Poster. Wildlife Summit—Game Manegement, 28 and 29 of June, 2019. Oeiras, Portugal

[121] Dalton KP, Arnal JL, Benito AA, Chacón G, Martín Alonso JM, Parra F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. Journal of Virological Methods. January 2018;**251**:118-122. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.10.009

[122] Lucas A, Bouley G, Quinchon C, Tocas L. La myxomatose du lievre. Bulletin de l'Office International des Epizooties. 1953;**39**:770-776

[123] Jacotot H, Vallee A, Virat B. Sur un cas de myxomatose chez le lievre. Annales del'Institut Pasteur. 1954;**86**:105-107

[124] Barlow A, Lawrence K, Everest D, Dastjerdi A, Finnegan C, Steinbach F. Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. The Veterinary Record. 2014;**175**(3):75-76. DOI: 10.1136/vr.g4621

[125] OIE. Myxomatosis. Spain. 2018. Available from: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?fupser=&dothis=&reportid=27539

[126] Carvalho CL, Abade dos Santos FA, Monteiro M, Carvalho P, Mendonça P, Duarte MD. First cases of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) Veterinary Record Case Reports (Portugal). 2020. DOI: 10.1136/vetreccr-2019-001044 [Accessed: 13 April 2020]

[127] Stanford MM, Werden SJ, McFadden G. Myxoma virus in the European rabbit: Interactions between the virus and its susceptible host. Veterinary Research. 2007;**38**(2):299-318. DOI: 10.1051/vetres:2006054. [Epub: 13 February 2007]

[128] Kerr PJ, Liu J, Cattadori I, Ghedin E, Read AF, Holmes EC. Myxoma virus and the Leporipoxviruses: An evolutionary paradigm. Viruses. 2015;**7**(3):1020-1061. DOI: 10.3390/v7031020

[129] Bertagnoli S, Marchandeau S. Myxomatosis. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 2015;**34**(2):549-556

[130] Marlier D, Vindevogel H. Poxless myxomatosis—Isolation of three strains in Belgium. Annales de Médecine Vétérinaire. 1996;**140**:343-346

[131] Marlier D, Mainil J, Linde A, Vindevogel H. Infectious agents associated with rabbit pneumonia: Isolation of amyxomatous myxoma virus strains. The Veterinary Journal.

2000;**159**(2):171-178. DOI: 10.1053/tvjl.1999.0413

[132] Abade dos Santos FA, Monteiro M, Pinto A, Carvalho CL, Peleteiro MC, Carvalho P, et al. First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. PLoS One. 2020;**14**:1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0231795

[133] Dinev I. An outbreak of myxomatosis in rabbits in bulgaria clinicomorphological studies. Trakia Journal of Sciences. 2012;**10**(1):79-84. Available from: http://www.uni-sz.bg

[134] Cavadini P, Botti G, Barbieri I, Lavazza A, Capucci L. Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. Vaccine. 2010;**28**:5414-5420. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.017

[135] Belsham GJ, Polacek C, Breum SØ, Larsen LE, Bøtner A. Detection of myxoma viruses encoding a defective M135R gene from clinical cases of myxomatosis; possible implications for the role of the M135R protein as a virulence factor. Virology Journal. 2010;**7**:7-17. DOI: 10.1186/1743-422X-7-7

[136] Albini S, Sigrist B, Güttinger R, Schelling C, Hoop RK, Vögtlin A. Development and validation of myxoma virus real-time polymerase chain reaction assay. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2012;**24**:135-137. DOI: 10.1177/1040638711425946

[137] Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, Fagulha MT, Ramos F, Luís T, et al. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. The Journal of Virological Methods. 2014;**196**:219-224. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.11.014

[138] Dalton KP, Ringleb F, Martín Alonso JM, Parra F. Rapid identification of myxoma virus variants by long-range PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Virological Methods. 2009;**161**:284-288. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.06.026

[139] Willer DO, McFadden G, Evans DH. The complete genome sequence of Shope (rabbit) fibroma virus. Virology. 1999;**264**:319-343. DOI: 10.1006/viro.1999.0002

[140] OIE (World Organisation for Animal Health) Terrestrial Manual 2018. Chapter 3.6.1. Myxomatosis. Available from: http://www.oie.int/en/international-standardsetting/terrestrial-manual/access-online/

[141] Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: Sixth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. Vienna: Springer Verlag; 1995 (Supplement 10). pp. 586

[142] Scherrer PR. Morphogenese *et* ultrastructure de virus fibromateux de Shope. Pathology and Microbiology. 1968;**3**:129-146

[143] Joubert L. La Myxomatose T.II. Série: Les Maladies Animales à Virus. Paris, France: L'Expansion éditeur; 1973

[144] VanDevanter DR, Warrener P, Bennett L, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1996;**34**(7):1666-1671

[145] Lourenço RF. The food habits of Eurasian eagle-owls in Southern Portugal. The Journal of Raptor Research. 2006;**40**:297-300

[146] Rosa G, Encarnação V. The white stork in Portugal: Results of the 2004 National Census. Lisbon, Portugal:

NABU-Bundesverband; 2013. Available from: https://bergenhusen.nabu.de/imperia/md/nabu/images/nabu/einrichtungen/bergenhusen/portugal_zensus_2004.pdf

[147] Catry I, Encarnação V, Pacheco C, Catry T, Tenreiro P, da Silva LP, et al. Recent changes on migratory behaviour of the White stork (*Ciconia ciconia*) in Portugal: Towards the end of migration? Airo. 2016/2017;**24**:28-35

[148] Jennings N. RSPB Spotlight Hares. England: Bloomsbury Natural History, Bloomsbury Publishing Plc; 2017. pp. 128. ISBN-10: 1472933648; ISBN-13: 978-1472933645

[149] Veličković N, Ferreira E, Djan M, Ernst M, Obreht Vidaković D, Monaco A, et al. Demographic history, current expansion and future management challenges of wild boar populations in the Balkans and Europe. Heredity (Edinb). 2016;**117, 5**:348-357. DOI: 10.1038/hdy.2016.53

[150] Schley L, Roper TJ. Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. Mammal Review. 2003;**33**(1):43-56 (Printed in Great Britain)

[151] Duarte M, Carvalho CL, Santos FA, Gomes J, Alves PC, Esteves PJ, et al. "+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral". Relatório de atividades na época venatória 2017-2018. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF. 2018. pp. 280

Anexo VII-I

Divulgação em Revistas de Internacionais com Arbitragem Cientifica

Wildlife Biology 2019: wlb.00588
doi: 10.2981/wlb.00588
© 2019 The Authors. This is an Open Access article
Subject Editor: Christian Sonne. Editor-in-Chief: Ilse Storch. Accepted 14 August 2019

Blood collection from the external jugular vein of *Oryctolagus cuniculus algirus* sedated with midazolam: live sampling of a subspecies at risk

Fabio A. Abade dos Santos, Carina L. Carvalho, M. Conceição Peleteiro, Sofia Isabel Gabriel, Rui Patrício, João Carvalho, Mónica V. Cunha and Margarida D. Duarte

F. A. Abade dos Santos, (https://orcid.org/0000-0002-0696-7322) ✉ (faas@fmv.ulisboa.pt) and M. C. Peleteiro, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Univ. de Lisboa, Av. da Universidade Técnica, PT-1300-477 Lisbon, Portugal. – FAAS, C. Carvalho, M. V. Cunha and M. D. Duarte, Inst. Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Laboratório de Virologia, Oeiras, Portugal. – S. I. Gabriel, CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Depto de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Univ. de Lisboa, Lisbon, Portugal. – R. Patrício, AllPets-Clínica Veterinária de Tires, Lisbon, Portugal. – J. Carvalho, Associação Nacional de Proprietários e Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade (ANPC), Lisbon, Portugal.

In the last decades, the European wild rabbit, particularly the *Oryctolagus cuniculus algirus*, a keystone species in the Iberian Peninsula ecosystems, declined severely, raising concerns from the wildlife authorities. The hunting calendar in Portugal limits sampling collection to a narrow window of few months annually. Nevertheless, governmental wildlife protection laws allow live rabbit sampling for population and sanitary evaluations. The aim of this study is to adjust blood collection protocols from the external jugular vein (EJV) described for domestic rabbits to the wild rabbit. Collection of peripheral blood is problematic in the wild rabbit given its small body size and the reduced calibre of vessels but mostly its nervous disposition and fragility. We describe in detail a procedure for EJV blood collection in 30 wild rabbits after sedation with midazolam. Emphasis is given to protocol adjustments for wild rabbit. Heart rate, respiratory rate and body temperature were assessed before sedation, after sedation but before collection and after blood collection. Sedation onset took on mean (SD) 8 ± 2 min. The technique allowed the collection at least 1 ml of blood, a satisfactory volume for routine laboratory testing. The differences observed in heart and respiratory rates before and after blood collection were not statistically significant, indicating that no cardiorespiratory interference occurred due to venepuncture. Recovery from sedation took on mean (SD) 17 ± 2 min. All animals were set free during the first hour after blood collection. This work aims to demonstrate that blood collection under sedation is a safe and feasible procedure in wild rabbits when practiced by experienced veterinarians. At no time, whatsoever, was the physiological homeostasis at risk and no injuries were inflicted on the animals. To our knowledge this report constitutes the first guided description of blood collection from the EJV in sedated *O. c. algirus* and the first collection of physiological parameters measured under different conditions.

Keywords: blood collection, external jugular vein, *Oryctolagus cuniculus*, sampling live animals, sanitary surveillance, venepuncture, wild rabbit

The European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus 1758) is a small herbivorous mammal belonging to the *Leporidae* family of the *Lagomorpha* order whose main morphologic, biologic and physiologic characteristics are summarized in Table 1.

The wild rabbit is a keystone species in Mediterranean ecosystems of Iberian Peninsula in which the preservation of many vulnerable and threatened mammals and bird species depend on. Moreover, the rabbit has an important role in habitat modulation, due to its digging activity, selective plant ingestion, seed dispersal and soil fertilization, supporting the growth of typical vegetation (Willott et al. 2000, Virgós et al. 2005) and indirectly contributing for the diversity of soil invertebrate community.

In 2008, the International Union for Conservation of Nature (IUCN) rated *O. cuniculus* species as near threatened (NT), following its progressive decline in Europe since 1950, reaching 95% reductions. The most important factors behind the wild rabbit decline are the loss of habitat due to fragmentation and intensive farming, anthropogenic activities (Ward 2005) and the emergence of viral diseases in the 20th century (Delibes et al. 2000). Confinement of

This work is licensed under the terms of a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY) <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The license permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

Table 1. Morphological, biological and physiological data from wild rabbits.

Parameters		Available information	References
Morphological	head–body length (adults)	34–50 mm	Macdonald and Barrett 1993
	rabbit fur	mixed brown-grey fur coat, of yellowish tones in the occipital region and legs, and whitish belly and white inner short tail	La Fuente 1993, Gálvez-Bravo 2017
	others	black lateral eyes and long ears though smaller than those of hares. Strong hind legs are more developed than the front ones, allowing them to sprint in jumps and zigzags	
Biological	reproduction season	annual (depending of clime and resource availability)	Bell and Webb 1991
	litter size	3–6 kittens, which leave the warren in under a month[$]	Gibb and Williams 1990
	sexual maturity	♂ 4 months; ♀ 3.5 months	Macdonald and Barrett 1993
	lifespan	♂ max 8.7 years; ♀ max 7.7 years	Macdonald and Barrett 1993, Von Holst et al. 1999
Physiological	body temperature	38.5–39.5°C (101.3–103.1°F)	Patrick et al. 1994
	fasting metabolic rate	750 kcal m^{-2} body surface area	Patrick et al. 1994
	respiratory rate	30–60 breaths per minute*	O'Malley 2005
	heart rate	180–250 per minute	O'Malley 2005
	water intake per day	50–150 ml kg^{-1}	Cizek 1961
	urine	alkaline (pH 7.6–8.8), specific density: 1.003–1.036, normally cloudy	Patrick et al. 1994

[$] 3/4 of young rabbits are killed by predators before they establish a territory (Gibb 1990, Angulo 2004). Annual mortality of general population was 30% in a studied island (Macdonald and Barrett 1993).
* At rest, rabbit breath mainly using muscular contractions of the diaphragm, with reduced movements of the rib cage. Artificial respiration can be provided moving the rabbit from a head-up to head-down position 45 times per minute (Patrick et al. 1994).

O. cuniculus algirus subspecies to a few restricted geographic locations (including the south–west of the Iberian Peninsula, the Atlantic islands and Morocco) makes its surveillance and recovery even more urgent.

Reverting the recent abrupt decrease of wild rabbit populations due to highly virulent pathogens, such as rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and myxoma virus (MYXV), requires disease surveillance programmes to assist and support sustainable management of this wild species. Like Myxomatosis, Rabbit haemorrhagic disease is endemic in some countries, including Portugal, occurring in the mainland (Abrantes et al. 2013), autonomous regions (Duarte et al. 2015, Carvalho et al. 2017) and the islands such as the small Berlengas archipelago (Abade dos Santos et al. 2017). Regarding our team, the need for the development a blood collection protocol emerged/was identified during a study conducted in the Berlengas archipelago to investigate haemoparasites and viruses in the local rabbits (Abade dos Santos et al. 2017).

Due to the difficulty in capturing and sampling live specimens without causing great stress, monitoring of wild rabbit populations is usually carried out in biological samples collected from legally hunted rabbits' cadavers. Collections are therefore limited to the hunting season, or dependent on dead animals found in passive surveillance. Furthermore, in areas where the rabbit populations are extremely low, hunting is often suspended to accelerate recovery, precluding sampling.

However, longitudinal serological surveys have proven crucial to evaluate wild rabbit population's immune status as well as to provide a dynamic view on the pathogen–host evolution and population equilibrium. Blood samples allow not only serologic investigations but also culture and/or direct examination for bacteria, viruses and some parasites.

In domestic rabbits, selection of the blood collection method depends on the animals' behaviour, amount of blood needed, frequency of sampling and whether the animal's survival is required or not. Blood can be withdrawn from the marginal ear veins, central ear artery, cephalic vein and lateral saphenous vein. Domestic rabbits have also large paired external jugular veins (EJV, vena jugularis externa), which are often the preferred venepuncture site under sedation or when a larger amount of blood is required (Nelson et al. 2010). The external jugular vein is formed behind the angle of the mandible, passing backward in a superficial position to the superior thoracic aperture (Nelson et al. 2010), and the work zone for blood sampling is the ventral surface of the neck.

Despite the animal's clinical condition must always be considered, a general rule of thumb is that it is safe to take up a maximum of 1 ml per 100 g bodyweight (Ramer et al. 1999), i.e. 1% (v/w) of bodyweight. All non-terminal blood collection carried out without fluids replacement is limited up to 10% of total circulating blood volume in healthy, normal, adult animals on a single occasion and collection may be repeated only each three to four week. Deep sedation of rabbits is sometimes required for adequate restraint, evaluation and minor procedures (Cantwell 2001).

Contrarily to domestic rabbits, blood sampling in wild rabbits poses serious difficulties due to the extremely nervous nature of the species and innate instinctual fear of humans, causing great stress that may lead to the onset of diseases or even to sudden death (Mullan and Saunders 2018). In wild rabbits, it is very important that handling stress and pain inflicted during blood collection are reduced to a minimum. In addition, the small size of wild rabbit and consequent reduced vessel diameter further complicates peripheral blood collection. The cephalic veins are difficult to locate and hold off and while the lateral saphenous vein is easier to locate it has a very small diameter, making the collection of an adequate blood sample difficult (Graham 2006). Furthermore, hematoma, bruising, vessel thrombosis and skin sloughing

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

can also occur due to the vessels reduced diameter and the use of ear veins is not recommended in this species (Graham 2006). In juveniles, the blood sampling technique is even harder to perform.

When collecting a blood sample from wild rabbits, cautions must be taken regarding the animal as well as the handler. Clinical fragilities inherent to wild rabbits include risk of heart attack, dehydration and bone fracture. The knowledge of the physiological parameters of this species is critical (Table 1). As to the handler, when the animal is picked up without the appropriate support of the body and hindquarters, their very sharp claws may inflict painful scratches which easily become infected (Varga 2014). Nevertheless, claws should not be cut off as they are important in rabbits' movements and digging ability. Bites can equally result in skin and soft tissue infection.

Several parenteral anaesthetic protocols for rabbits and rodents, either for research or in pet clinics, are described in literature (Cantwell 2001). Furthermore, many anaesthetics dosages referenced for the rabbit have been developed for use in the laboratory rabbit which is, generally, a robust animal that has been bred to be pathogen free (Borkowski and Karas 1999).

The available anaesthetic protocols, usually designed for clinical purposes, need to be adapted to wildlife/free-living animals. Benzodiazepines, including diazepam, midazolam and zolazepam, are muscle relaxants that act centrally, producing excellent relaxation, reducing muscle spasms and spasticity (Muir et al. 2000), while not inducing muscle paralysis (Flecknell 1987). Sedation induced by this group of drugs is very marked in rabbits and rodents (Flecknell 1987) despite not producing a true anaesthetic state, as awareness persists with relaxation even at high dosages, or any analgesic effect.

Midazolam causes minimal hemodynamic and respiratory changes and is often chosen over diazepam for its water solubility which allows mixing it with other water-soluble substances in a single syringe (Henke et al. 2005). It is also more effective that diazepam (Longley et al. 2008) and has a shorter duration of action (Flecknell 1984). For diagnostic procedures, the use of intramuscular or intravenous midazolam has been recommended due to its short acting sedation (Ramer et al. 1999).

To our knowledge, and from the published bibliography, collecting blood from the EJV from wild rabbits is not used routinely because requires experience, training and a solid knowledge of the anatomy and relative dimensions of the wild rabbit. On the other hand, this work somewhat demystifies the idea that sedation, handling and blood sample of large volumes in small mammals is risky in the field and reinforces the importance of longitudinal study of populations of small mammals, many of them at risk of extinction.

In this work, we describe an EJV blood collection procedure in wild rabbits, based on the protocol described by Nelson et al. (2010) and taking into account the idiosyncrasies of this wild species, under sedation with midazolam, which has proven to be a safe and effective technique for blood sampling in this species under field conditions and allows the collection of a substantially high volume of blood without clotting or haemolysis.

Material and methods

Animals

A total of thirty wild rabbits (12 males and 18 females; 16 adults and 14 juveniles) were analysed in this study. Pregnant females were not used. Animals were captured in Aldeia Gavinha (n = 14) and Quinta dos Penedinhos (n = 9), two reproduction centres for *Oryctolagos cuniculus algirus* near Lisbon, and in two hunting reserves in Alentejo, Herdade das Romeiras (n = 2) and Vila Nova de Mil Fontes (n = 5).

The study took place between December 2017 and February 2018 and was carried out within the scope of the Action Plan for the Control of the rabbit haemorrhagic disease (Dispatch no. 4757/2017 of 31 May from the Portuguese Ministry of Agriculture, Forests and Rural Development) and +Coelho project funded by Fundo Florestal Permanente.

No animals were sacrificed for the purposes of this specific study and all procedures were performed and monitored by veterinarians. The data of all animals will be available from the Dryad Digital Repository.

Capture method

The 23 wild rabbits bred in semi-captivity, originating from Lisbon, were caught with painless lever traps, using vegetables and fruit as bait. Traps were checked every 2 h during the day and every 7 h at night. After capture, the animals were kept at maximum 8 h at constant temperature (20°C) and humidity (65%) as well as in the recommended area per animal described in the literature (Buil et al. 2004) with good ventilation. The five freedom rules recommended by the World Veterinary Association (Seamer 1993), were followed as much as possible, namely water and food ad libitum, no infliction of unnecessary pain and stress, and release to nature as fast as possible. Animals originating from the same colony were maintained in groups with only one male per cage and separated according to age. All boxes and bags were used by a group and one animal respectively, on each day of procedure. At the end, boxes were washed with pressurized and warmed water and then sprayed with 5% sodium hypochlorite for decontamination and used after a minimum of two weeks. The bags were washed at 80°C. Animals from the same colony were kept in the same box during the procedure, after clinical evaluation to ensure that they were not sick. The issue of transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV2) or myxomatosis was considered of minor importance since all animals used were vaccinated.

The five rabbits originating from the hunting reserve in Vila Nova de Milfontes were captured with ferrets, according to the Portuguese legislation (Decree Law no. 202/2004 of 18-08-2004, article 85) and kept in the same conditions. Between data assessments, animals were kept in suspended dark fabric bags, allowing them to keep calm and breathe normally.

Clinical evaluation

Animals were manipulated in situ. The animals were handled using clothing that covered the sleeves to minimize the risk of bite and scratch. Cotton gloves covered by nitrile or latex

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

gloves were used, the latter being changed between different animals.

The rabbits' physical condition was classified as physical status I, according to the American Society of Anaesthesiology criteria (ASA).

Animals were weighed (with a precision of 50 g) to calculate the sedative dose, and their physical condition and body length were assessed. Other morphological parameters (head, ear and tarsus length) were also registered. Given the good body condition of all animals, those weighing less than 900 g were considered juveniles and those with equal or greater weight considered adults.

Heart rate was measured with a pulse oximeter and ECG apparatus (monitor Cygnus 80E vet) designed for veterinary use. The pulse oximeter probe was placed on the lip and the ECG clips in the left and right anterior limbs and left posterior limb according to manufacturer's instructions. Shallow ECG clips were used to avoid skin damage and to minimize animal disturbance. A 70% ethanol spray was used to deflect the hair and remove the oil from the skin allowing full contact with the electrodes. Respiratory rate was determined by observation of the animals' thoracic movements and by auscultation with a stethoscope. Body temperature was measured with a digital thermometer (with a precision of ±0.01°C) on the rectal mucosa.

Parameters were taken before sedation (BS), after sedation and before collection (BC) and after collection (AC). Time of sedation onset and of recovery were registered.

Sedation protocol

Because wild rabbits are easily stressed and small, therefore more difficult to contain and bleed, both juveniles and adults were sedated. Sedation was performed by intramuscular (longissimus and iliocostalis muscles) administration of midazolam at a dosage of 1 mg kg^{-1}, a protocol that provides moderate sedation.

A specific antagonist, flumazenil, was available to reversed sedation if necessary at a dose of 0.01–0.1 mg kg^{-1} IV (Flecknell 1987, Gargiulo et al. 2012).

The method we used to contain the animal was adapted to the idiosyncrasies of wild rabbit protocol described by Nelson et al. (2010). Approaching the rabbit inside the transport boxes was made slowly and precisely. The handler grasped the rabbit through the skin of the back immediately behind the neck (Fig. 1A). A good area of skin was hold with the dominant hand to immobilize the animal allowing sedative administration.

After the onset of sedation, the handling approach was the same described above. With the non-dominant hand, the lumbar region of the animal is secured to prevent vertebral injuries and minimize limb movements (Fig. 1A). With a smooth and continuous movement, the animal's body was inverted to a lateral (Fig. 1B) and finally dorsal decubitus position without ever removing the support from the lumbar and cervical zones (Fig. 1C). The hind limbs of the animal were kept between the body and the medial face of the restrainers' arm (Fig. 1D).

Relaxed members (Fig. 1B) indicated that the animal was well restrained and stress-free. The pressure of the dominant hand on the skin of the back is never released so that the animal does not have the impetus to try to dodge. This pressure, as well as pressure under the abdomen and hind limbs, must be especially firm during venepuncture.

Venepuncture procedure

A rubber elastic (Fig. 1F) was placed caudally to the venipuncture site, precisely in the entrance of the chest, thus promoting venous distension of the EJV allowing a better visualization. The elastic was positioned by the person holding the animal, or by a third person, to apply pressure laterally, only on the selected EJV avoiding pressuring the trachea. The EJV veins appear blue in colour and are found around the caudal end of the mandible (Fig. 1E).

A sprayer with 70% ethanol was used to clean the skin and evidence EJV. Considering the size of the rabbits utilized in this study and their individual characteristics, needles with 25G×5/8″ (0.5×16 mm) or 26G×1/2″ (0.45×12 mm) were used as well as a 1 mL syringe. No more than 3–4 mm of needle was inserted in the cephalocaudal direction (front to back) into the blood vessel, as recommended by Parasuraman et al. (2010), and blood slowly withdrawn to avoid the collapse of the vessels (Fig. 1F). To facilitate the insertion of the needle into the vein the needle can be folded about 5–10° using the needle cap. To facilitate/enable a better visualization of the EJV, or whenever blood sampling is to be repeated, clipping the fur on the area may be recommended (Fig. 1E). All animals used in this study were not sheared except the one used for demonstrating the procedure as shown in Fig. 1E.

Finger pressure was applied for 1–3 min after the needle's removal to stop bleeding (Parasuraman et al. 2010, Boyle 2016). After the procedure, the area was disinfected with a 5% chlorhexidine solution. To avoid unwanted cooling of the animals, we developed a thermostat-regulated infrared lamp heating box with an internal temperature of 20°C, where animals could recover their body temperature faster, whenever necessary (Fig. 2). Animals were released into their source colony when the effect of sedation was no longer evident.

For monitoring the animals' recovery, relying on individual identification, the rabbits originating from Aldeia Gavinha (District of Torres Vedras) were marked with an inactivated calcium carbonate solution at both their ear tips, on medial and lateral sides. This compound is inert to the animal's skin, allowing temporary marking visualization in both coloured and black and white photographs, disappearing over time.

For monitorization of a subset of wild rabbits (those caught at reproduction centers), night (with black light) and day monitoring cameras were installed, and the animals were observed for five days. Wheat and corn were scattered next to the cameras to attract the animals.

Genetic assessment

In order to assess the taxonomic status of the animals obtained during this study from the different sampling origins and confirm they belonged to the subspecies *O. c. algirus*, a genetic analysis was carried out, allowing the distinction from the subspecies *O. c. cuniculus* (including domestic breeds).

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

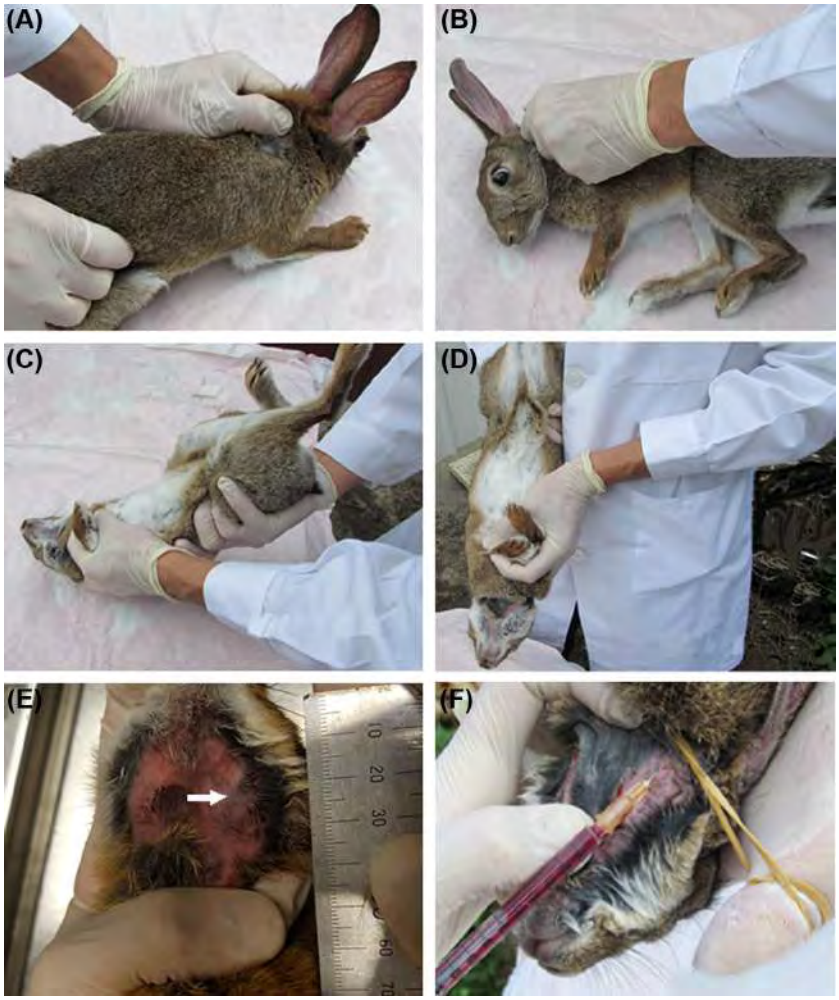


Figure 1. Sequence of procedures for containment and presentation of the animal for blood collection. First approach (A), lateral decubitus (B), dorsal decubitus (C), presentation of the animal for blood collection (D), visualization of external jugular vein (E) and blood collection (F). The arrow indicates the beginning of the external jugular vein. Cranially at this point are the linguofacial and retromandibular veins.

During handling, a small ear biopsy was obtained from a subset of the captured rabbits (n = 12) and kept in 96% ethanol until further analysis. Additionally, samples from five domestic rabbits were obtained for comparative purposes. Genomic DNA was extracted using the EZNA DNA purification kit (Omega) following the manufacturer's guidelines. Two molecular markers were amplified via PCR to infer the taxonomic status of the analysed rabbits: the mitochondrial control region and the first intron of the coagulation factor IX (F9) gene (X chromosome). Obtained sequences were compared with those published in public databases for subspecies inference. The details of the protocol are not revealed in this study because they are not within its scope.

Statistical analysis

Initially, an exploratory analysis of the data was performed using syntax Proc univariate, Proc means and Proc freq of SAS 9.4 software (2013) in order to characterize the different variables included/considered in this study. The research of extreme outliers was investigated, whenever they were below the lower outer fence or above the upper outer fence. Extreme outliers were only found in the temperature measurement and were not removed due to small sample size and clustering. Values biologically non-logical (e.g. heart or



Figure 2. Recovery of body temperature in a box with infrared light heating regulated by thermostat.

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

respiratory rate outside the physiologically possible range) were also searched for but were not found. The data for the response variables (heart rate, respiratory rate and temperature) was assessed for normality by observing the QQ plots and running the Shapiro–Wilk normality test. The heart and respiratory rates showed no normal distribution ($p < 0.05$) so logarithmic transformation of these data was performed. To evaluate the evolution of the response variables over the three measurement moments: 1) before sedation (BS), 2) after sedation but prior venepuncture (BC) and 3) after venepuncture (AC), the SAS 9.4 PROC MIXED was used. A confidence interval of 95% (p-value <0.05 significant) was considered.

Results

Morphological parameters

The mean and standard deviations values for the morphological parameters collected from all animals (weight and body length, as well as head, ear and tarsus dimensions) are shown in Table 2. The p-values were obtained with t-test for equality of means after confirmation of equality of variances assumed by the Levene test.

Onset and recovery of sedation

The mean time for the onset of sedation occurred within 7.6 ± 1.9 min after intramuscular administration of midazolam, as determined by the reaction to handling (calmer and more permissive). There was no reaction to sedative administration.

On mean ± SD, 17.3 ± 2.2 min after sedation, all animals had recovered fully from sedation without the need of antagonist use. Animals were considered recovered from sedation when there was an escape reaction to handling. Altogether, restraint, disinfection and blood collection procedure took an mean (SD) 45 ± 20.5 s.

Blood sampling

The sedation and handling method described here allowed the collection of 1 ml of blood in all of animals, without clot formation. There were no sudden movements of animals that jeopardized their integrity and no major haemorrhage or hematomas were seen. The visualization of the vein was performed with relative ease and the collection performed without need of repetition of the puncture.

Physiological parameters variation

t-test for comparing group means did not reveal differences between the juvenile and adult physiological parameters, except for respiratory rate after venepuncture ($p < 0.05$). Because the value of F was smaller and significantly superior to 0.05, equal variance of data between the two groups may be assumed. So, data from the two groups of animals (juvenile and adults) were analysed together for greater statistical robustness.

The heart rate, respiratory rate and temperature were generally higher in the group of animals captured with ferrets (Table 3), although the statistical significance was not tested given the of the subsample. As expected, heart rate decreased with sedation in mean 45 beats per minute ($p < 0.0001$) but remained stable during the venepuncture procedure. On mean, after venepuncture, the heart rate decreased in adults by 6–57 bpm, while in juveniles a slight increase of this parameter was observed. In fact, 15 animals (50% of the sample) showed an increase in heart rate during the venepuncture procedure. Of these, 40% were adults and 60% juveniles.

The same was not observed for respiratory rate and rectal temperature. Respiratory rate remained relatively stable throughout the whole procedure although there was a decrease on the mean values obtained at the beginning and at the end of the method of 7 bpm ($p = 0.0066$). Neither sedation nor venepuncture caused statistically significant changes to the baseline respiratory rate. The variation registered upon sedation ranged between a reduction of 32 bpm to an increase of 24 bpm. Increase in the respiratory rate was observed in 10 animals (30% adults and 70% juveniles). Regarding the venepuncture, variation in the respiratory rate ranged between a reduction of 40 bpm to an increase of 12 bpm. Increase in the respiratory rate was only observed in seven animals.

Rectal temperature decreased gradually throughout the whole procedure ($p < 0.05$), with a mean difference between BS and BC of -0.8 ± 0.9 and between BC and AC of -0.6 ± 0.7°C.

Considering all the procedure, minimum and maximum values observed for heart rate (beats per minute) were 72 and 207, for respiratory rate (breaths per minute) 28 and 88 and for temperature (Celsius grades) 34.3°C and 40.2°C, respectively. All these changes are shown in Table 4 and Fig. 3.

Neither morbidity nor mortality were observed by the persons who monitor the areas where the animals were captured and released, including 14 animals that were camera monitored for five days (Fig. 4). Calcium oxide labeling revealed no discomfort from the animals during application

Table 2. Morphological parameters of the adult and juvenile rabbits used in this study. The values presented are the mean ± SD. Same letters and different letters indicate, respectively, respectively indicate the absence and existence of a statistically significant differences.

Morphological parameters	Juveniles (n = 14)	Adults (n = 16)	p-value	
Weight	568 ± 128^a	956 ± 124^b	0.000	g
Body length	22.6 ± 1.9^a	26.3 ± 2.5^b	0.000	cm
Head length	7.3 ± 0.8^a	8.1 ± 0.6^b	0.002	
Ear length	7.5 ± 0.5^a	7.8 ± 0.6^a	0.064	
Tarsus length	3.9 ± 0.3^a	4.5 ± 0.6^b	0.001	

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

Table 3. Comparison of the clinical parameters according to the capture method used.

Clinical parameters		Mean ± SD
Ferrets (n = 5)	heart rate	201 ± 97
	respiratory rate	51 ± 23
	rectal temperature	37.7 ± 3.4
Trap (n = 25)	heart rate	164 ± 46
	respiratory rate	58 ± 14
	rectal temperature	38.2 ± 2.7

and on the following days and allowed rapid and clear identification in the chambers either day or night.

Genetic analysis

Genetic analysis confirmed that all tested rabbits (n = 12, 40% of total sampling), belong to the *O. c. algirus* subspecies (results not shown).

Discussion

The technique described for EJV blood collection in apparently healthy wild rabbits *Oryctolagus cuniculus algirus* under sedation with midazolam has proven to be safe and effective for sampling relatively high volumes of blood (1 ml) in this wild species.

To correctly execute the procedure, the technician must be aware of the morphological and physiological particularities of this fragile species to minimize the associated risks.

During the procedure, keeping stress to a minimum has proven crucial for sedation effectiveness and successful venepuncture at first attempt while it is also important to prevent heart ischemia induced by coronary vasoconstriction since rabbits have limited collateral coronary circulation (Quesenberry and Carpenter 2012).

Also, care was taken to avoid injuring, particularly bone fractures. Vertebral fracture, usually observed at the seventh lumbar vertebra with spinal cord damage, can occur if the animals are not held securely when picked up (Brewer and Cruise 1994). More stressed rabbits were carried with their head under the handler's arm to minimize stress by covering the eyes to limit vision, as recommended in literature (Graham 2006). At the time of the sedative administration, there were no signs of pain in the animals. After the onset of sedation, the animals were handled much more easily, as hind limb movements and attempts to escape were drastically reduced.

As wild rabbits' veins are extremely thin and the most peripheral ones susceptible to hematoma formation (Quesenberry and Carpenter 2012), after venepuncture and needle withdrawal, enough pressure was applied to limit hematomas. Throughout the procedure, both the handler and bleeder constantly monitored the animals' breathing pattern and the colour of the oral mucosa to guarantee proper oxygenation.

Blood collection from the EJV can stimulate the vagus nerve, resulting in heart arrhythmias that may range in severity from bradycardia to complete sinoatrial or atrioventricular block (Hegedus and Shackelford 1965). None of these events were observed during the procedures. This was confirmed by constant clinical observation of the animal and continuous electrocardiogram monitoring. To avoid vagus nerve stimulation and carotid artery laceration, the bleeder ensured that the attempts to locate the vessel, once the needle passed the skin, were done superficially, as recommended by Nelson et al. (2010).

Data obtained from our work showed that heart rates taken prior to sedation ranged between 117 and 292 bpm. There is no reference range for the wild rabbit physiological parameters in the literature. Considering the interval values described for the European rabbit (O'Malley 2005) of 180–250 bpm as a reference, some of our values detected before sedation are relatively low. This can be explained by the fear bradycardia mechanism explained below.

The large interval of heart rate observed in the animals can be explained by differences among the animals, such as environmental responses, sensibility to midazolam, initial physiologic conditions, social status, alongside others (Eisermann 1988). However, in four animals (13.3%), the heart rate increased 4–32 bpm after sedation. This can either be a result of individual higher sensibility and susceptibility to midazolam effects or higher stress due to conservation of the animals in the black bag during the sedation onset. The time considered as onset of sedation was somehow subjective, since it was based on the animal's response to restraint and general behaviour. Consequently, measurement of each physiological parameter may have taken place at different depths of sedation.

The mean increase of heart rate that we observed in juveniles can be explained by 1) different metabolic rate that can influence the pharmacokinetics of midazolam, 2) major stress that these animals are prone to at this age class, 3) individual cardiorespiratory response to the effect of benzodiazepines. Furthermore, the continued reduction in heart rate observed in the other 15 animals may also be explained by a more prolonged sedation in these rabbits.

Table 4. Physiological parameters collected from rabbitssubmitted to EJV venepuncture. The values of heart rate and respiratory rate are per minute and the value of rectal temperature in °C. Same letters and different letters indicate, respectively, respectively indicate the absence and existence of a statistically significant difference.

Clinical parameters	BS	BC	AC	p-value
Heart rate (mean ± SD)	164 ± 39[a]	119 ± 27[b]	121.7 ± 29.5[b]	<0.0001 BC–AC = 0.6
Respiratory rate (mean ± SD)	58 ± 13[a]	56 ± 15[ab]	51.0 ± 10.3[b]	<0.0001 BS–BC = 0.5 BC–AC = 0.1
Rectal temperature (mean ± SD)	38.2 ± 1.2[a]	37.4 ± 1.1[b]	36.8 ± 1.2[c]	<0.0001

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

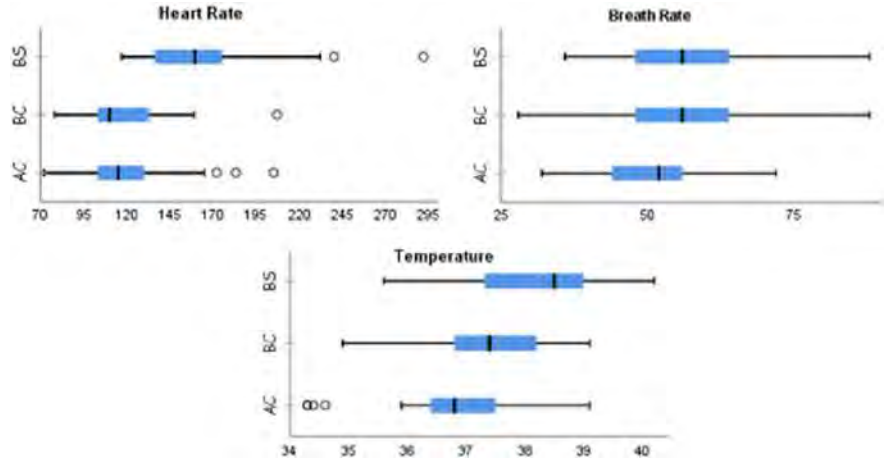


Figure 3. Boxplot graphs depicting heart rate (beats per minute on x-axis), respiratory rate (breaths per minute on x-axis) and temperature (°C on x-axis) evolution in three moments for each graph (before sedation-top; after sedation and before sampling – midline; after sedation and after sampling-down). X represents mean value. The three graphs only represent different viewing angles.

Besides heart rate variation due to sedation, fear bradycardia was also observed in some animals during manipulation. In consequence of the high levels of predation that wild rabbits are subject to, their sensory organs are highly developed. Rabbits are sensitive to catecholamines and have evolved for flight rather than fight, meaning they respond to threat passively by crouching and hiding (Smith et al. 1981). Animals that freeze in situ or drop into a burrow often show a sudden and marked fear bradycardia (Smith et al. 1981), a poorly understood, widely observed, alternate fear response. In lagomorphs, fear bradycardia appears to be due to a reduction of sympathetic activity and an increased parasympathetic activity (Smith et al. 1981). Since it occurs in atropine treated animals, it has been suggested that this type of response is, at least, partly mediated by removal of sympathetic tone (Smith and Worth 1980). Causby and Smith (1981) described a decrease in heart rate of 53% at $-11.2\,\text{bpm}\,\text{s}^{-1}$ in *Sylvilagus aquaticus*. Keeping our animals in boxes and bags, making them unable to flee, probably led to the onset of this mechanism during our study.



Figure 4. Photographs taken after release of the rabbits. Left- at night (arrow indicates the marking on the ear); right-during the day (arrow indicates the marking on the ear).

The rectal temperature decreased since the beginning of the procedure. The reduction of this physiological parameter may have resulted from 1) a decrease in the metabolism of the animals resulting in a reduction of heat production, 2) a reduction in the muscular movements due to containment of the animal, resulting also in a lower heat production and 3) the increment of heat loss due to use of ethanol to wet the animal's fur, due to evaporation. In this context, ethanol can be replaced by another disinfectant with lower heat evaporation effects such as chlorhexidine.

The midazolam dose ($1\,\text{mg}\,\text{kg}^{-1}$) used in this study was considered sufficient for the short duration of the procedure. In field conditions, without resuscitation equipment and other supporting means available, it is critical to ensure that the technique in use has negligible risks associated. When using this low dose, individual variation has a greater impact on the depth of sedation, with the animals exhibiting different responses. However, given that the safety margin between anaesthetic and lethal dose in the rabbit is narrower than in other species, and that individual variation is larger (de Vries et al. 2007), the use of this dose ($1\,\text{mg}\,\text{kg}^{-1}$ midazolam) is recommended.

Despite rabbits' susceptibility to overheating (Wildpro 2017), during our study a steady decrease of body temperature throughout the whole procedure was observed, possibly because most of the blood collections were made during winter (with temperatures ranging between 7°C and 20°C).

From our experience, restraint of the animal by an experienced person and correct identification and visualization of the EJV proved critical to guarantee the success of the procedure, in the first attempt. Presenting the animal correctly to the person in charge of the venepuncture was essential for visualization and less deviation of the EJV, located laterally to the midline and overlying the internal jugular vein and the carotid artery. Shaving the neck over the midtrachea cranial to the thoracic inlet (Quesenberry and Carpenter 2012) can be carried out for a better EJV visualization. If shaving must be performed, electric hair clippers with thin blades

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

(size 50, 1/1 in. [0.2 mm], or 40, 1/100 in. [0.25 mm]) (Quesenberry and Carpenter 2012) must be used, because rabbit fur is very thin, and the animal's coat must be clean and dry.

The technician must also be aware that clipping off large amounts of fur or using copious quantities of disinfectant during skin preparation potentiate heat loss and the development of hypothermia, especially in small rabbits with no fat reserves (Varga 2014). Whenever the procedure is to be performed in a timely manner, and once the person performing the procedure has acquired experience, this step can be avoided to minimize stressing the animal and prevent skin exposure to hives and other aggressive plants.

For most cases, where only 0.5 ml of serum was necessary, 1 ml syringes were used given the low negative pressure on the vein. However, in adult animals, or whenever required, a 2 ml syringe can also be used. If this is the case, to minimize the vacuum exerted on the wall of the EJV, the vacuum was withdrawn from the syringe before the animal was punctured.

Whenever the first attempt to collect blood failed, the needle should be slowly removed, and the puncture site monitored for bleeding. More than two attempts should be avoided in case of bleeding due to the risk of vein collapse.

Undoubtedly, in studies involving live animals it is most important to safeguard the individual variability among the specimens. The use of wild specimens from different geographical areas, captured by different methods, with different levels of habituation to humans, leads to a multiplicity of factors that may influence the animals' physiological parameters. In addition, the unknown sanitary condition of the animals due to parasitism, or to any underlying subclinical infection, may also influence the physiological conditions of the animals.

The studies of pathologies in the species are reliant upon dead animals or stool samples found in the fields. This study represents a breakthrough in this area, by allowing in vivo biological sampling of a wild species. Access to blood sampling creates the opportunity for year-round generalised surveys, as well as the evaluation of physiological parameters (e.g. blood count and biochemistry analysis) of this species, without depending on cadavers either obtained during the hunting season or found dead.

Moreover, release of the sampled specimens is critical to avoid disturbance of recovery in diminished populations. The EJV technique allowed the collection of 1mL of blood from both adults and juveniles. However, researchers should adhere to institution specific guidelines regarding permitted maximum volumes and frequency of blood collection. There was neither significant bruising nor any other injuries before, during or after the venepuncture procedure and sedation. Additionally, there were also no injuries inflicted on the manipulators.

Complementary procedures to assess the influence of the sedation and venipuncture on the physiology of the animal by temperature assessment and monitoring of heart and respiratory rates, were also described in this manuscript to validate the method. When complementary monitoring is no further necessary, the time needed for sedation and blood collection is drastically shortened, as well as the stress level.

The method can potentially be adapted to other species, especially to other small mammals, allowing longitudinal studies and supporting other conservation methods.

Acknowledgements – Thanks to Sebastião Miguel (Gestor Cinegético), Carlos Magro e Mário Gomes (Quinta dos Penedinhos), José Franco (Associação de Caçadores Olivais, Encarnação e Moscavide), Luís Garcia e José Silva (Associação de Caçadores das Sesmarias), Rui Alves e José Luís Coelho (Companhia das Lezírias), António Inácio e Paulo Costa (Zona de Caça Associativa da Herdade das Casas Novas) for collaboration in field work and animal capture.
Funding – Most of the field and laboratory work referred to in this manuscript was supported by the Interdisciplinary Research Centre on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL) (Portugal) (Project UID/CVT/00276/2013) and Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (Grant SFRH/BD/137067/2018). Laboratory work was also funded by Fundo Florestal Permanente (Government of Portugal) in the scope of the Action Plan for the Control of Rabbit Viral Haemorrhagic Disease (+COELHO, Dispatch no. 4757/2017 of 31 May). Wu also thank the financial support of CESAM (UID/AMB/50017/2019), FCT/MCTES through national funds.
Conflicts of interest – Funding bodies played no direct role in the design or conclusion of the study.
Author contributions – FAS: experimental design, capture of animals, sedation and blood collection, post-release monitoring. Wrote the manuscript. CC: clinical evaluation, blood collection. Wrote the manuscript. CP: revised the manuscript. SIG: genetic assessment and revised the manuscript. RPo: revised the manuscript. JC: logistics and capture of the animals with ferrets. MC: revised the manuscript. MD: data collection and analysis. Wrote and revised the manuscript.
Ethics approval and consent to participate – This article is about the use of a routine medical procedure for blood collection and was carried out within the scope of a National Plan for the Control of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus 2 in rabbits (Dispatch no. 4757/2017 of 31 May), with the legal authorizations from the National Authority, the Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF).

References

Abade dos Santos, F. A. et al. 2017. Detection of rabbit Haemorrhagic disease virus 2 during the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) eradication from the Berlengas Archipelago, Portugal. – BMC Vet. Res. 13: 336.

Abrantes, J. et al. 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. – Emerg. Infect. Dis. 19: 1900–1902.

Angulo, E. 2004. El Conejo, el monte mediterraneo en Andalucía. – Cons. Medio Ambient. Junta Andalucia, Sevilla.

Bell, D.J. and Webb, N.J. 1991. Effects of climate on reproduction in the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). – J. Zoology 224: 639–648.

Borkowski, R. and Karas, A. Z. 1999. Sedation and anesthesia of pet rabbits. – Clin. Tech. Small Anim. Pract. 14: 44–49.

Boyle, J. E. 2016. Crow and Walshaw's manual of clinical procedures in dogs, cats, rabbits and rodents, 4th edn. – Wiley.

Brewer, N. and Cruise, L. 1994. Physiology. – In: Manning, P. et al. (eds), The biology of the laboratory rabbit, 2nd edn. Academic Press, pp. 63–70.

Buil, T. et al. 2004. Critical points in the transport of commercial rabbits to slaughter in Spain that could compromise animals'welfare. – World Rabbit Sci. 12: 269–279.

Cantwell, S. L. 2001. Ferret, rabbit and rodent anesthesia. – Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 4: 169–191.

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

Carvalho, Silva, S. et al. 2017. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in the archipelago of Madeira, Portugal (2016–2017). – Virus Genes 53: 922–926.
Causby, L. A. and Smith, E. N. 1981. Control of fear bradycardia in the swamp rabbit, *Sylvilagus aquaticus*. – Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. 69: 367–370.
Cizek, L. J. 1961. Relationship between food and water ingestion in the rabbit. – Am. J. Physiol. 201: 557–566.
de Vries, H. W. et al. 2007. Four methods for general anaesthesia in the rabbit: a comparative study. – Lab. Anim. 22: 355–360.
Delibes, M. et al. 2000. Action plan for the conservation of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Europe. – Counc. Eur. Publ. Nat. Environ. Strasbourg, Fr. 111.
Duarte, M. et al. 2015. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. – Infect. Genet. Evol. 35: 163–171.
Eisermann, K. 1988. Seasonal and environmental influences upon the diurnal heart-rate pattern in wild rabbits living under seminatural conditions. – Physiol. Behav. 43: 559–565.
Flecknell, P. A. 1984. The relief of pain in laboratory animals. – Lab. Anim. 18: 147–160.
Flecknell, P. A. 1987. Laboratory animal anaesthesia. – Academic Press.
Gálvez-Bravo, L. 2017. Conejo – *Oryctolagus cuniculus*. Salvador, A. and Barja, I. (eds), Enciclopedia virtual los vertebrates. Mus. Nac. Ciencias Nat. Madrid. <www.vertebradosibericos.org/>.
Gargiulo, S. et al. 2012. Mice anesthesia. – ILAR J. 53: E55–E68.
Gibb, J. A. 1990. The European rabbit. – In: Chapman, J. A. and Flux, J. E. (eds), Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan. IUCN, Switzerland, 116–120.
Gibb, J. A. and Williams, J. M. 1990. European rabbit. – In: King, C. M. (ed.), Handbook of New Zealand mammals. Oxford Univ. Press, pp.138–160.
Graham, J. 2006. Common procedures in rabbits. – Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 9: 367–388.
Hegedus, S. A. and Shackelford, R. T. 1965. A comparative–anatomical study of the craniocervical venous systems in mammals, with special reference to the dog: relationship of anatomy to measurements of cerebral blood flow. – Am. J. Anat. 116: 375–386.
Henke, J. et al. 2005. Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits. – Vet. Anaesth. Analg. 32: 261–270.
La Fuente, F. R. 1993. Cadernos de campo. – A Lebre e o Coelho, Lisboa.
Longley, L. et al. M. 2008. Anaesthesia of exotic pets. – Elsevier.
Macdonald, D. W. and Barrett, P. 1993. Mammals of Europe. – Prineton Univ. Press.
Muir, W. W. et al. 2000. Drugs used for preanesthetic medication. – Handb. Vet. Anesth. 3: 19–40.
Mullan, S. and Saunders, R. 2018. European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). – Companion Anim. Care Welf. 163–184.
Nelson, E. A. et al. 2010. A jugular bleeding technique in rabbits. – Lab. Anim. 39: 17–22.
O'Malley, B. 2005. Clinical anatomy and physiology of exotic species. Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians, 1st edn. – Elsevier.
Parasuraman, S. et al. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. – J. Pharmacol. Pharmacother. 1: 87.
Patrick, J. et al. 1994. The biology of the laboratory rabbit, 2nd edn. – Elsevier.
Quesenberry, K. E. and Carpenter, J. W. (eds) 2012. Ferrets, rabbits and rodents clinical medicine and surgery. – In: Clinical medicine and surgery. 3rd edn. ScienceDirect.
Ramer, J. C. et al. 1999. Evaluating and stabilizing critically ill rabbits. I. – Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.
Seamer, J. 1993. Farm animal welfare in Britain. – SCAW (Scientists Cent. Anim. Welfare) Newsl. 14: 13–14.
Smith, E. N. et al. 1981. Fear bradycardia in captive eastern chipmunk, *Tamias striatus*. – Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol. 70: 529–532.
Smith, E. N. and Worth, D. 1980. Atropine effect on fear bradycardia of the eastern cottontail rabbit, *Sylvilagus floridanus*. – In: Amlaner, C. J. and Macdonald, D. W. (eds), Handbook on biotelemetry and radio tracking. ScienceDirect, pp. 549–555.
Varga, M. 2014. Textbook of rabbit medicine. – Elsevier.
Virgós, E. et al. 2005. El declive del conejo en España: evidencias a partir de las estadísticas de caza. – Quercus 236: 16–20.
Von Holst, D. et al. 1999. Social rank, stress, fitness, and life expectancy in wild rabbits. – Naturwissenschaften 86: 388–393.
Ward, D. 2005. Reversing rabbit decline: one of the biggest challenges for nature conservation in Spain and Portugal. – SOSLynx.opg.
Wildpro 2017. Detailed physiology notes with literature reports for the European rabbit – *Oryctolagus cuniculus*. – <http://wildpro.twycrosszoo.org/S/0MLagomorph/Leporidae/Oryctolagus/Oryctolagus_cuniculus/10Oryctolagus_cuniculusDetPhy.htm, accessed 14 November 2017.
Willott, S. J. et al. 2000. The contribution of rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.) to soil fertility in semi-arid Spain. – Biol. Fertil. Soils 31: 379–384.

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Wildlife-Biology on 06 Dec 2019
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

First description of a herpesvirus infection in genus Lepus

F. A. Abade dos Santos[1,2]*, M. Monteiro[1], A. Pinto[3,4], C. L. Carvalho[1], M. C. Peleteiro[2], P. Carvalho[1], P. Mendonça[1], T. Carvalho[3], M. D. Duarte[1,2]

1 Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal, **2** Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, **3** Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Avenida Professor Egas Moniz, Lisboa, Portugal, **4** EM Suite, Royal Brompton Hospital and Harefield NHS Foundation Trust, Lisboa, Portugal

* faas@fmv.ulisboa.pt

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Santos FAAd, Monteiro M, Pinto A, Carvalho CL, Peleteiro MC, Carvalho P, et al. (2020) First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. PLoS ONE 15(4): e0231795. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795

Editor: Binod Kumar, Loyola University Health System, UNITED STATES

Received: January 3, 2020

Accepted: March 31, 2020

Published: April 17, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795

Copyright: © 2020 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All the data are on the manuscript.

Funding: Most of the field and laboratory work referred to in this manuscript was supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (Grant

Abstract

During the necropsies of Iberian hares obtained in 2018/2019, along with signs of the nodular form of myxomatosis, other unexpected external lesions were also observed. Histopathology revealed nuclear inclusion bodies in stromal cells suggesting the additional presence of a nuclear replicating virus. Transmission electron microscopy further demonstrated the presence of herpesvirus particles in the tissues of affected hares. We confirmed the presence of herpesvirus in 13 MYXV-positive hares by PCR and sequencing analysis. Herpesvirus-DNA was also detected in seven healthy hares, suggesting its asymptomatic circulation. Phylogenetic analysis based on concatenated partial sequences of DNA polymerase gene and glycoprotein B gene enabled greater resolution than analysing the sequences individually. The hare' virus was classified close to herpesviruses from rodents within the Rhadinovirus genus of the gammaherpesvirus subfamily. We propose to name this new virus Leporid gammaherpesvirus 5 (LeHV-5), according to the International Committee on Taxonomy of Viruses standards. The impact of herpesvirus infection on the reproduction and mortality of the Iberian hare is yet unknown but may aggravate the decline of wild populations caused by the recently emerged natural recombinant myxoma virus.

1. Introduction

The Iberian hare (*Lepus granatensis*), also known as Granada hare, is an endemic specie of the Iberian Peninsula whose populations are considered stable by the IUCN holding a '*minor concern*' conservation status [1].

Lepus granatensis is the only hare species found in Portugal and the most widespread in the Iberia [2], therefore, highly relevant for biodiversity preservation and hunting activity in both countries, particularly for greyhound racing.

Contrarily to the wild rabbit, which drastic decline has been linked, among other factors, to viral epizooties, until recently, the Iberian hare was not affected by viral diseases. Environmental and anthropogenic factors, however, have had a negative impact on both hare and wild-rabbit populations.

SFRH/BD/137067/2018), Fundo Florestal Permanente (Government of Portugal) in the scope of the Action Plan for the Control of Rabbit Viral Haemorrhagic Disease (+COELHO, Dispatch no. 4757/2017 of 31 May) and by the Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL) (Portugal) (Project UID/CVT/00276/2013). Funding bodies played no direct role in the design or conclusion of the study.

Competing interests: No competing interests.

Lepus granatensis was considered naturally resistant to myxomatosis, which is endemic in Iberian Peninsula since 1956 [3], despite very sporadic reports of the disease in the European brown hare (*L. europaeus*), namely in France and Ireland [4–6]. However, during the summer and autumn of 2018 outbreaks of myxomatosis in the Iberian hare were reported in Spain [7] and Portugal [8], respectively.

No other diseases of viral origin have been described in the Iberian hare, including those caused by herpesviruses, which may have a fatal outcome in rabbits [9].

Until now, four herpesviruses have been identified in leporids: Leporid herpesvirus 1 (LeHV-1), Leporid herpesvirus 2 (LeHV-2), Leporid herpesvirus 3 (LeHV-3) and Leporid herpesvirus 4 (LeHV-4) (Table 1). Of these, the most common naturally occurring herpesvirus

Table 1. Summary of the characteristics of the four herpesviruses identified in leporids.

Type	Subfamily		Common Name	Host	Physiopathology	Isolation
LeHV-1	γ	Not attributed[a]	Cottontail herpesvirus	*Sylvilagus floridanus*		Isolated from primary kidney cells cultures of *Sylvilagus floridanus* [13].
						No report of disease in domestic rabbits, since *Oryctolagus cuniculus* is not infected [10].
LeHV-2	γ	Not attributed[a]	Herpesvirus cuniculi	*Oryctolagus cuniculus*	Some evidences of a subclinical encephalitis in infected New Zealand white rabbits [30].	Isolated in 1968 from kidneys of apparently healthy *Sylvilagus floridanus* [31].
						Oryctolagus cuniculus is the natural host where infection is asymptomatic[32]
LeHV-3	γ	Not attributed[a]	Herpesvirus sylvilagus	*Sylvilagus floridanus*	Lymphoproliferative disease and tumour-like lesions in the lymph nodes, kidney, spleen, and liver [31,33].	Isolated from primary kidney cells cultures of Sylvilagus floridanus [13].
						Oryctolagus cuniculus is not infected
						Not isolated in WI-38, HeLa, Chang's conjunctiva, human amnion (FL), green monkey kidney (Vero), primary rhesus monkey kidney, primary hamster kidney, BHK-21, primary mouse embryo, and primary chick embryo [33]. Isolated in DRK-3 cells [33].
						CPE appear after 10–15 days of inoculation. Infected cells show focal areas of round and distorted cells, and in 1–2 days, emerged syncytial masses containing 50 or more nuclei [31].
						H&E coloration show typical type A intranuclear inclusions in the infected cells. Complete cell destruction occurred after a 5 to 7-days period [31].
LeHV-4	α	Attributed[b]		*Oryctolagus cuniculus*	Lethargy, anorexia, conjunctivitis, fever, and abortion. Haemorrhagic dermatitis, splenic necrosis, hepatic necrosis, and multifocal pulmonary haemorrhage and oedema. Distinctive glassy eosinophilic herpetic intranuclear inclusion bodies were observed in the skin fibroblasts? And mesenchymal cells of the spleen and lung [9,34].	Isolated in rabbit skin (RS), RK13 and Vero cells [9]. CPE characterized by syncytium formation, cell enlargement, and cell lysis, similar to human herpesvirus type 1 (HHV-1). Jin et al. [9] verified that in rabbits inoculated with LHV-4, the appendix, sciatic nerve, kidney, adrenal gland, and many other organs were positive for the virus at the 5-days post infection(dpi), while at the 14 dpi only trigeminal ganglia eye and tonsil were positive.
LeHV-5	γ	Not attributed	Iberian hare herpesvirus	*Lepus granatensis*	Described in the results of this work	

[a]Not attributed by the ICTV; Viruses which may be members of the genus Rhadinovirus [35] but have not been approved as species

[b]Leporid alphaherpesvirus //Leporid Herpesvirus 4

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.t001

infections identified in rabbits are LeHV-2 and LeHV-3 (reviewed by [9]), which alongside LeHV-1 belong to the Gammaherpesvirinae subfamily. Conversely, LeHV-4 is a member of the Alphaherpesvirinae subfamily. These distinct herpesviruses have a broadly variable impact on the European rabbit, with LeHV-2 and LeHV-3 infections usually passing unnoticed [10], while LeHV-4 is far more aggressive, causing fatal infections [9].

Herpesviruses are enveloped viruses, of 200–250 nm in diameter, organised in four concentric layers [11], 1) a core with the linear dsDNA genome, 2) T = 16 icosahedral capsid with about 125nm of diameter surrounded by a 3) proteinaceous tegument that contains many virus-coded proteins and enclosed in a 4) lipid envelope containing several viral glycoproteins. Morphologically, herpesviruses are distinct from all other viruses [12], and therefore easily recognised by electron microscopy.

Herpesviruses belong to order Herpesvirales that comprises three families, namely the Herpesviridae family, which includes more than 100 viruses of mammals, birds and reptiles and whose members have large genomes ranging from 125 to 290kb [13], the Alloherpesviridae family, which includes the fish and frog viruses, and the Malacoherpesviridae family, which contains the bivalve virus [12].

The Herpesviridae family includes the subfamilies Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae and Gammaherpesvirinae. Their members have different biologic properties and distinct classification, supported by phylogeny. The Gammaherpesvirinae subfamily is divided into four genera, namely *Macavirus*, *Percavirus*, *Lymphocryptovirus*, and *Rhadinovirus* [12].

While the subfamily Alphaherpesvirinae causes rapid lysis in cell culture, members of Betaherpesvirinae grow slowly inducing the formation of giant cells in culture, and Gammaherpesvirinae typically infect lymphoid tissue, meaning a primary tropism for lymphoid lineage cells [14], which can lead to lymphoproliferative diseases [9] and oncogenesis [13].

In this study, we investigated the presence of herpesvirus in myxoma virus (MYXV)-positive hares that alongside, the typical myxoma virus-induced skin lesions, presented other lesions in the genitalia, eyelids, lips and nose suggestive of herpesvirus infection.

To unveil the prevalence of herpesvirus in the hare populations, healthy hares were also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Sample

A total of 38 Iberian hares, none sacrificed for the purpose of this study, were investigated within the scope of a national surveillance program (Dispatch 4757/17, 31th may) [8] in action since August 2017. Of these, 16 were males, 20 were females, and two failed sex-determination. Eighteen hares were legally hunted by the Hunting Associations during the 2018/2019 season (October to December), authorized by permits from the National Forest Authority, the Institute for Nature Conservation and Forests (ICNF), while 20 were found dead in the field between October 2018 and June 2019. None of the authors were responsible for the death of the animals. Hunted and hares found dead were sampled in six Districts of mainland Portugal, namely Setúbal, Santarém, Beja, Évora, Portalegre and Faro, (Fig 1).

2.2. Necropsy and histopathology

Cadavers were necropsied and spleen, liver, lung, duodenum and skin samples (namely scrotum, lips and nose) were collected for virology, bacteriology and histopathology. The entire gastrointestinal tract was taken for parasitological analysis. From hunted hares, only spleen, liver and lung samples were received at the laboratory.

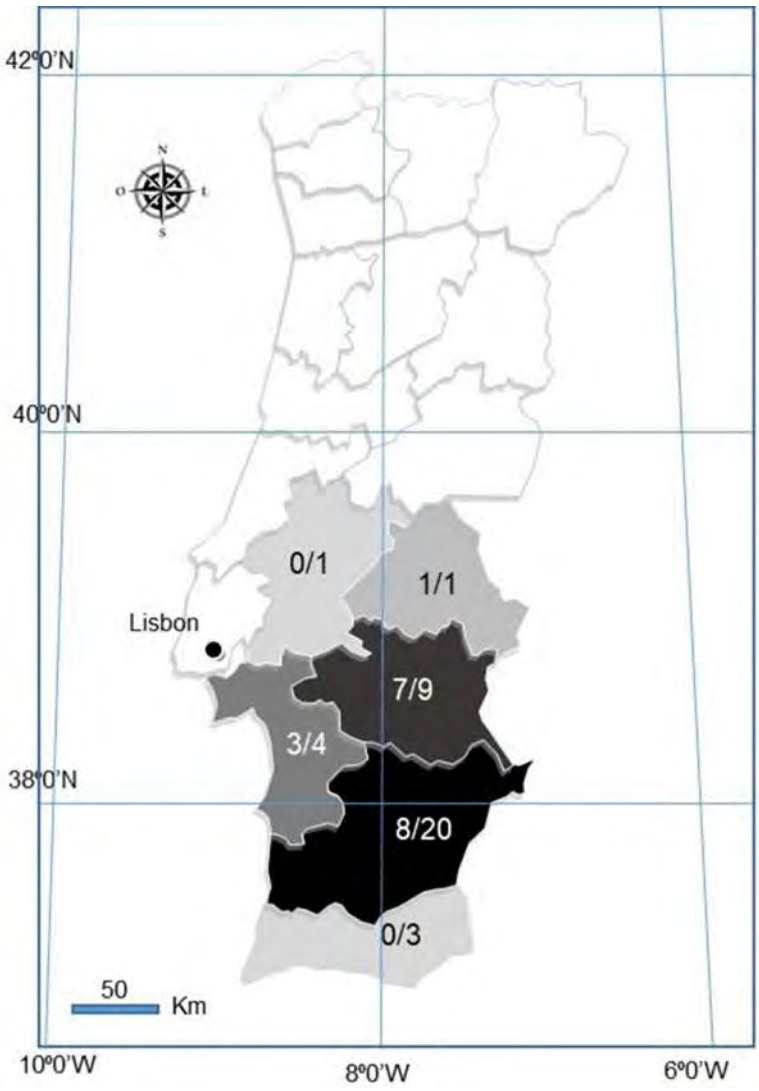


Fig 1. Map of Portugal showing the geographic origin of the 38 LeHV-5 positive hares over the total sampling per district. White coloured Districts were not sampled. Darker shades correspond to higher positivity.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g001

For histopathology, skin and genitalia fragments were fixated in 10% neutral buffered formalin, routinely paraffin embedded, sectioned at 4 μm, and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E).

2.3. Transmission electron microscopy

The fragments selected for transmission electron microscopy (TEM) were formalin fixated for 48h or on a solution 0.1M sodium cacodylate (Sigma©) containing 2.5% gluteraldehyde (Sigma©) for 72h. When the samples were already embebed in paraffin, the regions of interest were extracted from the block, sliced smaller than ~1mm^3 with a scalpel blade into two separate viles, and washed thoroughly in xylene. After rehydration using decreasing concentrations of ethanol, fragments were washed in 0.1M cacodylate buffer [15]. Samples were then post-fixed with 2% osmium tetroxide (EMS) for 30min, and stained in block with 1% Millipore-filtered uranyl acetate (Agar Scientifics), after which they were dehydrated in increasing

concentrations of ethanol, infiltrated and embedded in EMBed-812 hard (EMS). Polymerization was performed at 60˚C for 2 days. Ultrathin sections were cut either in a UC7 ultramicrotome or in a Reichert ultracut E ultramicrotome (Leica), collected to 1% formvar coated copper slot grids (Agar scientific), stained with uranyl acetate and lead citrate (Sigma) and examined in a H-7000 transmission electron microscope (Hitachi) at an accelerating voltage of 100 kV or Jeol 1400plus transmission electron microscope at an accelerating voltage of 120 kV. Digital images were obtained using a Megaview mid mount digital camera (Olympus) or using a AMT XR16 bottom mid mount digital camera (AMT©). The sections were systematically analysed using AMT© software and several high and low magnifications were acquired.

2.4. Bacteriological and parasitological examination

Liver, spleen and lung samples were analysed using standard bacteriological methods. Parasitological examination of the intestine was carried out resourcing to direct wet mount, sedimentation and filtration techniques.

To investigate the presence of Enterobacteriacea the ID 32E (Biomerieux®) was used, while for non-Enterobacteriaceaethe API 20NE kit (Biomerieux®) was utilised. To test the presence of Streptococcus and Staphylococcus, the ID 32 STREPT (Biomerieux®) and the ID 32 STAPH kits (Biomerieux®) were used, respectively. The API CORYNE (Biomerieux®) kit was utilized for the identification of Corynebacteria and coryne-like organisms. To investigate the presence of Salmonella, peptone water and Rappaport Vassiliadis semi solid culture media were used. The agarose SMID2 and XLD culture media were utilized, whenever there was a suspicion of Salmonella. Other culture media used for bacterial identification in the samples included the MacConkey agar and the Blood agar culture media.

2.5. Virological examination

For nucleic acid extraction, fresh samples of liver and spleen were homogenised at 20% with phosphate buffered saline (PBS) and clarified at 3000g for 5 min. Total DNA and RNA were extracted from 200μl of the clarified supernatants, using the MagAttract 96 cador Pathogen Kit in a BioSprint 96 nucleic acid extractor (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol.

All the animals were tested for rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) and MYXV by real time PCR systems described by Duarte *et al* (2015) [12] and Duarte *et al* (2014) [22], respectively. The presence of LEHV-4 was investigated by using the PCR described by Jin *et al* (2008) [9]. A generalist nested PCR directed to the herpesviral *DNA polymerase* that allows the detection of herpesviruses of different subfamilies by Van Devanter *et al*. (1996) [16] was also used.

The glycoprotein B gene was partially amplified using the GH1 system described previously [17].

Amplifications were carried out in a Bio-Rad CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Srl, Redmond, USA), using the One Step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) for RHDV2, and the HighFidelity PCR Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), for MYXV and herpesvirus detection, respectively.

Information regarding these methods is summarized in Table 2.

2.6. Sequencing analysis

The PCR products were visualised in 2% horizontal electrophoresis agarose gel, purified using the NZYGelpure kit (NZYTECH), and directly sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit on a 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City,

Table 2. Molecular methods used for the detection of RHDV2 (Duarte et al, 2015), MYXV (Duarte et al, 2014), LeHV 4 [9] and a wide variety of herpesviral genomes from human and animal herpesviruses (Van Devanter, 1996).

Primer	Sequence (5'-3')	Target gene	Amplicon size (bp)	Amplification conditions	Reference
RHDV2-F	TGGAACTTGGCTTGAGTGTTGA	Vp60	127	50˚C -45min 95˚C-15min 50x (95˚C-15s 60˚C-30s 72˚C-30s)	[36]
RHDV2-R	ACAAGCGTGCTTGTGGACGG				
RHDV2-Probe	[FAM]-TGTCAGAACTTGTTGACATCCGCCC-[TAMRA]				
M000.5R/L-F	CGACGTAGATTTATCGTATACC	M000.5	125	95˚C- 10min 45X (95˚C-30s 50ºC-30s 60˚C-30s)	[37]
M000.5R/L-R	GTCTGTCTATGTATTCTATCTCC4				
MYXV-probe	[FAM]-TCTATGTCTGCCCGAGGATAGA-[TAMRA]				
LeHV-4 F1F	ATGACGCCCACCAACGTCTC GCACAGTGTGTGTTAGACG TGTGGCCAAGAACAACGATA		1617 1162 945	95ºC-10min 35x (95º-15s 54ºC-20s 72ºC-3min) 72ºC-10min	[34]
LeHV-4 F2F					
LeHV-4 F3F					
LeHV-4 F1R	CATAGACCGTAGGCGGTTC				
LeHV-4 F2R	ACGTGAACAGGAACCGGTAG				
LeHV-4 F3R	CTAGAGGTCGTTCACCACCG				
DFA (F 1st round)	GAYT TYGCNAGYYTNTAYCC	DNA polymerase	215 to 315	94ºC- 10min 35x (94ºC-60s 46ºC-60s 72ºC-3min)	[16]
ILT (F1st round)	TCCTGGACAAGCAGCARNYS GCNMTNAA				
TGV (F1st round)	TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT				
KG1 (R 2ndround)	GTCTTGCTCACC AGNTCNACNCCYTT				
IYG (R 2nd round)	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT				
2759s	CCTCCCAGGTTCARTWYGCMT AYGA	gB	700 bp	94ºC- 10min 35x (94ºC-60s 46ºC-60s 72ºC-3min)	[17]
2762as	CCGTTGAGGTTCTGAGTGTAR TARTTRTAYTC				
2760s	AAGATCAACCCCAC(N/I)AG (N/I)GT(N/I)ATG		500bp		
2761as	GTGTAGTAGTTGTACTCCCTR AACAT(N/I)GTYTC				

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.t002

CA, U.S.A). Nucleotide sequences were analysed and assembled into consensus sequences using the BioEdit version 7.2.5 software, and submitted to GenBank. Nucleotide sequences were translated using Mega X 10.1 software.

2.7. Phylogenetic analysis

Partial nucleotide (171bp) sequences of the viral *DNA polymerase* gene were aligned using the Clustal W with gap opening penalty and a gap extend penalty of 30 and 15, respectively. A phylogenetic analysis was conducted in MEGA X [18], using the model selected by Model function (MEGA X).

The evolutionary history of 28 partial DNA polymerase protein sequences of gammaherpesviruses was inferred by Maximum Likelihood. The Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model [19], which showed the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) and Akaike Information Criterion corrected (AICc) values was used. A discrete Gamma distribution (G) was used to model evolutionary rate differences among sites. The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable (I).

For more accurate phylogenetic analysis of the hare herpesvirus described is this manuscript, the partial nucleotide (171bp) sequences of the viral DNA polymerase gene catalytic subunit was concatenated with the partial (453bp) nucleotide sequences of the viral Glycoprotein B gene belonging to the same strain. The sequences were translated and aligned using the Clustal W with gap opening penalty and a gap extend penalty of 30 and 15, respectively. The

final alignment was edited to include all the sequences, corresponding to 570 nucleotides and 190 amino acids of length.

The Le Gascuel model (2008) [20], Gamma distributed with invariant sites (LG+G+I) was selected for the protein-based trees, according to BIC (14177.4) and AICC (13542.9) criteria. The analysis involved 45 amino acid sequences.

2.8. Herpesvirus isolation

Isolation of herpesvirus was attempted from organs of hares coinfected with MYXV and LeHV-5, namely from liver and spleen, penile and vulva samples. In addition, liver and spleen samples from two hares with single herpesvirus infection, were also used.

Samples were homogenized at 20% in phosphate-buffered saline containing penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic), used according to the manufacturer (Gibco, Life Technologies Corporation). Following centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.45-μm-pore-size filter (Millipore Express) and used to inoculate sub 70% confluent Candrel R Feline Kidney (CRFK) epithelial cells (ATCC-CCL-94), Vero cells (ATCC No. CRL-1986), Rabbit Kidney (RK13) cells (ATCC-CCL-37) and Hella cells (ATCCNo. CRM-CCL-2)- RK13 cells grown in Eagle medium and the others in Dulbecco's modified Eagle's Media was supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco), penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic used at 1:100), 50μg/ml gentamicin (Gibco). Cells were maintained at 37˚C under humidified atmosphere with 5% CO_2 and observed daily for cytopathic effect (CPE) by phase contrast microscopy. Three passages were carried out. The supernatant and cell pellet of each passage were tested for the presence of herpesvirus by PCR [17].

3. Results

3.1. Necropsy showed lesions compatible with herpesvirus infection in Iberian hares with myxomatosis

Overall, MYXV-positive hares revealed good body condition and, alongside typical myxomatosis lesions, necrosis of the genitalia was noticed in more than 70% of the hares studied. This lesion was more evident in males, affecting the penile glans, but was also observed in females inthe vulva. Other lesions observed in these hares included the presence of herpetic-like skin vesicles, uncommon in rabbits with myxomatosis.

Further investigation of the macroscopic lesions and histopathological patterns was carried out in hares co-infected with LeHV-5 and MYXV. At this time, we disclose the macroscopic and histopathological findings from two male hares found dead in November 2018 (#38455/18, hereafter designated hare-1) and August 2019 (#25456/19, hereafter designated hare-2).

Hare-1 presented with eyelids thickened by the accumulation of mucopurulent exudate and marked enlargement of the penis measuring 1.3x1cm in diameter (normal diameter is less than 0.5cm) and irregular surface (Fig 2 and 2A) lined with light-yellow dry exudate.

At the necropsy, hare-2 showed ulcerated multinodular thickening of the eyelids and lips. Accumulation of mucopurulent exudate in both eyes was also registered and a small vesicle was present in the lower lip (Fig 3).

3.2. Histopathology

The dermis of hare-1 showed fusiform or stellate mesenchymal cell proliferation, surrounded by abundant extracellular matrix, scattered infiltration by lymphocytes and macrophages, and small aggregates of heterophiles, consistent with myxomatosis.

The penile epithelium of this hare was mostly necrotic and replaced by a thick band of necrotic cells, heterophils and red blood cells (Fig 2).

Severe heterophile infiltrations of the stroma, in either a diffuse pattern or multifocal aggregates, were also seen. In the stroma, there was also proliferation of pleomorphic spindle cells, with some nuclei almost filled with slightly eosinophilic inclusion bodies (Cowdry type A inclusions) (Fig 4), suggesting a nuclear replicating virus. These lesions, unexpected in myxomatosis, are compatible with herpesvirus.

In the skin of hare-2, a ballooning degeneration of keratinocytes was registered. Coalescent intra-epidermal and subepidermal vesicopustules (Fig 5) filled with fibrin and necrotic cells debris and multifocal detachment of the eyelids, lips and foreskin epidermis were seen. In the underlying dermis, multifocal haemorrhages, intense infiltration by heterophils and necrotic cells with accumulation of chromatin debris were present (Fig 5).

Below the dermis, accumulation of myxoid tissue with pleomorphic spindle cells, some of which showing rounded or oval and slightly eosinophilic intranuclear inclusion bodies, was observed (Fig 6). An infiltrate of mononucleated inflammatory cells and heterophils was present in skeletal muscle tissue.

3.3. Electron microscopy

Samples from hare-1 and hare-2 were further processed and analysed for TEM allowing the confirmation of the presence of herpesvirus in different tissues.

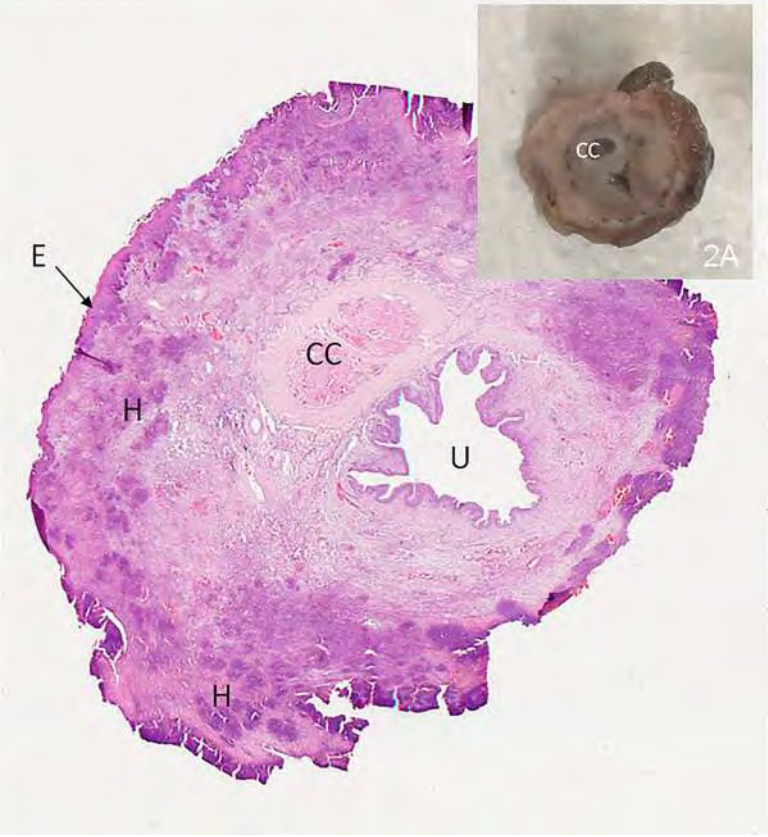


Fig 2. Penis of hare-1. 2- H&E staining showing several necrotic areas in the epithelium (E) and multifocal heterophils aggregates in the stromal tissue (H). C*orpus cavernosum* (CC); penile uretra (U). 4x. 2A - Cross section of penis after fixation- exuberant thickening of the penis.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g002



Fig 3. Hare-2 –Oedema of lips and nose with ulcerated nodules in the upper lip. A vesicle can be seen in the lower lip (arrow).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g003

In the penile soft tissue of hare-1, spherical virions, with structure and dimensions compatible with herpesviruses, comprising an inner core packed into an icosahedral capsid, were observed in the nucleus of stromal cells (Fig 7), indicating nuclear replication (Fig 7B), which is an attribute of herpesviruses. The viral capsid contained a relatively small, asymmetrical, electron-dense region that probably represents the condensed DNA core. In this animal, also positive to myxomatosis, no MYXV particles were found in the samples processed.

3.4. Virological, bacteriological and parasitological results

None of the 38 hares investigated in this study tested positive to RHDV, RHDV2 or LEHV-4. Fifty percent of the hares were positive to LeHV-5, of which 68.4% (13/19) were also positive to MYXV.

Herpesvirus-DNA was also detected by PCR in the liver, spleen and lung samples of 41.2% (7/17) of the apparently healthy hunted hares that tested negative for MYXV. From this group of hares, no genitalia/skin samples were available for histopathology.

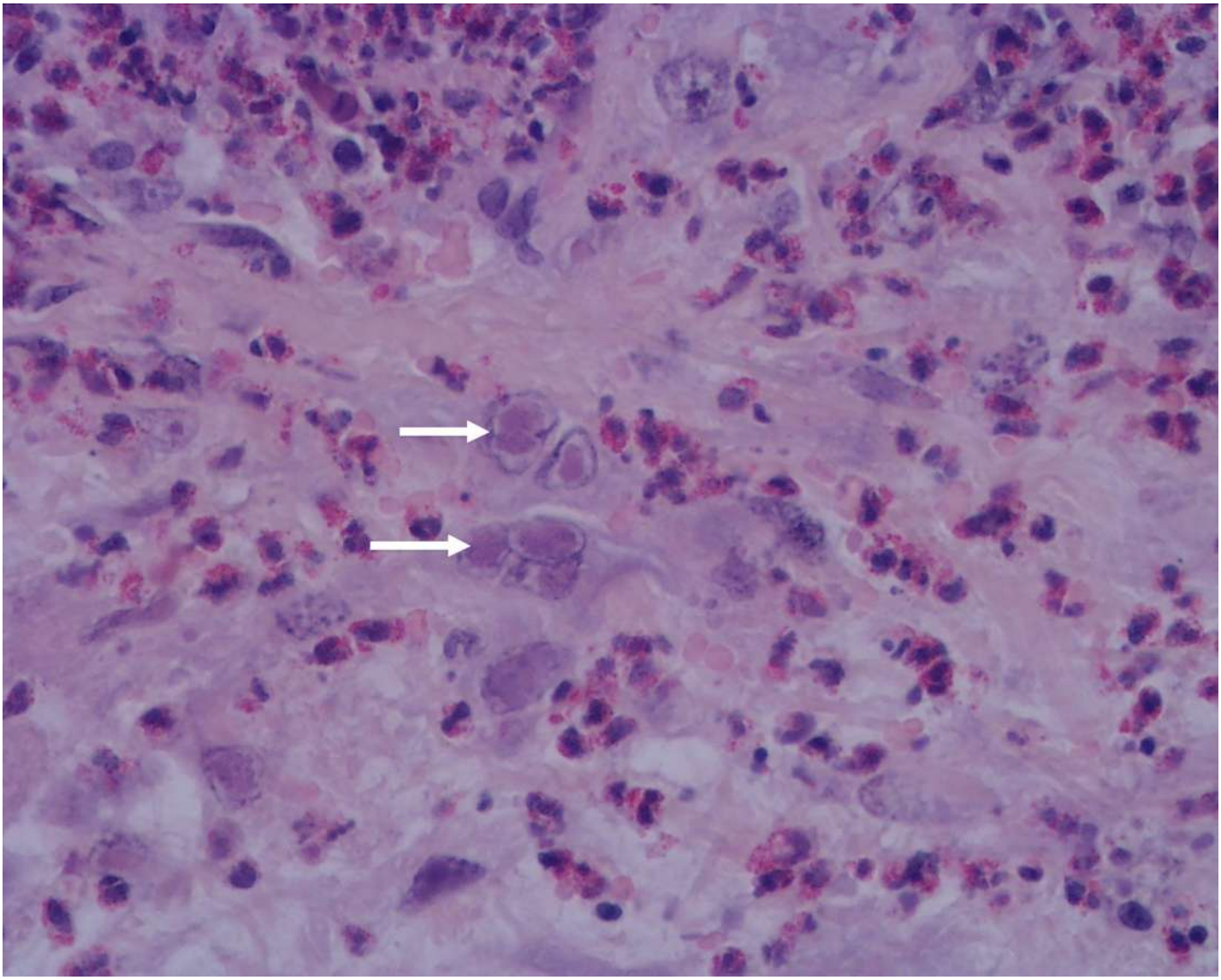


Fig 4. Penis of hare-1. Intranuclear inclusion bodies in mesenchymal cells (arrows) and moderate to severe infiltration by heterophils, H&E, 400x.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g004

Six hares showed doubtful results from which four were MYXV-negative. Parasitological and bacteriological examinations did not reveal any infections that could justify the death of these animals.

3.5. Molecular characterisation of Iberian hare herpesvirus

For 50% of the animals (19/38), an amplicon ~225 bp-long, compatible with herpesvirus, was obtained in the pan-herpesvirus PCR [17]. For six hare samples only a weak band was generated, therefore were not considered for further analysis. The presence of herpesvirus was confirmed by sequencing analysis in 16 hares. For 11 of these amplicons, the nucleotide sequences obtained were independently edited to remove the primer targeting sequences and assembled. The consensus sequences (171 bp) showed 100% similarity to each other. Five of the obtained sequences were submitted to the GenBank (MN557129-33).

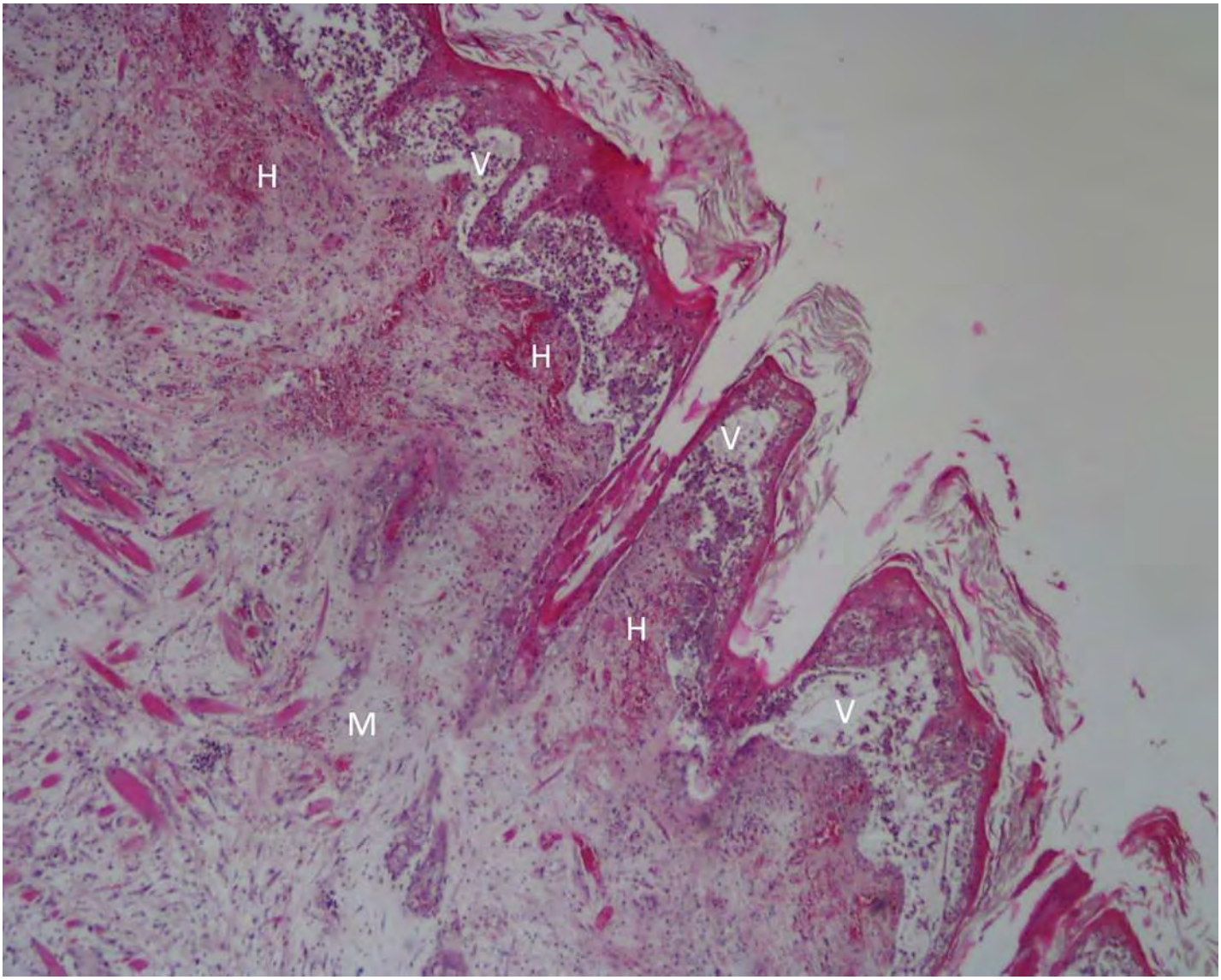


Fig 5. Lip of hare-2. Intraepidermal and subepidermal vesicopustules (V) that appear as "empty spaces" between the dermis and the epidermis, causing the detachment of the epidermis; mixomatous tissue (M) in the dermis characterized by abundant extracellular matrix pulling apart the fibroblasts; microhemorrhages (H) in the uppermost layer of the dermis;. H&E, 40x.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g005

NCBI blast analysis (28.02.2020) of the DNA polymerase nucleotide sequences confirmed homology with herpesvirus *DNA polymerase* coding sequence from other mammals. Though with a low query cover of 48%, 78.31% of similarity was observed with a Phocid herpesvirus 2 (NC_043062.1) and 77.11% with Megabat gammaherpesvirus (LC268920.1) and a Harp seal herpesvirus (KP136799.1).

Blast analysis of the hares' DNA polymerase deduced aa sequences (28.02.2020), showed 52.63% identity over a query cover of 100% with bat herpesviruses (ALH21079.1, ALH21081.1 and ALH21071.1). Similarity was also found with Equid gammaherpesvirus 5 (AAD30141.1) showing 72.50% of identity and 62% of query cover, and with Asinine herpesvirus 4.1 (AAL14768.1), displaying 62% of identity over a query cover of 82%.

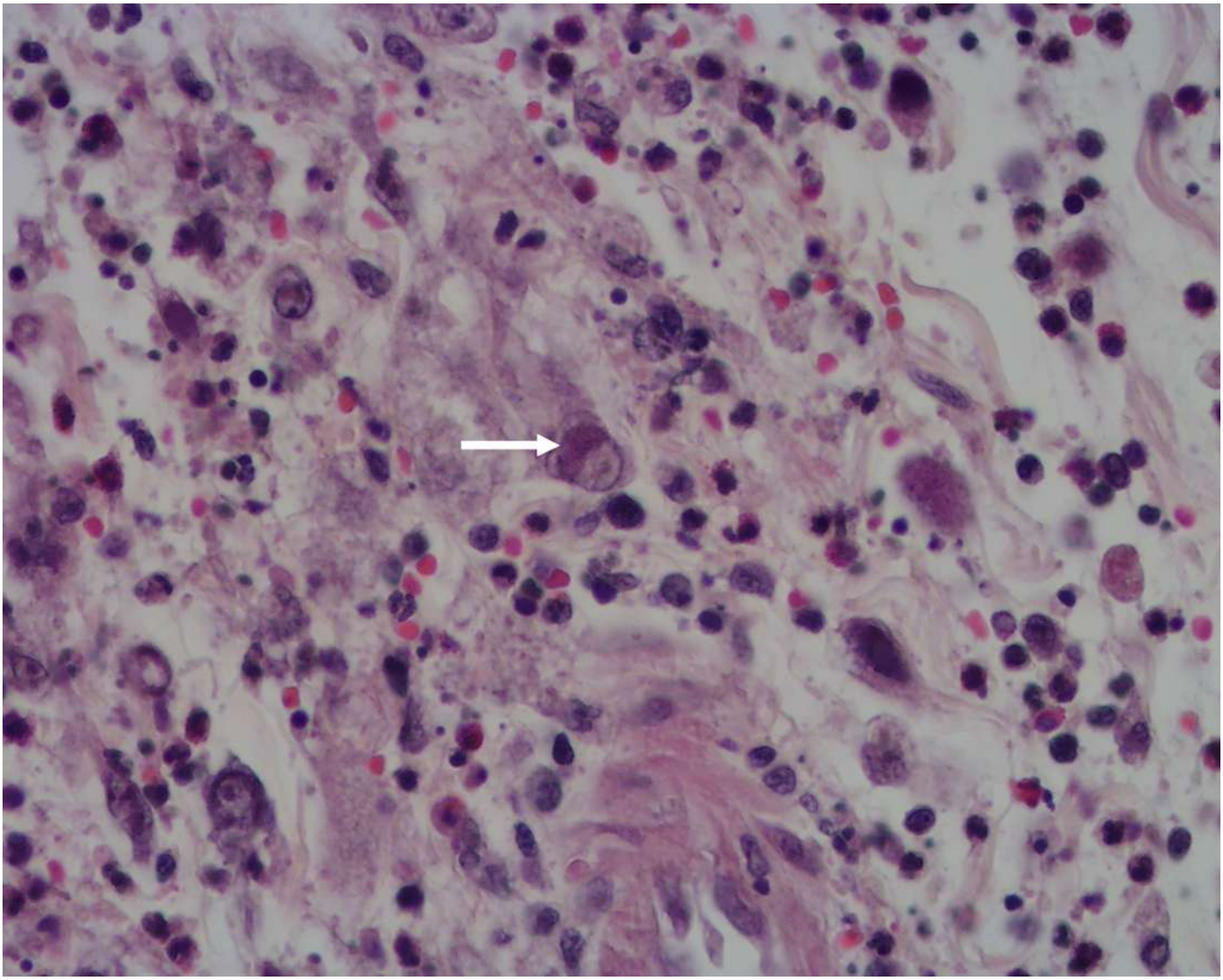


Fig 6. Lip of hare-2. Oedema and inflammatory cell infiltration with signs of necrosis. An intranuclear inclusion body in a mesenchymal cell can be seen (arrow). H&E, 400x.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g006

An amplicon ~500bp long, was obtained from three DNA polymerase positive hare samples, with the genus-specific glycoprotein B (gB) gene primers described by [17].The three gB consensus sequences (453 bp long) showed 100% similarity to each other. These sequences were submitted to the GenBank (MN557129-31).

Blast analysis (23.03.2020) of the MN557129 sequence confirmed homology with Glycoprotein B sequence of known herpesvirus, namely with wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) herpesvirus (GQ169129.1, EF495130.1 and EF128051.2, showing 67.69% to 70.72% similarity with a query cover of 88% to 92%), bank vole (*Myodes glareolus*) rhadinovirus (AY854169.2, 69.56% similarity and 92% query cover), field vole (*Microtus agrestis*) rhadinovirus (EF128052.1,, 67.69% similarity and 92% query cover), and chimpanzee (*Pan troglodytes*) rhadinovirus 1 and 2 (GQ995451.1 and EU085378.1, 65–67% similarity with 97–98% query cover).

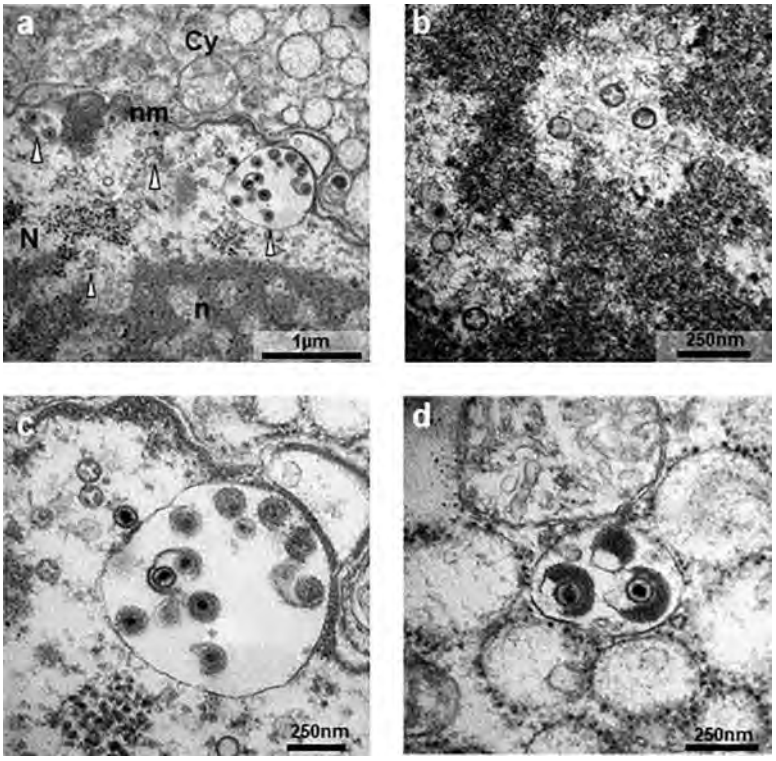


Fig 7. Electron micrographs of penile soft tissue of hare-1. a- Overview of a virus-infected cell (N, nucleus; n, nucleolus; nm, nuclear membrane; Cy, cytoplasm; arrowhead, viral particles); **b**- Naked capsids seen in areas of euchromatin in the nucleolus. **c**- DNA-loaded capsids close to the nuclear membrane in the process of budding into the perinuclear space; **d** Tegument assembly in the cytoplasm of the host cell. Photos obtained in a transmission electron microscope Hitachi H-7000 using iTEM software and Megaview III mid-mounted camera.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g007

3.6. Phylogenetic analysis

It has been shown that, despite reduced, the region amplified by the nested PCR has discriminatory power to allow phylogenetic inferences [16]. To investigate the phylogenetic relationship of the Iberian hare herpesviruses found in this study (represented by sequence MN557129), with other members of the Herpesviridae family, a set of 37 DNA polymerase protein sequences from alpha-, beta- and gammaherpesviruses, obtained from GenBank, were edited to span a 54 to 59 aa-residue region comprising the homologous regions encoded by sequence MN557129.

Despite many polytomies and low bootstrap values, the analysis of the DNA polymerase protein sequences by unrooted Maximum Likelihood method and LG+G+I model [20] corroborated that the herpesvirus sequence from *Lepus granatensis* grouped within the gammaherpesvirus cluster (Fig 8).

To refine the phylogenetic inference within gammahespesviruses, the variability within the gB protein was explored in a set of 45 gammaherpesviruses using the clades described by [17] as reference. Two trees were constructed, the first based on the partial gB protein sequences alone, and the second based on concatenated DNA polymerase and gB sequences. Concatenation enabled greater phylogenetic resolution. The tree with the highest log likelihood (-3335,05) is shown in Fig 9. The accession numbers of the original sequences from which the DNA Polymerase and Glycoprotein B genes were edited, are indicated in the respective legend (Fig 9).

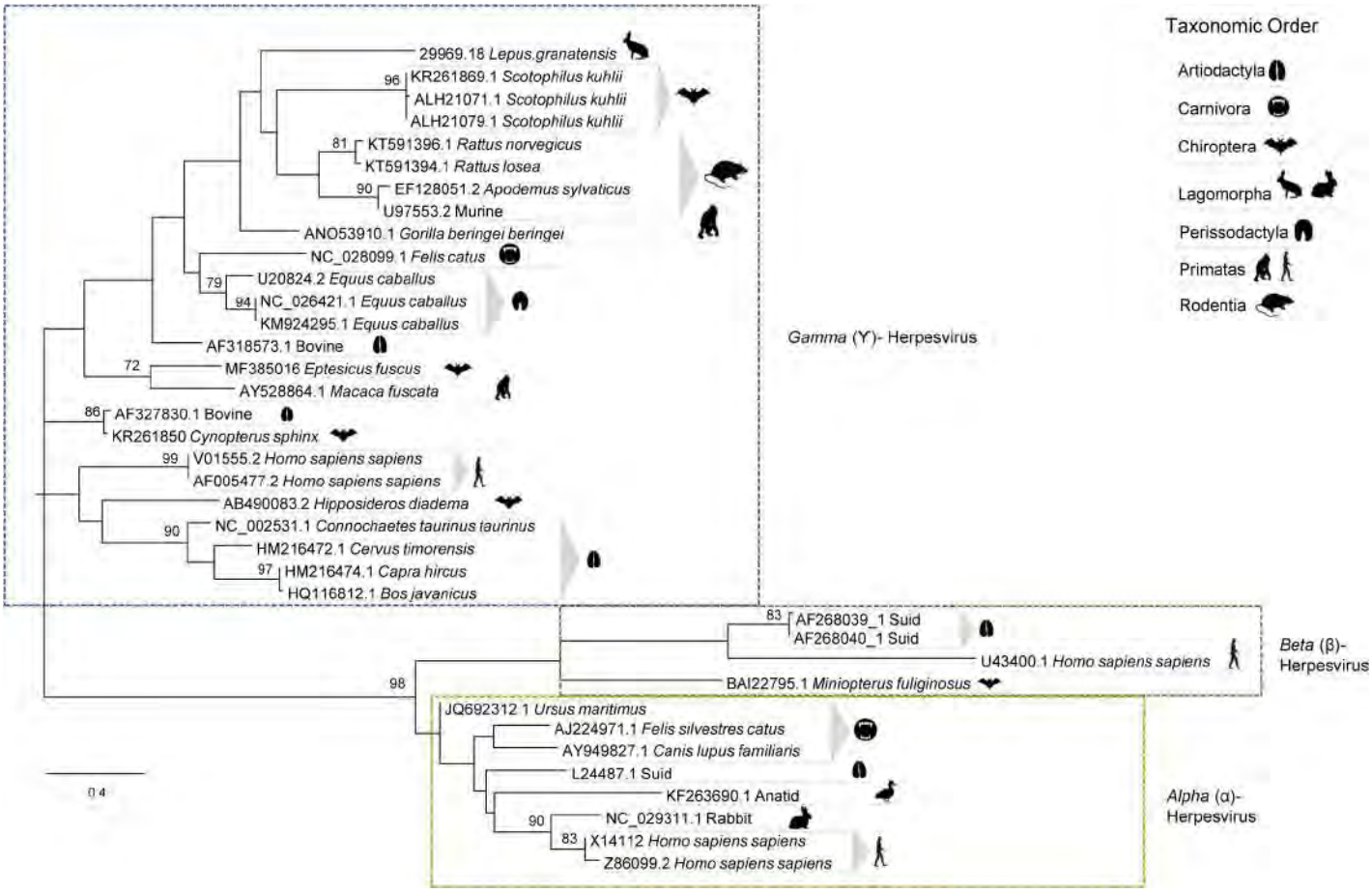


Fig 8. Phylogenetic analysis based on 37 partial *DNA Polymerase* amino acid sequences of herpesviruses from several vertebrate species. The access number of the nucleotide sequences from which the amino acid sequences were deduced are given. The tree with the highest log likelihood (-2432.55) is shown. The LG+G+I model considering 5 categories, [+G] parameter of 0,9929 and [+I] of 11,47% sites was used. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. There were a total of 60 positions in the final dataset. Robustness of the tree nodes was assessed by bootstrapping 1000 times. Only bootstrap values ≥70 are shown. The evolutionary analyses were conducted in MEGA X [18] and the phylogenetic tree was edited in the Figtree software version 1.4.0.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g008

This phylogenetic analysis confirmed that the leporid herpesvirus under study is more closely related with gammaherpesviruses from Murine rhadinovirus (MHV-68 and MuHV-4), *Apodemus flavicollis* rhadinovirus (AflaRHV-1), *Apodemus sylvaticus* rhadinovirus 1 (AsylRHV1), *Apodemus sylvaticus* herpesvirus (WMHV), *Bandicota indica* rhadinovirus 4 (BindRHV-4), *Microtus agrestis* rhadinovirus 1 (MagrRHV1) and *Myodes glareolus* rhadinovirus 1 (MglaRHV1), but clearly diverge from this group, forming a separate clade supported by a bootstrap value of 100 (Fig 9). In this tree, no polytomies were observed.

Despite more information on the genome of this herpesvirus is required, this preliminary analysis suggest that it may represent a specific replicating lineage within the rhadinovirus genus. In accordance, we propose to name this virus Leporid gammaherpesvirus 5 (LeHV-5), following the rabbit alphaherpesvirus 4 (LeHV-4), the only leporid herpesvirus recognised so far as a species by the ICTV.

3.7. Isolation of the viruses in cell cultures

The difficulties found in viral isolation in CRFK, Vero, RK13 and Hella cells may be explained by the fact that LeHV-5 is a gammaherpesvirus.

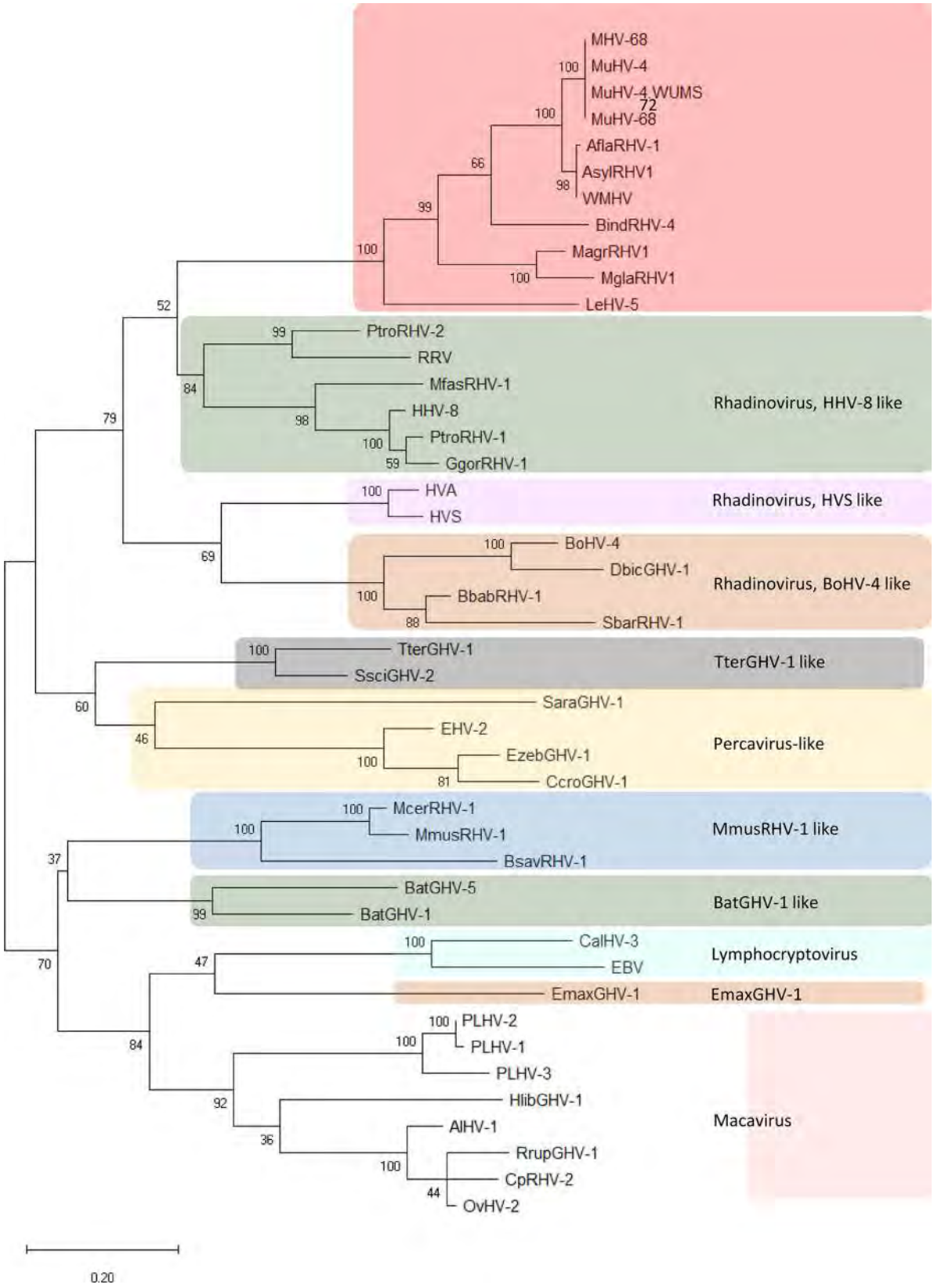

MHV-68
MuHV-4
MuHV-4 WUMS
72
MuHV-68
AflaRHV-1
AsylRHV1
WMHV
BindRHV-4
MagrRHV1
MglaRHV1
LeHV-5
PtroRHV-2
RRV
MfasRHV-1
HHV-8
PtroRHV-1
GgorRHV-1
Rhadinovirus, HHV-8 like
HVA
HVS
Rhadinovirus, HVS like
BoHV-4
DbicGHV-1
BbabRHV-1
SbarRHV-1
Rhadinovirus, BoHV-4 like
TterGHV-1
SsciGHV-2
TterGHV-1 like
SaraGHV-1
EHV-2
EzebGHV-1
CcroGHV-1
Percavirus-like
McerRHV-1
MmusRHV-1
BsavRHV-1
MmusRHV-1 like
BatGHV-5
BatGHV-1
BatGHV-1 like
CalHV-3
EBV
Lymphocryptovirus
EmaxGHV-1
EmaxGHV-1
PLHV-2
PLHV-1
PLHV-3
HlibGHV-1
AlHV-1
RrupGHV-1
CpRHV-2
OvHV-2
Macavirus
0.20

Fig 9. Phylogenetic tree based on 45 concatenated DNA polymerase and glycoprotein B protein sequences (190 aa long) of several gammaherpesviruses inferred by using the Maximum Likelihood method. The tree with the highest log likelihood (-6400.38) is shown. The L+G+I model [19] considering 5 categories, [+G] parameter of 0.85 and [+I] of 11.23% sites was used. There were a total of 188 positions in the final dataset. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Robustness of the tree nodes was assessed by bootstrapping 1000 times. The evolutionary analyses were conducted in MEGA X [18] and the phylogenetic tree was edited in the Figtree software version 1.4.0. Accession numbers: MuHV-68 (U08990.1), MuHV-4 (AF324455.1), MuHV-4.WUMS (NC_001826.2), MuHV (DQ424896.1), AflaRHV-1 (DQ821580.2), AsylRHV1 (EF128051.2), WHMV (GQ169129.1), BindRHV-4 (DQ821581.1), MagrRHV1 (EF128052.1), MglaRHV1 (AY854169.2), PtroRHV-2 (EU085378.1), RRV (AF029302.1), MfasRHV-1 (AY138583), HHV-8 (U75698), PtroRHV-1 (AY138585.2), GgorRHV-1 (AY177144), HVA (AF083424), HVS (X64346), BoHV-4 (AF318573), DbicGHV-1 (AY197560), BbabRHV-1 (AY177146), SbarRHV-1 (AY177147), TterGHV-1 (AF141887), SsciGHV-2 (AY138584), SaraGHV-1 (EU085380), EHV-2 (NC 001650), EzebGHV-1 (AY495965), CcroGHV-1 (DQ789371), McerRHV-1 (DQ821582), MmusRHV-1 (AY854167), BsavRHV-1 (DQ821581), BatGHV-5 (DQ788629), BatGHV-1 (DQ788623), CalHV-3 (AF319782), EBV (AY037858), EmaxGHV-1 (EU085379), PLHV-2 (AY170317), PLHV-1 (AF478169), PLHV-3 (AY170316), HlibGHV-1m (AY197559), AlHV-1 (AF005370), RrupGHV-1 (DQ789369), CpRHV-2 (AF283477), OvHV-2 (NC_007646).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.g009

Despite LeHV-5 seems unable to multiply in human (Hela) and primate (Vero) cells, given the zoonotic potential of some animal herpesviruses, as the case of the cercopithecine alphaherpesvirus 1 [21] and the murine gamma herpesvirus 68 [22], all isolation attempts were carried out in BSL-2 conditions.

4. Discussion and conclusion

This study describes the detection of the first herpesvirus (Leporid gammaherpesvirus 5) in the genus *Lepus* that, according to the phylogenetic analysis based on DNA polymerase and gB concatenated sequences, is more similar to rodent gammaherpesviruses of the rhadinovirus genus.

Viral isolation was not successful in RK13, CRFK or Vero cells. The difficulty in growing the virus *in vitro*, an important step towards its characterisation, may be a consequence of the co-infection with MYXV. The greater ease in the multiplication of MYXV, which grows in many cell cultures [23,24], may have hampered herpesvirus isolation. Moreover, wild animal samples are frequently somewhat autolysed and usually frozen before reaching the laboratory, which may lead to herpesvirus inactivation. The complexity in isolating genital gammaherpesvirus in cell culture was also referred by [25]. The lack of cell cultures from *Lepus* species may pose further challenges.

During our investigation, we observed necrosis of the genitals and herpetic-like vesicles in the lips of hares co-infected with LeHV-5 and MYXV, which were attributed to herpesvirus. The presence of LeHV-5 in the penile of hare-1 was confirmed by PCR and TEM, as shown in Fig 7. Herpesvirus particles were also visualised in epithelial and stroma cells of the eyelid of hare-2.

Notwithstanding the sampling limitation, the fact that macroscopic lesions were only seen in animals with myxomatosis, suggests that MYXV may play a role on herpesvirus replication and/or reactivation by compromising the immune response of the host, leading to the subsequent development of clinical disease with exuberant lesions. Immunosuppression facilitates herpesvirus infections and virus reactivation and it was demonstrated that certain MYXV proteins, such as Serp-1, have strong immune suppressing effects [24]. MYXV infection may hence represent a stress and/or immunosuppressive triggering factor for herpesvirus infection. It is known that stress, disease and other factors such as extreme temperatures can lead to the resurgence of herpesviruses in other species [26]. It was observed that depressed T-cell immune function reduces the quality of immune surveillance resulting in the increase of viral activity [27].

Herpesviruses generally follow one of three distinct strategies [27] within the host, namely i) latency with occasional re-emergence, ii) hit-and-run' approach and iii) slow-and-low' tactic

[27].In the case of LeHV-5, because it affects wildlife, specimens are mainly animals found dead or moribund, limiting the conclusions on the strategy of the virus.

In addition, herpesviruses are frequently found either in the absence of clinical signs or in association with very diverse clinical signs [28].This fact muddles the understanding of the true role and relative contribution of many herpesviruses in the courses of certain diseases, especially with regards to wild species that are often exposed to, and infected by, many pathogens. On the other hand, animal experimentation is complicated by the absence of available specific pathogen free (SPF) specimens, and by the difficulties in keeping hares in captivity, limiting cause-effect experiments. Moreover, during latency, herpesviruses may not be detected by current methods as it is the case of gammaherpesvirus in horses, resulting in an underestimated prevalence in the populations [28,'29]. Reports indicate that equine herpesvirus 2 (EHV-2) can be detected in immunocompetent animals in the absence of signs of disease (revised on [28]) meaning that healthy animals can be a potentially source of viral transmission.

According to our study, based on viral DNA amplification, around half of animals tested (63% symptomatic and 37% asymptomatic) were positive for LeHV-5. However, this value may be an underestimation given that the tropism of LeHV-5 is still unknown, and consequently the tissue samples used for diagnosis may have been inadequate. Thus, we cannot assure that PCR negative animals were not false negatives.

The fact that herpetic lesions were not observed in young, could mean that if the acquisition of LeHV-5 occurs at an early age, primary infection takes place with mild or no symptoms. In the absence of an unbalancing triggering factor such as MYXV infection, LeHV-5 may successfully establish a long-term relationship with the hare host, with subclinical disease and transient viremia. This would explain the detection of herpesvirus DNA in apparently healthy hares.

Interestingly, the gammaherpesvirus identified in external genitalia of the investigated hares was not associated with the development of papillary lesions as in other genital gammaherpesviruses' infections [25]. However, given that hunters, hunting managers and landowners have the opinion that the reproduction of the Iberian hare has been declining in recent years, it is important to clarify if this reduction is also associated with the emergence or circulation of LeHV-5. Other important concern is the potential production of oncogenic proteins by this herpesvirus.

According to our findings, genital herpesvirus may have a critical effect on hares' fertility and reproduction as well as in their survival. Hence, it is crucial to evaluate and understand the extent to which MYXV plays a role in the infection/reactivation of herpesvirus, as well as the putative role of herpesvirus in favouring infection of hares by MYXV or aggravating the severity of myxomatosis clinical forms.

The virological results obtained in this study also disclosed the infection of apparently healthy hares by LeHV-5, suggesting the possible circulation of this virus in the wild populations in a subclinical form. Because herpesvirus-DNA was detected in internal organs (liver and spleen), this asymptomatic infection may be systemic.

Although the Iberian hare populations are still considered stable, no census is available for the populations in Portugal. Presently, we continue monitoring apparently healthy and MYXV-positive hares in mainland Portugal to determine the extent of the geographic distribution of LeHV-5 among the wild hare populations, and the putative association of herpesviruses with the virulence of the recently emerged hare myxoma virus.

It is of paramount importance to evaluate the geographical distribution of the virus in the hare populations, the real extent and severity of the lesions induced in hares by LeHV-5, the persistence and latency of herpesvirus in the wild populations and the LEHV-5-MYXV

associated pathology in order to predict the consequences of the LEHV-5 infection at population level and to evaluate its importance in the future of this iconic species.

Acknowledgments

We thank Sebastião Miguel (Hunting manager), João Carvalho (ANPC), Jacinto Amaro (FENCAÇA), Fernando Castanheira Pinto (CNCP) and Duarte Nuno (ICNF), for sample collection and organization of the sampling events. We are also grateful to Dr.Teresa Fagulha (INIAV, Virology Laboratory) for help with molecular characterization and to Maria João Teixeira (INIAV, Virology Laboratory) for technical assistance. Finally, we also thank to all the hunters who participated in fieldwork and sample collection.

Author Contributions

Conceptualization: F. A. Abade dos Santos, M. D. Duarte.

Data curation: F. A. Abade dos Santos, C. L. Carvalho, M. D. Duarte.

Formal analysis: F. A. Abade dos Santos, C. L. Carvalho, M. D. Duarte.

Funding acquisition: F. A. Abade dos Santos, M. C. Peleteiro, M. D. Duarte.

Investigation: F. A. Abade dos Santos, M. D. Duarte.

Methodology: F. A. Abade dos Santos, A. Pinto, P. Carvalho, P. Mendonça, T. Carvalho, M. D. Duarte.

Project administration: F. A. Abade dos Santos, M. C. Peleteiro.

Resources: M. Monteiro.

Software: F. A. Abade dos Santos, C. L. Carvalho.

Supervision: F. A. Abade dos Santos.

Validation: F. A. Abade dos Santos, M. C. Peleteiro.

Visualization: F. A. Abade dos Santos.

Writing – original draft: F. A. Abade dos Santos, M. Monteiro, A. Pinto.

Writing – review & editing: F. A. Abade dos Santos, M. C. Peleteiro.

References

1. Soriguer R, Carro F. Lepus granatensis. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e. T41306A2953195. 2019. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK
2. Palacios F. On the taxonomic status of the genus Lepus in Spain. Acta Zool. 1983;Fennica 17: 27–30.
3. Fenner F, Fantini B. History of Myxomatosis—an Experiment in Evolution. CABI. Biological Control of Vertebrate Pests. CABI. New York, USA; 1999.
4. Barlow A, Lawrence K, Everest D, Dastjerdi A, Finnegan C, Steinbach F. Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. Vet Rec. 2014; 175: 75–76. https://doi.org/10.1136/vr.g4621 PMID: 25034685
5. Collins JJ. Myxomatosis in the common hare. Ir Vet J. 1955; 9, 268.
6. Wibbelt G. Infectious Diseases in European Brown Hare (Lepus europaeus). 2014. https://doi.org/10.2461/wbp.2005.1.11
7. Bocanegra IG, Dalton KP, Gómez JC. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (Lepus granatensis). 2019; 1–5. https://doi.org/10.1111/tbed.13289 PMID: 31293076
8. OIE. Myxomatosis, Portugal. 2018. Available: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=28628

9. Jin L, Löhr C V., Vanarsdall AL, Baker RJ, Moerdyk-Schauwecker M, Levine C, et al. Characterization of a novel alphaherpesvirus associated with fatal infections of domestic rabbits. Virology. 2008; 378: 13–20. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.003 PMID: 18554680

10. Barthold SW, Griffey SM, Percy DH. Rabbit. 4 th. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. 4 th. 2016. p. 258.

11. Brown J C., Newcomb W W. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis. Curr Opin Virol. 2011; 1: 142–149. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.003 PMID: 21927635

12. Davison AJ, Richard E, Bernhard E, Gary HS, Duncan MJ, Anthony MC, et al. The order of Herpesvirales. Arch Virol. 2009; 154: 171–177. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4 PMID: 19066710

13. Sunohara-Neilson JR, Brash M, Carman S, Nagy É, Turner P V. Experimental infection of New Zealand white rabbits (Oryctolagus cuniculi) with leporid herpesvirus 4. Comp Med. 2013; 63: 422–431. PMID: 24210019

14. David M. Knipe PM. Fields Virology. 6th Editio. In: Williams L, Wilkins, editors. Fields Virology. 6th Editio. Philadelphia, PA, USA; 2013.

15. Graham L, Orenstein JM. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. Nat Protoc. 2007; 2: 2439–2450. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.304 PMID: 17947985

16. Devanter DRVAN, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. 1996; 34: 1666–1671.

17. Ehlers B, Dural G, Yasmum N, Lembo T, de Thoisy B, Ryser-Degiorgis M-P, et al. Novel Mammalian Herpesviruses and Lineages within the Gammaherpesvirinae: Cospeciation and Interspecies Transfer. J Virol. 2008; 82: 3509–3516. https://doi.org/10.1128/JVI.02646-07 PMID: 18216123

18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 2018.

19. H M., K H., Y T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. J Mol Evol. 1985; 22: 160–174. https://doi.org/10.1007/bf02101694 PMID: 3934395

20. Le SQ, Gascuel O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. Mol Biol Evol. 2008; 25: 1307–1320. https://doi.org/10.1093/molbev/msn067 PMID: 18367465

21. Huff JL, Barry PA. Infection in Humans and Macaques: Potential for Zoonotic Disease. Emerg Infect Dis •. 2003; 9.

22. Hricová M, Mistríková J. Murine gammaherpesvirus 68 serum antibodies in general human population. Acta Virol. 2007; 51: 283–287. PMID: 18197737

23. Fenner F, Ratcliffe FN. Myxomatosis. Cambridge Univ Press London, UK. 1965.

24. Spiesschaert B, Mcfadden G, Hermans K, Nauwynck H, Walle GR Van De. The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. Vet Res. 2011; 42: 76. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-76 PMID: 21658227

25. Saliki JT, Cooper EJ, Rotstein DS, Caseltine SL, Pabst D., McLellan WA, et al. A Novel Gammaherpesvirus Associated with Genital Lesions in a Blainville's Beaked Whale (Mesoplodon densirostris). J Wildl Dis. 2006; 42: 142–148. https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.142 PMID: 16699156

26. Izumi Y, Tsuduku S, Murakami K, Tsuboi T, Konishi M, Haritani M, et al. Characterization of bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. J Vet Med Sci. 2006; 68: 189–193. https://doi.org/10.1292/jvms.68.189 PMID: 16520546

27. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation? viral strategies and host response. J Oral Microbiol. 2013; 5: 125–136. https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22766 PMID: 24167660

28. Marenzoni M, Stefanetti V, Danzetta ML, Timoney PJ. Gammaherpesvirus infections in equids: a review. Vet Med Res Reports. 2015; 91. https://doi.org/10.2147/vmrr.s39473 PMID: 30155436

29. Williams KJ, Robinson NE, Lim A, Brandenberger C, Maes R, Behan A, et al. Experimental Induction of Pulmonary Fibrosis in Horses with the Gammaherpesvirus Equine Herpesvirus 5. PLoS One. 2013; 8: 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077754 PMID: 24147074

30. Zygraich N, Berge E. Experimental Infection of Rabbits and Monkeys with Herpesvirus cuniculi. 1972; 13: 241–244.

31. Hesselton RM, Yang WC, Medveczky P, Sullivan JL. Pathogenesis of Herpesvirus sylvilagus infection in cottontail rabbits. Am J Pathol. 1988; 133: 639–647. PMID: 2849303

32. Akatsuka K, Nii S. Tubular Structures Detected in the Nuclei of Human Embryonal Lung Fibroblasts Infected with Human Cytomegalovirus Kazuya AKATSUKA and Shiro NII * of Virology, Okayama Okayama (Accepted for publication, December Various viruses with icosahedral capsids. MicrobiolImmunol. 1986; 30: 289–296.

33. Hinze HC. New Member of the Herpesvirus Group Isolated from Wild Cottontail Rabbits. 1971; 3: 350–354.

34. Brash ML, Nagy É, Pei Y, Carman S, Emery S, Smith AE, et al. Acute hemorrhagic and necrotizing pneumonia, splenitis, and dermatitis in a pet rabbit caused by a novel herpesvirus (leporid herpesvirus-4). Can Vet J. 2010; 51: 1383–1386. PMID: 21358932

35. Roizman B, Pellett P. The family Herpesviridae: a brief introduction. 4th ed. In: Knipe DM, Howley P., editors. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 2381–2397pp.

36. Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). J Virol Methods. 2015; 219: 90–95. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.017 PMID: 25823548

37. Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, Fagulha MT, Ramos F, Luís T, et al. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000. 5L / R. J Virol Methods. 2014; 196: 219–224. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.014 PMID: 24300832

PLOS ONE

CORRECTION

Correction: First description of a herpesvirus infection in genus Lepus

The *PLOS ONE* Staff

The first author's initials appear incorrectly in the citation. The correct citation is: Abade dos Santos FA, Monteiro M, Pinto A, Carvalho CL, Peleteiro MC, Carvalho P, et al. (2020) First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. PLoS ONE 15(4): e0231795. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795.

There are errors in the Author Contributions. The correct contributions are:

Conceptualization: F. A. Abade dos Santos, M. D. Duarte

Data curation: F. A. Abade dos Santos, M. Monteiro, C. L. Carvalho, M. D. Duarte

Formal analysis: F. A. Abade dos Santos, A. Pinto, C. L. Carvalho

Funding acquisition: M. C. Peleteiro, M. D. Duarte

Investigation: F. A. Abade dos Santos, M. Monteiro, A. Pinto, C. L. Carvalho, M. D. Duarte

Methodology: F. A. Abade dos Santos, C. L. Carvalho, M. D. Duarte

Project administration: F. A. Abade dos Santos, M. C. Peleteiro, M. D. Duarte

Resources: F. A. Abade dos Santos, M. Monteiro, A. Pinto, P. Carvalho, P. Mendonça, T. Carvalho, M. D. Duarte

Supervision: M. C. Peleteiro, M. D. Duarte

Validation: F. A. Abade dos Santos

Visualization: F. A. Abade dos Santos, M. Monteiro, A. Pinto, P. Carvalho, P. Mendonça, T. Carvalho

Writing–original draft: F. A. Abade dos Santos, M. D. Duarte

Writing–review & editing: F. A. Abade dos Santos, C. L. Carvalho, M. C. Peleteiro, M. D. Duarte

No authors contributed to Software.

Fig 8 is incorrect. The publisher apologizes for the error. The authors have provided a corrected version here.

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: The *PLOS ONE* Staff (2020) Correction: First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. PLoS ONE 15(5): e0233799. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233799

Published: May 21, 2020

Copyright: © 2020 The PLOS ONE Staff. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

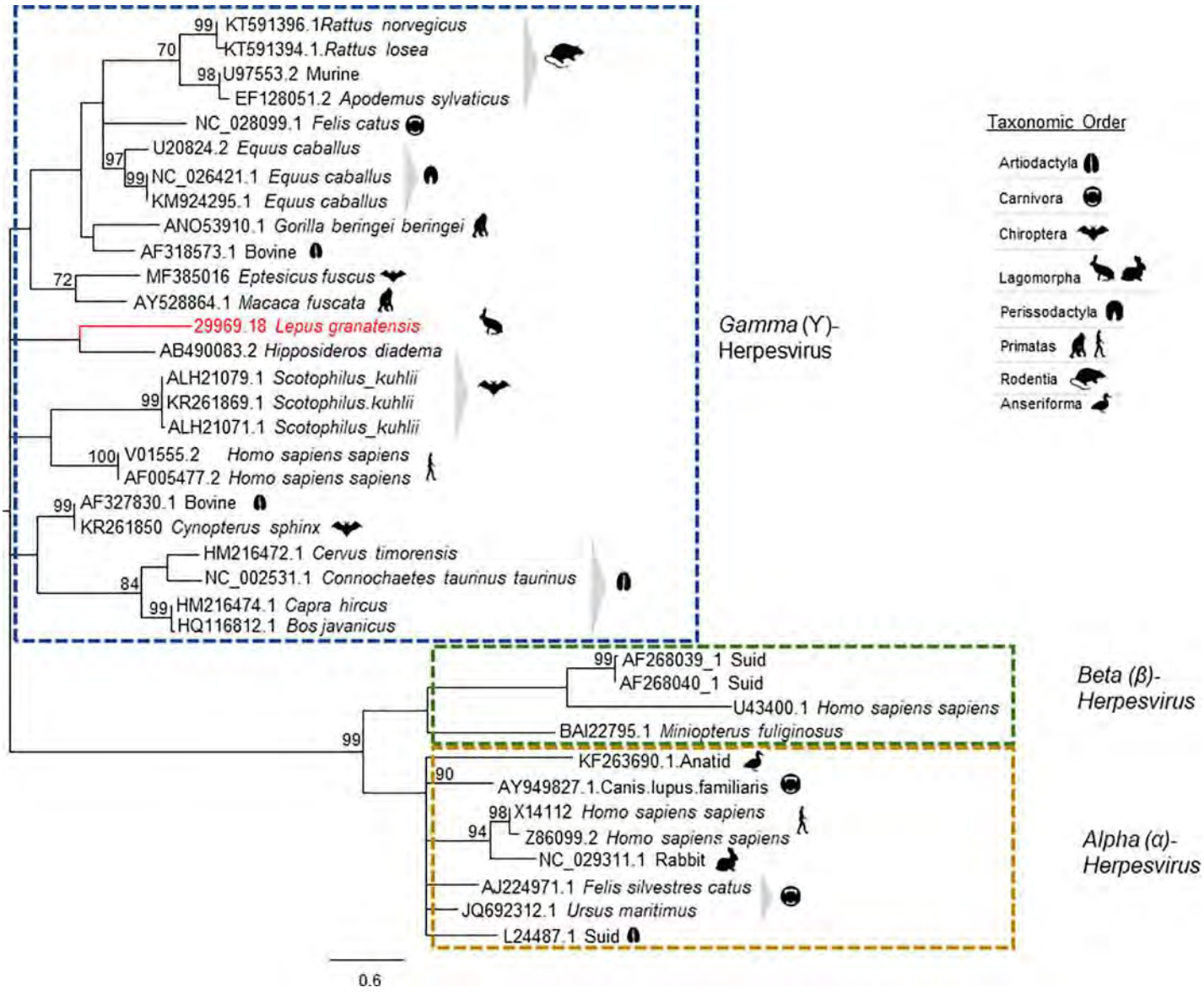


Fig 8. Phylogenetic analysis based on 37 partial *DNA Polymerase* amino acid sequences of herpesviruses from several vertebrate species. The access number of the nucleotide sequences from which the amino acid sequences were deduced are given. The tree with the highest log likelihood (-2432.55) is shown. The LG+G+I model considering 5 categories, [+G] parameter of 0,9929 and [+I] of 11,47% sites was used. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. There were a total of 60 positions in the final dataset. Robustness of the tree nodes was assessed by bootstrapping 1000 times. Only bootstrap values ≥70 are shown. The evolutionary analyses were conducted in MEGA X [18] and the phylogenetic tree was edited in the Figtree software version 1.4.0.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233799.g001

Reference

1. Santos FAAd, Monteiro M, Pinto A, Carvalho CL, Peleteiro MC, Carvalho P, et al. (2020) First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. PLoS ONE 15(4): e0231795. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231795 PMID: 32302375

WILDLIFE

Myxoma virus and rabbit haemorrhagic disease virus 2 coinfection in a European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*), Portugal

Carina Luisa Carvalho ,[1] Fábio Alexandre Abade dos Santos ,[1,2] Teresa Fagulha,[1] Paulo Carvalho,[1] Paula Mendonça,[1] Madalena Monteiro,[1] Margarida Dias Duarte [1,2]

[1]Instituto Nacional de Investigação Agrária e veterinária (INIAV), Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), Oeiras, Portugal
[2]CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, Lisboa, Portugal

Correspondence to
Dr Carina Luisa Carvalho; carina.carvalho@iniav.pt

Received 30 October 2019
Revised 17 February 2020
Accepted 19 February 2020

Check for updates

© British Veterinary Association 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Carvalho CL, Abade dos Santos FA, Fagulha T, *et al*. *Vet Rec Case Rep* Published Online First: [*please include* Day Month Year]. doi:10.1136/vetreccr-2019-001002

SUMMARY

Myxoma virus (MYXV) and rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) are two major pathogens that affect the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Between August 2017 and August 2019, 1166 wild rabbits (971 legally hunted and 195 found dead) were tested by PCR-based methods for MYXV and RHDV2 within the scope of an ongoing surveillance programme on wild leporids in Portugal. Despite never having been reported before and being considered a rare event, coinfection by RHDV2 and MYXV was detected in one juvenile wild rabbit found dead in the Évora district located in Alentejo. The relative frequency of coinfection in the group of diseased rabbits (found dead in the field) was 0.52 per cent (1/195). The positivity percentage of each single virus was much higher, namely, 14.36 per cent (28/195) for MYXV and 55.38 per cent (108/195) for RHDV2, within the 2 years of sample collection considered.

BACKGROUND

Myxoma virus (MYXV) and rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) are the two major pathogen threats for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).[1 2]

MYXV is a large double-stranded DNA *Leporipoxvirus* of the Poxviridae family.[3] In the European rabbit, it causes myxomatosis, a systemic and usually lethal disease[4] endemic in Iberia since 1953.[5] The disease still downregulates the wild rabbit populations, affecting mostly newborn and juvenile rabbits.[2]

RHDV2, a *Lagovirus* of the Caliciviridae family, emerged in France in 2010[6] and induces an acute, highly contagious and often lethal systemic disease in wild and domestic rabbits.[1 6] RHDV2 rapidly replaced the former rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV),[7–9] first reported in 1984 in China.[10] Soon after their emergences, nearly 24 years apart, both viruses quickly spread throughout Europe,[11 12] causing high economic losses in the industry[6 12] and high mortality rates in wild rabbit populations.[1 12]

Serological surveys have demonstrated the concomitant presence of MYXV and RHDV/RHDV2 antibodies in wild rabbits.[13–15] Intriguingly, coinfections by these viruses were never reported in any of the many countries affected by the two diseases and were therefore considered rare or unexpected events.[16]

This study reports a coinfection event by MYXV and RHDV2 in a juvenile wild rabbit (*O cuniculus algirus*) found dead in Portugal.

CASE PRESENTATION

A male juvenile wild rabbit from the Évora district, Alentejo region, South of mainland Portugal, was found dead in the field on 20 February 2019. The animal was tested within the scope of an ongoing national surveillance programme on wild leporids (dispatch 4757/17, 31 May, Portuguese Ministry of Agriculture).

INVESTIGATIONS

Postmortem examination and histopathology

Necropsy of this juvenile wild rabbit was carried out at the National Reference Laboratory for Animal Diseases. During the necropsy, the animal presented poor body condition and skin lesions in the eyelids, ears, upper lips and genitals, suggestive of the nodular form of myxomatosis. Hepatic discoloration and multifocal congestion of the lungs, characteristic of rabbit haemorrhagic disease (RHD), were also observed.

For histopathological examination, skin samples were fixed in 10 per cent buffered formalin and embedded in paraffin using standard procedures. Five micrometre-thick sections were stained with H&E and examined using light microscopy.[17]

Histopathological examination of the eyelids and the upper lips showed typical myxoid tumours (myxomas) (figure 1).

Virological examination

Liver, spleen and lung samples were tested for the presence of RHDV, RHDV2 and MYXV by the PCR-based methods detailed further below. Skin lesions were also used for MYXV investigation.

For the virological screening, each tissue sample was homogenised with phosphate-buffered saline to a final concentration of 20 per cent (w/v) and clarified at 3000*g* for 5 minutes. Total DNA and RNA were extracted from 200 µl of the clarified supernatant, in a BioSprint 96 nucleic acid extractor (Qiagen, Hilden, Germany), using the MagAttract 96 Cador Pathogen kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions.

Samples were tested for RHDV2 RNA by the RT-quantitative PCR (qPCR) by Duarte *et al*[18]

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001002 on 18 March 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on March 26, 2020 by guest. Protected by copyright.

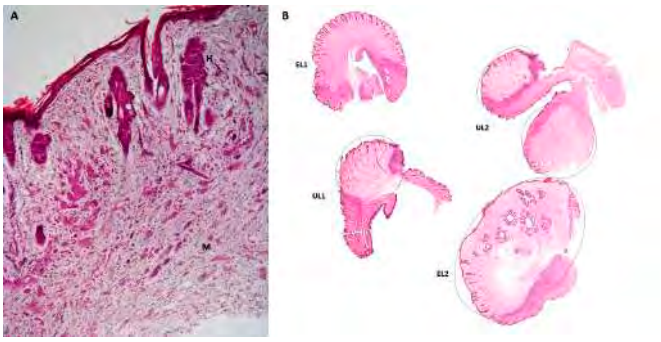


Figure 1 (A) Cross section of the eyelid showing the replacement of dermis by M and moderate H. H&E staining (×40 magnification). (B) Cross sections of the EL (EL1 and EL2) and ULs (UL1 and UL2) showing M nodules, pointed by dashed grey circles. H&E staining, original magnification. EL, eyelid; H, hyperplasia of the epidermis; M, myxoid tissue; UL, upper lip.

referred in the World Organisation for Animal Health (OIE) manual (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf), using the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen). The presence of MYXV DNA was investigated by the qPCR by Duarte *et al*,[19] also recommended in the OIE manual (https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_MYXO.pdf), using the FastStart TaqMan Probe Master Kit (Roche, Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany). For the real-time systems described, undetectable Cq or Cq values of >38.00 were considered negative. Positive controls were included in each reaction. Negative controls contained PCR-grade water.

Both MYXV DNA and RHDV2 RNA were detected in the liver, spleen and lungs of the juvenile wild rabbit. For RHDV2, as expected, the viral loads found in a pool of liver and spleen (9.09×10^8 copies/mg) were higher than those in the lungs (7.37×10^7 copies /mg).

MYXV DNA was detected in a skin lesion, where higher viral loads (2.49×10^7 copies/mg) were found, when compared with a pool of liver and spleen (6.87×10^5 copies/mg) or lungs (7.47×10^5 copies/mg) (figure 2). The lower viral loads detected in the internal organs suggest that MYXV replicates to low titres in the liver and lungs or may represent the contamination of organs with blood during the viraemic phase.

To rule out any contamination, samples from the juvenile wild rabbit were extracted *de novo* and retested, generating similar results.

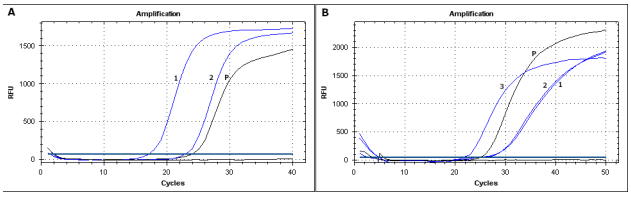


Figure 2 Amplification curves of (A) RHDV2 detection in the liver and spleen (1) (Cq value of 17.14) and lungs (2) (Cq value of 22.97), and (B) MYXV detection in the liver and spleen (1) (Cq value of 29.09), lungs (2) (Cq value of 28.98) and skin (3) (Cq value of 23.37). The negative controls (without nucleic acid) are the flat black lines seen below the thresholds. Cq, quantification cycle; P, positive control; RHDV2, rabbit haemorrhagic disease virus 2; MYXV, myxoma virus; RFU, Relative Fluorescence Units,

Screening for the classical strains of RHDV was performed by conventional PCR with primers RC-9 and RC-10[20] using the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen). As expected, since the classical strains no longer circulate, the animal tested negative.

The full RHDV2 VP60 gene was amplified using the pairs of primers 27F[21] and 986R[22] and 717 F[22] and 10 R.[20] The fragment was excised from agarose gel after electrophoresis, purified using the NZYGelpure kit (NzyTech, Genes and Enzymes, Lisbon, Portugal) and sequenced in an automated 3130 Genetic Analyser system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using the BigDye Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The sequence was submitted to GenBank database and given the accession number MN894670. Using the Basic Local Alignment Search Tool BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), our sequence revealed high similarity with RHDV2 strains circulating in the Alentejo region in previous years (namely, with strain MG763940).

Parasitological and bacteriological examinations

Parasitological examination revealed light coccidian infections with *Eimeria stidae* in the liver and *E perforans* in the faeces, as well as the intestinal nematodes *Graphidium strigosum* and *Passalurus ambiguous*.

Liver, spleen and lung samples collected from this rabbit cadaver were analysed using standard bacteriological methods. *Staphylococcus xylosus*, a commensal bacterium found in mammals' skin and mucous membranes,[23] was isolated from a pool of organs, including the liver, spleen and lung.

None of these infections explains the animal death.

DISCUSSION

In this study, we report the detection of a juvenile wild rabbit coinfected with RHDV2 and MYXV. This animal was found dead in the South of mainland Portugal in late winter 2019.

Since RHDV, RHDV2 and MYXV have emerged, hundreds of animals were tested worldwide for *Leporipoxvirus* and *Lagovirus*. Interestingly, although both RHD and myxomatosis are mechanically transmitted by arthropod vectors and their dissemination is facilitated by an increase in the wild rabbit population density, there are no previous reports of coinfection. However, interaction between RHD and myxomatosis has been described before.[13–15] Mutze *et al*[13] proposed, regarding the possible mechanisms of the interaction between RHD and myxomatosis, that when RHD is most active during spring, RHD outcompetes myxomatosis due to the longer incubation time of the latter, which could explain the infrequency of such coinfection events. Assuming similar likelihood of transmission from infective to susceptible animals, RHD would kill most rabbits before they became infective for myxomatosis.[13] In fact, in Australia, the introduction of RHD caused an important change in the timing of myxomatosis outbreaks by displacing these occurrences to autumn and delaying or eliminating the spring–summer outbreaks.[13] Additionally, Marchandeau *et al*[14] hypothesised, based on serological data, that exposure to one virus could increase the probability of developing the other disease. García-Bocanegra *et al*[24] showed that seropositivity to lagoviruses was associated with seropositivity to myxomatosis, as 70 per cent of the rabbits that were seropositive to lagoviruses had been also exposed to MYXV.

The coinfection event described here required the interaction between myxomatosis and RHD either by the contemporary overlapping of the two epidemics or a scenario of an endemic situation of myxomatosis plus an epidemic wave of RHDV2.

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001002 on 18 March 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on March 26, 2020 by guest. Protected by copyright.

None of the nine wild rabbit cadavers collected in the same geographical area of the index case between 20 February and 10 May 2019 were simultaneously positive for both viruses, with most of the rabbits testing positive only for RHDV2 (7/9, 77.78 per cent), which suggests an ongoing RHDV2 outbreak.

The occurrence of an RHDV2 outbreak at that time of the year is in accordance with the seasonality of the disease in Iberia. In Portugal, RHDV2 mortality is higher in the cooler months (December–March), in association with the annual inflow of susceptible young rabbits during the breeding season that takes place during the winter and spring, reaching a peak of incidence in January and February.[25] Regarding myxomatosis, the disease can occur throughout the whole year in Europe, although seasonality is observed in Iberia.[24 26 27] As with RHDV2, myxomatosis outbreaks frequently synchronise with the appearance of a large number of susceptible young rabbits, such as the juvenile of this case report, and with the abundance of arthropod vectors.[2] Fleas and mosquitoes are mechanical vectors of MYXV[28 29] and RHDV2,[30–33] and in Portugal, the 2018–2019 winter was mild, favouring to the presence of these arthropods.

Although the clinical history of the juvenile wild rabbit is irretrievable, its poor body condition, compatible with a longer-lasting infection, is more plausible to be caused by MYXV. The severity of the lesions observed in the liver and lungs suggests that RHDV2 infection took place when the animal was already suffering from myxomatosis. The immunosuppressive effect of MYXV increases the risk of other infections,[34] making it possible that infection with MYXV may have favoured RHD virus infection.

In Portugal, viral surveillance of RHD and myxomatosis, both endemic in the entire national territory, was recently strongly intensified within the scope of a national surveillance programme on wild leporids. Since its implementation in August 2017 until August 2019, 1166 wild rabbits legally hunted (n=971) and found dead (n=195) were systematically tested by PCR-based methods for RHDV, RHDV2 and MYXV. For this 2-year period, RHDV2 and MYXV infections were responsible for the death of 70.83 per cent of the animals found in the field, and no coinfections were detected. This may suggest a viral interference phenomenon, in accordance with Mutze *et al*[13] results. Apart from the coinfected animal, the only wild rabbit from the affected area that tested MYXV positive (1/9, 11.11 per cent) was RHDV2 negative.

Data produced by the ongoing surveillance programme on wild leporids show that the number of positive cases for each disease has been higher in Alentejo and Algarve[35] (NUT 2 regions in the South), compared with the rest of the national territory. In the district of Évora, where the coinfected wild rabbit was collected, the percentages of positivity (PP) in the sample of diseased animals (found dead) for MYXV and RHDV2 were 9.09 per cent (5/55) and 76.37 per cent (42/55), respectively, indicating the contemporary circulation of both viruses in the wild populations. For apparently healthy hunted animals, the PPs found in that district for MYXV and RHDV2 were 6.91 per cent (11/159) and 0 per cent (0/159), respectively.

From August 2017 onwards, apart from the case reported here, no other wild rabbits were found simultaneously infected by both viruses, confirming that this event is extremely rare when compared with single infections by MYXV and RHDV2. In the group of diseased wild rabbits found dead in the field, sampled between August 2017 and August 2019, coinfection represents 0.52 per cent (1/195), much lower than single infections by MYXV (14.35 per cent, 28/195) and RHDV2 (55.38 per cent, 108/195). Our results reflect the high pathogenicity of both viruses, showing that more than half of the animals found in the field died of RHDV2 infection, while MYXV accounted for one in seven of the deaths.

As expected, the PPs for the group of hunted animals are much lower for both viruses, namely 4.33 per cent (42/971) for MYXV and 0.62 per cent (6/971) for RHDV2. The differences in the PP ratios (found dead/hunted), 89.9 per cent for RHDV2 and 3.3 per cent for MYXV, indicate a shorter course disease for RHDV2 infections and higher mortality compared with myxomatosis.

To our knowledge, viral coinfections were never reported in wild rabbits, despite in other species, this event is common. Examples of coinfections are provided by MYXV and leporid herpesvirus 5 in the Iberian hare,[36] feline herpesvirus 1 and feline calicivirus in cats,[37] or peste des petits ruminants virus and foot-and-mouth disease virus in goats.[38]

Generally, coinfections are believed to exert a negative effect on the hosts' health, but little is yet known about the effect that one pathogen has on the other and on the implications of coinfection to the host. Viral interference, where one virus competitively suppresses replication of the other coinfecting viruses, is the most common outcome of coinfection. It may be mediated by various factors, such as interferons, defective interfering particles and cellular factors, among others. Nevertheless, coinfections of certain viruses may also promote an increase or may have no effect on virus replication, allowing, in the latter, for coinfecting viruses to coexist (accommodation), (Reviewed in Kumar *et al*).[39]

Although from an epidemiological point of view the impact of the coinfection by RHDV2 and MYXV in the wild rabbit populations appears minor since it is a rare event, this possibility must be taken into account, especially in the context of diagnosis, where it is common to attribute a viral disease to the infection by a single agent. The contribution of multiple-agent infections in the clinical outcome is rarely considered, which may lead to failure in the detection of additional agents.[39] In the case reported here, the molecular diagnosis for MYXV and RHDV2 were also corroborated by the observation of histopathological lesions typical of both diseases.

More than reporting an RHDV2–MYXV coinfection event in a wild rabbit, this paper aimed to raise awareness of the need to perform both diagnoses in areas where the two diseases are endemic, even when skin lesions are not yet present.

Learning points

- During a 2-year period, starting in August 2017, a national ongoing surveillance programme on wild leporids tested 1166 wild rabbits for myxoma virus (MYXV) and rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2).
- In the sampling group diseased animals found dead, 14.35 per cent (28/195) and 55.38 per cent (108/195) were found positive for MYXV and RHDV2, respectively.
- A coinfection with MYXV and RHDV2 was detected in one juvenile wild rabbit found dead in Alentejo, Évora district, South Portugal.
- MYXV and RHDV2 coinfection is a rare event compared with single infections, representing a relative frequency of 0.52 per cent (1/195) in the group of diseased animals found dead.

Contributors CLC carried out the experimental work regarding the virological screening and sequencing analysis and wrote the manuscript. FAAdS assisted in the necropsies and, along with TF, helped in writing the manuscript. PC, PM and MM carried out the anatomohistopathological examinations. MDD conceived the

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001002 on 18 March 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on March 26, 2020 by guest. Protected by copyright.

experiments and wrote and revised the manuscript. All authors discussed the results and contributed critically to the final document.

Funding This study was supported by Project +Coelho 2, financed by the Fundo Florestal Permanente, Portuguese Ministry of Agriculture and by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) (Project Fight-two: PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020). FAAdS holds a PhD grant from FCT (SFRH/BD/137067/2018).

Competing interests None declared.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available in a public, open access repository.

ORCID iDs
Carina Luisa Carvalho http://orcid.org/0000-0002-6648-9254
Fábio Alexandre Abade dos Santos http://orcid.org/0000-0002-0696-7322
Margarida Dias Duarte http://orcid.org/0000-0003-1488-9659

REFERENCES

1 Delibes-Mateos M, Ferreira C, Carro F, *et al*. Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerg Infect Dis* 2014;20:2166–8.
2 Villafuerte R, Castro F, Ramírez E, *et al*. Large-scale assessment of myxomatosis prevalence in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) 60years after first outbreak in Spain. *Res Vet Sci* 2017;114:281–6.
3 Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al*. - *virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. sixth report of the International Committee for the taxonomy of viruses. Archives of virology, 1995*. Vienna: Springer Verlag: 586.
4 Fenner F, Ratcliffe FN. *Myxomatosis*. Cambridge University Press, 1965.
5 Guixeras J. *Tratado de la mixomatosis*. Graf. Bat, Salt, Girona, 1957: 126 pp.
6 Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, *et al*. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* 2011;168:137–8.
7 Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, *et al*. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res* 2013;44:81.
8 Lopes A, Correia J, Abrantes J, *et al*. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 2015;7:27–36.
9 Mahar JE, Hall RN, Peacock D, *et al*. Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *J Virol* 2018;92:e01374–17.
10 Liu SJ, Xue HP, BQ P, *et al*. A new viral disease of rabbits. *Animal Husbandry Vet Med* 1984;16:253–5.
11 Rouco C, Aguayo-Adán JA, Santoro S, *et al*. Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2/RHDV2/b). *Transbound Emerg Dis* 2019;66:1762–4.
12 Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, *et al*. Rabbit haemorrhagic disease (RhD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 2012;43:12.
13 Mutze G, Bird P, Kovaliski J, *et al*. Emerging epidemiological patterns in rabbit haemorrhagic disease, its interaction with myxomatosis, and their effects on rabbit populations in South Australia. *Wildlife Research* 2002;29:577–90.
14 Marchandeau S, Bertagnoli S, Peralta B, *et al*. Possible interaction between myxomatosis and calicivirosis related to rabbit haemorrhagic disease affecting the European rabbit. *Vet Rec* 2004;155:589–92.
15 García-Bocanegra I, Astorga RJ, Napp S, *et al*. Factors affecting the seroprevalence of lagovirus infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in southern Spain. *Vet J* 2011;189:89–94.
16 Fulford GR, Lee XJ, Berman D, *et al*. *Interaction of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease in wild rabbit*. 19th international Congress on modelling and simulation, Perth, Australia, 2011.
17 Cook HC. Origins of … tinctorial methods in histology. *J Clin Pathol* 1997;50:716–20.
18 Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, *et al*. A real time TaqMan RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 2015;219:90–5.
19 Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, *et al*. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. *J Virol Methods* 2014;196:219–24.
20 Tham KM, Barnes SM, Hunter SN. Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. *Virus Genes* 1999;18:235–42.
21 Le Gall G, Arnauld C, Boilletot E, *et al*. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J Gen Virol* 1998;79:11–16.
22 Duarte M, Carvalho C, Bernardo S, *et al*. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. *Infect Genet Evol* 2015;35:163–71.
23 Dordet-Frisoni E, Dorchies G, De Araujo C, *et al*. Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:7199–209.
24 García-Bocanegra I, Astorga RJ, Napp S, *et al*. Myxomatosis in wild rabbit: design of control programs in Mediterranean ecosystems. *Prev Vet Med* 2010;93:42–50.
25 Rouco C, Abrantes J, Serronha A, *et al*. Epidemiology of RHDV2 (Lagovirus europaeus/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal. *Transbound Emerg Dis* 2018;65:e373–82.
26 Ross J, Tittensor AM. The establishment and spread of myxomatosis and its effect on rabbit populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1986;314:599–606.
27 Simón MC, Ortega C, Maynar P, *et al*. Studies in wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) populations in Navarra (Spain). II. epidemiology of myxomatosis. *Gib Faun Sauv Gam* 1998;15:103–21.
28 Fenner F, Day MF, Woodroofe GM. Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J Hyg* 1956;54:284–303.
29 Flowerdew JR, Trout RC, Ross J. Myxomatosis: population dynamics of rabbits (Oryctolagus cuniculus Linnaeus, 1758) and ecological effects in the United Kingdom. *Rev Sci Tech* 1992;11:1109–13.
30 Lenghaus C, Westbury H, Collins B, *et al*. Overview of the RHD project in Australia. In: *Rabbit haemorrhagic disease: issues for assessment for biological control (R.K. Munro and R.T. Williams*. Canberra: Australian Government Printing Service, 1994: 104–29.
31 Asgari S, Hardy JR, Sinclair RG, *et al*. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 1998;54:123–32.
32 Cooke BD. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech* 2002;21:347–58.
33 McColl KA, Merchant JC, Hardy J, *et al*. Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiol Infect* 2002;129:655–63.
34 Marlier D, Mainil J, Linde A, *et al*. Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains. *Vet J* 2000;159:171–8.
35 Duarte M, Carvalho CL, Santos FA, *et al*. *"+Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral". Relatório de atividades na época venatória 2017-2018*. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF., 2018.
36 Abade dos Santos FA, Monteiro M, Pinto A, *et al*. First description of a herpesvirus infection in genus *Lepus*. *BioRxiv.* 2020 https://doi.org/
37 Zicola A, Saegerman C, Quatpers D, *et al*. Feline herpesvirus 1 and feline calicivirus infections in a heterogeneous cat population of a rescue shelter. *J Feline Med Surg* 2009;11:1023–7.
38 Kumar N, Barua S, Riyesh T, *et al*. Complexities in isolation and purification of multiple viruses from mixed viral infections: viral interference, persistence and exclusion. *PLoS One* 2016;11:e0156110.
39 Kumar N, Sharma S, Barua S, *et al*. Virological and immunological outcomes of coinfections. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00111–7.

Copyright 2020 British Veterinary Association. All rights reserved. For permission to reuse any of this content visit
http://www.bmj.com/company/products-services/rights-and-licensing/permissions/
Veterinary Record Case Reports subscribers may re-use this article for personal use and teaching without any further permission.

Subscribe to Vet Record Case Reports and you can:
- Submit as many cases as you like
- Enjoy fast sympathetic peer review and rapid publication of accepted articles
- Access all the published articles
- Re-use any of the published material for personal use and teaching without further permission

For information on Institutional Fellowships contact consortiasales@bmjgroup.com

Visit vetrecordcasereports.bvapublications.com for more articles like this and to become a subscriber

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001002 on 18 March 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on March 26, 2020 by guest. Protected by copyright.

WILDLIFE

First cases of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Portugal

Carina Luísa Carvalho [1], Fábio Alexandre Abade dos Santos [1,2], Madelena Monteiro,[3] Paulo Carvalho,[3] Paula Mendonça,[3] Margarida Dias Duarte [1,2]

[1]Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Virology Laboratory, Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), Oeiras, Portugal
[2]Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidadede Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, Lisboa, Portugal
[3]Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Pathology Laboratory, Av. da República, Quinta do Marquês (edifício sede), Oeiras, Portugal

Correspondence to
Dr Carina Luísa Carvalho; carina.carvalho@iniav.pt

Received 6 December 2019
Revised 6 March 2020
Accepted 18 March 2020

Check for updates

© British Veterinary Association 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Carvalho CL, Abade dos Santos FA, Monteiro M, *et al*. *Vet Rec Case Rep* Published Online First: [*please include* Day Month Year]. doi:10.1136/vetreccr-2019-001044

SUMMARY

Myxomatosis was detected in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Portugal, October 2018, following its emergence in Spain 3 months earlier. Here, we describe the epidemiological, molecular and anatomo-histopathological data of the first two cases. Myxoma virus DNA was detected in the eyelids, nose and perineal region in both hares. It was also detected in the lungs of hare 1 and in the spleen and liver of hare 2. The genomic insertion identified in strains from Spain was confirmed in both strains suggesting a common origin for the Iberian viruses. Gross lesions in hare 1 included palpebral oedema and conjunctival mucopurulent discharge, common in both forms of the disease in rabbits. Hare 2 presented eyelid thickening with small diffuse nodules. Histopathology of the eyelids showed extracellular myxoid matrix in hare 1 and purulent dermatitis in hare 2. Both animals exhibited good body condition, suggesting a short course of the disease and higher virulence of the virus towards the Iberian hare.

BACKGROUND

Myxomatosis is a systemic infection of wild European and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by myxoma virus (MYXV), a large double-strand DNA *Leporipoxvirus* (family Poxviridae and subfamily Chordopoxvirinae)[1] first described in Uruguay in 1896.[2] The MYXV genome consists of 163 kbp and the virus replicates in the cytoplasm of infected cells.[1]

MYXV naturally infects some rabbit species of the genus *Sylvilagus*, native from South America and California, causing few clinical signs, usually an innocuous cutaneous fibroma, which persists for some weeks followed by its regression.[3–5] Only occasionally more generalised disease may occur.[4 6] Conversely, in the European rabbit, MYXV causes a generalised, and often lethal, disease characterised by swollen head, eyelids and ears, raised cutaneous lesions over the body, ears and legs, oedema of the external genitalia and anus, blepharo-conjunctivitis and mucopurulent ocular and nasal discharge (revised in Kerr *et al*[5]). Not all MYXV strains induce the formation of the typical myxoid tumours (myxomas) on the skin, which is the main characteristic of the nodular form of the disease. Amyxomatosis or atypical myxomatosis is characterised by minor cutaneous signs and intense respiratory distress.[4 7–9]

Initially, the virus caused mortality rates of 99.8% in the European rabbit populations[10] but, within a few years, slightly attenuated strains of MYXV became more dominant. Their lower virulence allowed for infected rabbits to survive longer, hence increasing the probability of mechanical viral transmission from skin lesions by mosquito and flea vectors.[11 12] Simultaneously, natural selection acted on the wild rabbit populations, resulting in the appearance of animals resistant to myxomatosis,[12 13] probably due to an effective cellular immune response.[14]

Since the introduction of MYVX in Europe in the early 1950s, and until recently, myxomatosis was only sporadically reported in the European hare (*Lepus europaeus*)[15] and in mountain hare (*Lepus timidus*)[4 10 16] even though it was considered a rabbits' disease.[17] However, in mid-2018 this scenario drastically changed. Events of mortality in Iberian hares (*Lepus granatensis*) were described in several provinces of south and central Spain.[18] Most of the animals were found dead in the same place, suggesting direct transmission of the pathogen among hares, or in a moribund state with clinical signs of blindness, weakness and disorientation.[18 19]

The genome of the virus identified in Iberian hares was recently analysed and sequenced revealing a new recombinant MYXV with an insertion of ~2800 bp in the left side of the genome.[18 19] This insertion may have resulted from recombination within the genome of MYXV[20] or between the genetic material from MYXV and a capri-poxvirus or cervi-poxvirus.[19 20] It was mapped within the M009 gene with respect to MYXV, harbouring four ORFs phylogenetically related to MYXV genes M060, M061, M064 and M065.[20]

From October onward, the disease was also registered in South of mainland Portugal . Here, we describe the epidemiological, molecular and anatomo-histopathological data of the first two cases of myxomatosis in Iberian hares detected in Portugal.

CASE PRESENTATION

In late October 2018, an adult female (hare 1) Iberian hare (*L granatensis*) that presented oedema of the eyelids and perineal area was hunted in a reserve located in the municipality of Évora, South of mainland Portugal. A few days later, in 3 November 2018, an adult male (hare 2) that showed nodules in the eyelids, nose and lips was found dead in a hunting area of the municipality of Beja, located South of Évora.

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001044 on 12 April 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on April 13, 2020 by guest. Protected by copyright.

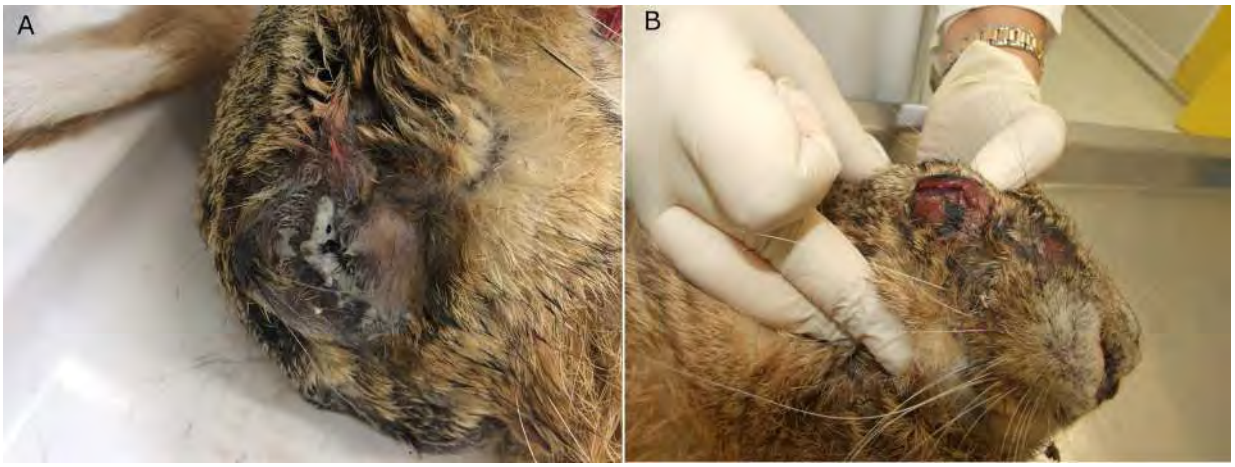


Figure 1 Macroscopic lesions found in the Iberian hares. Oedema of the eyelids and conjunctival mucopurulent discharge (A) observed in hare 1. Eyelid thickening with small diffuse nodular lesions (B) found in hare 2.

The two hares were collected and tested within the scope of an ongoing national surveillance programme on wild leporids within an action plan for the control of RHDV2 in wild rabbits (Dispatch 4757/17, 31 May, Portuguese Ministry of Agriculture).

INVESTIGATIONS

Postmortem examination and histopathology

Necropsies of both animals were carried out at the National Reference Laboratory for Animal Diseases (INIAV I.P.). Both animals were in good body condition.

Hare 1 presented conjunctival mucopurulent discharge and oedema of the eyelids (figure 1A), nose, lips and genitalia resembling the lesions observed in infected rabbits. Nodular lesions of the anal and genital mucosa were also observed . Traumatic fracture of the ribs and hemothorax were registered and attributed to the hunting shot.

In hare 2, eyelid thickening and small diffuse nodular lesions were observed in the nose, lips and eyelids (figure 1B). Pulmonary congestion was also registered.

For histopathological examination, skin samples, namely from eyelids, nose and perineal region, were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin using standard procedures. Five-micrometre-thick sections were stained with H&E and examined using light microscopy.[21]

In hare 1, eyelid lesions showed moderate epidermal hyperplasia, ballooning of epithelial cells and extensive ulceration of the epidermis with crust formation. In the dermis, proliferation of spindle and star cells surrounded by abundant extracellular matrix conferred the typical myxoid aspect. Extensive heterophilic cell infiltration in the dermal layer and intradermal pustules were also registered. Some of these features are shown in figure 2. The eyelids of hare 2 presented extensive epidermal necrosis and infiltration of the dermis where pustules with crust formation were also present.

Virological examination

For virological examination, liver, spleen, lungs and skin were homogenised with PBS and clarified at 3000 *g* for 5 min. Total DNA and RNA were extracted from 200 µl of the clarified supernatant, in a BioSprint 96 nucleic acid extractor (Qiagen, Hilden, Germany), using the MagAttract 96 Cador Pathogen kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions.

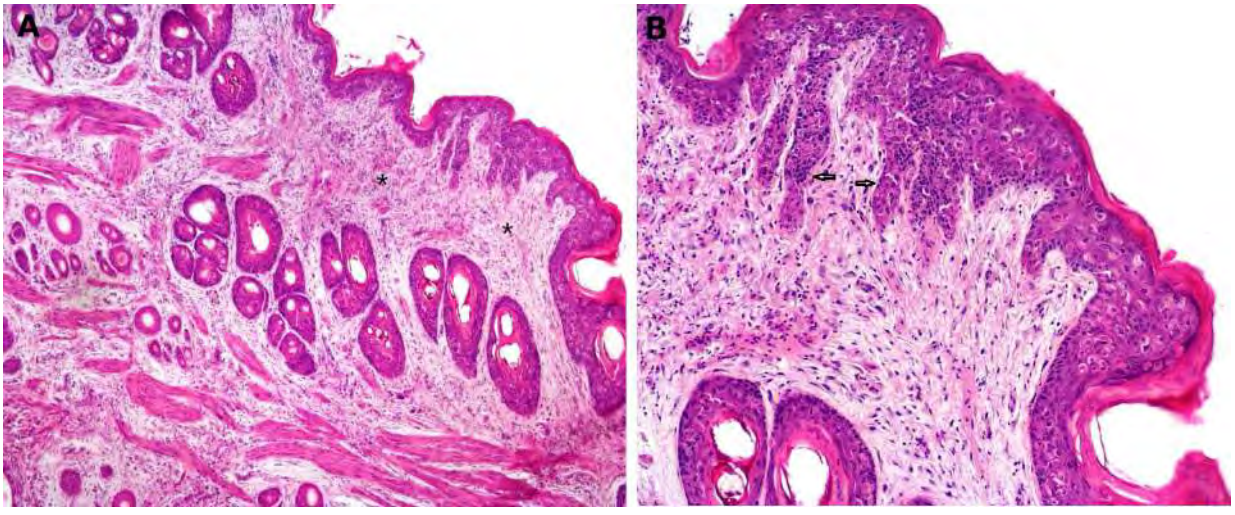


Figure 2 Histopathological features of the eyelid lesions observed in hare 1. (A) Abundant myxoid tissue indicated by black stars (x 40 magnification) and (B) hyperplasia of the epidermis pointed by arrows and the presence of myxoid tissue in the dermis (x 100 magnification). H&E staining.

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001044 on 12 April 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on April 13, 2020 by guest. Protected by copyright.

The presence of MYXV DNA was investigated by using a specific qPCR targeting gene M0005R/L described by Duarte *et al*,[22] according to the assay description in the OIE manual. The FastStart TaqMan Probe Master Kit (Roche; Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany) was used according to the manufacturer's instructions.

Both animals were positive for the presence of MYXV DNA in the eyelids, nose and perineal tissues in the qPCR previously described.[22] In hare 1, MYXV DNA was detected in the lungs but not in the liver and spleen, while in hare 2, viral DNA was detected in the liver and spleen but not in the lungs. Once confirmed, the results were communicated to the OIE.[23]

The animals were negative for the presence of RHDV and RHDV2 RNA by the methods described by Tham *et al*[24] and Duarte *et al*,[25] respectively.

A conventional PCR for differentiating the presence of the 2.8-kb insertion described by Dalton *et al*[20] (supplementary data table) allowed us to confirm that the MYXV strains detected in these two hares also possessed this additional genetic material in their genomes (*results not shown*).

Bacteriological and parasitological examinations

To rule out other pathogens that might have caused the death of the animals, parasitological and bacteriological examinations were also carried out by standard methods.

Oocysts of *Eimeria media* (heavy infestation) and *Eimeria magna* (light infestations) were identified by microscopic examination of the faeces of hare 1 (after flotation). Adult *Passalurus ambiguus* (light infestation) were detected by the sedimentation technique. No external parasites were detected. Only light infestations of oocysts of *E media*, strongyls eggs and *Nematodirus* species were identified in hare 2. As with hare 1, no external parasites were detected.

Bacterial examination was carried out in a pool of organs of each animal including liver, spleen and lung. *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli* were isolated from hare 1 and hare 2 organs, respectively, using the ID 32E kit (Biomerieux). No other bacteria were found using the API 20NE kit (Biomerieux), the ID 32 STREPT (Biomerieux), the ID 32 STAPH (Biomerieux) and the API CORYNE (Biomerieux) commercial kits or standard bacteriological media (peptone water, Rappaport Vassiliadis semi solid culture media, agarose SMID2 and XLD culture media, MacConkey and blood agar culture media).

None of these results justifies the death of the animals.

DISCUSSION

Lepus granatensis is endemic to the Iberian Peninsula, and it is the only hare species found in Portugal and the most abundant in Spain.[26] Until 2018, no major threats to *L granatensis* were pointed out[27] although high hunting pressure, predation and diseases, such as tularaemia,[28] were identified as relevant factors influencing the Iberian hare population dynamics.[29] In addition, the use of rodenticides in agricultural lands and road traffic were also considered threats to this species.[30]

Here, we report the first two cases of myxomatosis in Iberian hares (*L granatensis*) in Portugal confirmed at the National Reference Laboratory in late 2018.

Molecular data gathered within a national surveillance network on wild leporids in action in the country since August 2017, show that the natural recombinant MYXV that affects hares was not circulating in Portugal prior to October 2018. Until August 2018, 80 Iberian hares were tested for myxomatosis by qPCR.[22] Of these, 79 (98.75%) were collected during the 2017–2018 hunting season, between September 2017 and February 2018, and one (1.25%) was found dead in the field. None of these hares tested positive for MYXV.[31]

The two hares investigated in this study were in good body condition, contrarily to what is common in MYXV-positive wild rabbits. The good body condition of the animals at the time of death is compatible with an acute course of disease. Moreover, the high mortality observed in the field in Iberia[18] suggests higher virulence of this new virus towards hares.

Clinically, the typical exuberant cutaneous myxomas described in rabbits[3 4 6] were not observed in the two cases reported here. García-Bocanegra *et al*[18] suggested that the form of disease in hares in Spain could be atypical amyxomatosis given the lack of myxoid tumours and the concomitant presence of pulmonary oedema and haemorrhages. However, no relation was established between the pulmonary lesions described and the presence of MYXV DNA in the lungs. Contrarily, Águeda-Pinto *et al*[19] observed lesions compatible with myxomas at the base of the left ear of one infected hare. This animal was completely emaciated suggesting a more insidious course of the disease, which may have allowed the formation of cutaneous myxomas.

Despite myxomas were not present in the two cases reported here, the typical myxoid extracellular matrix was confirmed in the skin of hare 1 (figure 2). The qPCR showed high viral loads in the skin of both hares (Cq values of 17.25 and 19.08). No viral DNA was detected in the lungs of hare 2. While the thoracic lesions found in hare 1, namely hemothorax and rib fracture, were most probably a consequence of the shot, the hemothorax and pulmonary congestion in hare 2 may have had other infectious causes than MYXV. In addition, the necrotic and infiltrative lesions observed in hare 2 of necropurulent dermatitis are not common in myxomatosis and appear to have a different origin.

None of the cases here reported are compatible with the chronic typical (nodular) myxomatosis since cutaneous myxomas were absent, and do not fit clearly in the atypical (amyxomatous) myxomatosis, since the virus was not systematically detected in the lungs. Although further investigations are necessary, the clinical presentation of the disease seems to be different in *L granatensis* and in the rabbit, suggesting therefore differences in the physiopathology of the disease in the two species.

The 2.8-kb insertion identified in the MYXV strain that is circulating in hares in Spain[19 20] was also present in the viruses from both hares. Portugal shares with Spain a long uninterrupted border of around 1200 km in length, providing many opportunities for natural movement of animals across borders, mainly in the South, where the Iberian hare is most abundant.[32]

The disease emerged in Spain in the Provinces of Cordoba (Andalusia Autonomous Community) and Cuenca (Castilla-La Mancha) and within the next weeks, the virus spread to other provinces.[33] By March of 2019, 26 spanish provinces were already affected by the disease.[33] Given the time frame of the disease emergence in both countries, it is most likely that the virus entered mainland Portugal from Spain. This may have occurred by anthropogenic factors, such as illegal movements of infected animals, fomites (namely hunters' personal equipment and/or vehicles since many hunt in both countries), or by flying insects. Arthropods such as fleas and mosquitoes are mechanic vectors of MYXV.[10 34] The high dissemination rate of the virus among the territories of Spain and Portugal suggests that flying insects, probably mosquitoes, provided the means for the rapid indirect transmission among separate hare populations.

In Portugal, from November 2018 onward, several other cases of myxomatosis in Iberian hares have been registered. To date,

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001044 on 12 April 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on April 13, 2020 by guest. Protected by copyright.

six districts of mainland Portugal are affected, namely Faro, Beja, Évora, Setúbal, Santarém and Portalegre.

Although the impact of myxomatosis' emergence in the Iberian hare is yet unknown, the high mortality perceived in the field and the large number of laboratory confirmed cases may indicate that this natural recombinant MYXV is a relevant threat to the species, despite the population still being considered stable by the IUCN.[27] Investigating the physiopathology of the disease in this new species is of paramount importance to understand the clinical and epidemiological implications of this species jump event.

Learning points

- A recombinant myxoma virus (MYXV) strain was detected for the first time in Iberian hares in Portugal.
- The real-time PCR method targeting the M0005 gene of MYXV allows detection of the recombinant virus strain.
- The strains circulating in Portugal harbour the 2.8-kb insertion identified in the isolates from Spain, linking the outbreaks to a common source.
- The apparently distinct clinical signs of infection in the Iberian hare and in the rabbit suggest a different physiopathology of the disease in the two species.

Acknowledgements We thank to the Institutional Partners of Project +Coelho N°2018044300001 [financed by the Fundo Florestal Permanente (FFP), Portuguese Ministry of Agriculture (MAFDR)], that were directly and indirectly involved in the collection and transport of the biological samples and animals to INIAV.The authors are thankful to Dr Jacinto Amaro and Dr Helga Waap (Parasitology Laboratory, INIAV I.P.), and to Dr Teresa Albuquerque (Bacteriology Laboratory, INIAV I.P.) for the parasitological and bacteriological analyses. We also thank Dr Kevin Dalton and Dr Francisco Parra (University of Oviedo, Spain) for providing the primers for the insertion detection.

Contributors CLC carried out the experimental work regarding the virological detection and wrote the manuscript. FAAdS carried out the differentiating PCR targeting the 2.8-kb insertion. PC, PM and MM carried out the anatomo-histopathological examinations. MDD conceived the experiments, wrote and revised the manuscript. All authors discussed the results and contributed critically to the final document.

Funding This work was financed by the Fundo Florestal Permanente (FFP), Portuguese Ministry ofAgriculture (MAFDR)]. Fábio Abade dos Santos holds a PhD grant from Fundação para aCiência e Tecnologia (FCT, SFRH/BD/137067/2018).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article.

ORCID iDs
Carina Luísa Carvalho http://orcid.org/0000-0002-6648-9254
Fábio Alexandre Abade dos Santos http://orcid.org/0000-0002-0696-7322
Margarida Dias Duarte http://orcid.org/0000-0003-1488-9659

REFERENCES

1 Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al*. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Arch. Virol* 1995;ement 10:586.
2 Sanarelli G. Virus Dmyxomatogene. Beitrag zum stadium Der Krankheit-serreger ausserhalbdes Sichtbaren. *Zbl Bakt* 1898;23:865–73.
3 Kerr PJ, Best SM. Myxoma virus in rabbits. *Rev Sci Tech* 1998;17:256–68.
4 Stanford MM, Werden SJ, McFadden G. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res* 2007;38:299–318.
5 Kerr PJ, Liu J, Cattadori I, *et al*. Myxoma virus and the Leporipoxviruses: an evolutionary paradigm. *Viruses* 2015;7:1020–61.
6 Fenner F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:123–33.
7 Marlier D, Vindevogel H. Poxless myxomatosis—isolation of three strains in Belgium. *Ann Med Vet* 1996;140:343–6.
8 Marlier D, Mainil J, Linde A, *et al*. Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains. *Vet J* 2000a;159:171–8.
9 Marlier D, Mainil J, Sulon J, *et al*. Study of the virulence of five strains of amyxomatous myxoma virus in crossbred New Zealand White/Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals. *J Comp Pathol* 2000b;122:101–13.
10 Fenner F, Ratcliffe FN. *Myxomatosis*. Cambridge University Press, 1965.
11 Kerr PJ, Ghedin E, DePasse JV, *et al*. Evolutionary history and attenuation of myxoma virus on two continents. *PLoS Pathog* 2012;8:8.
12 Fenner F, Marshall ID. A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J Hyg* 1957;55:149–91.
13 Marshall ID, Fenner F. Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. V. Changes in the innate resistance of Australian Wild rabbits exposed to myxomatosis. *J Hyg* 1958;56:288–302.
14 Best SM, Kerr PJ. Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology* 2000;267:36–48.
15 Barlow A, Lawrence K, Everest D, *et al*. Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. *Vet Rec* 2014;175:75–6.
16 Saari SAM, Rudbäck E, Niskanen M, *et al*. Contagious mucocutaneous dermatitis of the mountain hare (*Lepus timidus*): pathology and cause. *J Wildl Dis* 2005;41:775–82.
17 Lucas A, Bouley G, Quinchon C, *et al*. La myxomatose Du lievre. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 1953;39:770–6.
18 García-Bocanegra I, Camacho-Sillero L, Risalde MA, *et al*. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transbound Emerg Dis* 2019;66:2204–8.
19 Águeda-Pinto A, Lemos de Matos A, Abrantes M, *et al*. Genetic characterization of a recombinant myxoma virus in the Iberian hare (*Lepus granatensis*). *Viruses* 2019;11:pii: E530.
20 Dalton KP, Martín JM, Nicieza I, *et al*. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. *Transbound Emerg Dis* 2019;66:2218–26.
21 Cook HC. Origins of tinctorial methods in histology. *J Clin Pathol* 1997;50:716–20.
22 Duarte MD, Barros SC, Henriques AM, *et al*. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. *J Virol Methods* 2014;196:219–24.
23 OIE. Myxomatosis, Portugal, 2018. Available: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=28628
24 Tham KM, Barnes SM, Hunter SN. Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. *Virus Genes* 1999;18:235–42.
25 Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, *et al*. A real time TaqMan RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 2015;219:90–5.
26 Gortazar C, Millán J, Acevedo P, *et al*. A large-scale survey of brown hare *Lepus europaeus* and Iberian hare *L. granatensis* populations at the limit of their ranges. *Wildlife Biol* 2007;13:244–50.
27 Soriguer R, Carro F. *Lepus granatensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41306A2953195, 2019. Available: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T41306A2953195.en [Accessed 02 Dec 2019].
28 Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, *et al*. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. *Ticks Tick Borne Dis* 2016;7:159–65.
29 Duarte J, ibérica L. *Lepus granatensis* (Rosenhauer, 1856). *Galemys* 2000;12:3–14.
30 Purroy FJ. Liebre ibérica—*Lepus granatensis*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. In: Salvador A, Cassinello J, eds. *Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid*, 2011. http://www.vertebradosibericos.org/
31 Duarte M, Carvalho CL, Santos FA, *et al*. +Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral". Relatório de atividades na época venatória 2017-2018. INIAV I.P., DGAV, CIBIO, ANPC, CNCP, FENCAÇA. Fundo Florestal Permanente. ICNF 2018.
32 Acevedo P, Melo-Ferreira J, Real R, *et al*. Past, present and future distributions of an Iberian endemic, Lepus granatensis: ecological and evolutionary clues from species distribution models. *PLoS One* 2012;7:e51529.
33 Ministerio de Agricultura, Pesca Y Alimentación: situación de brote de mixomatosis en liebre ibérica. Available: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/notamixomatosis07112019_tcm30-482844.pdf [Accessed 7 Nov 2019].
34 Fenner F, Day MF, Woodroofe GM. Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J Hyg* 1956;54:284–303.

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001044 on 12 April 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on April 13, 2020 by guest. Protected by copyright.

Copyright 2020 British Veterinary Association. All rights reserved. For permission to reuse any of this content visit
http://www.bmj.com/company/products-services/rights-and-licensing/permissions/
Veterinary Record Case Reports subscribers may re-use this article for personal use and teaching without any further permission.

Subscribe to Vet Record Case Reports and you can:
- Submit as many cases as you like
- Enjoy fast sympathetic peer review and rapid publication of accepted articles
- Access all the published articles
- Re-use any of the published material for personal use and teaching without further permission

For information on Institutional Fellowships contact consortiasales@bmjgroup.com

Visit vetrecordcasereports.bvapublications.com for more articles like this and to become a subscriber

Vet Rec Case Rep: first published as 10.1136/vetreccr-2019-001044 on 12 April 2020. Downloaded from http://vetrecordcasereports.bmj.com/ on April 13, 2020 by guest. Protected by copyright.

viruses

MDPI

Article

Detection of Recombinant Hare Myxoma Virus in Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus)*

Fábio A. Abade dos Santos [1,2,3,*], Carina L. Carvalho [1], Andreia Pinto [4], Ranjit Rai [4], Madalena Monteiro [1], Paulo Carvalho [1], Paula Mendonça [1], Maria C. Peleteiro [2], Francisco Parra [3] and Margarida D. Duarte [1,2]

[1] Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal; carina.carvalho@iniav.pt (C.L.C.); madalena.monteiro@iniav.pt (M.M.); paulo.carvalho@iniav.pt (P.C.); paula.mendonca@iniav.pt (P.M.); margarida.duarte@iniav.pt (M.D.D.)

[2] CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal; mcpelet@fmv.ulisboa.pt

[3] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA), Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; fparra@uniovi.es

[4] Paediatric Respiratory Medicine, Primary Ciliary Dyskinesia Centre, Royal Brompton & Harefield NHS Trust, London SW3 6NP, UK; a.pinto@rbht.nhs.uk (A.P.); r.rai@rbht.nhs.uk (R.R.)

* Correspondence: fabio.abade@iniav.pt; Tel.: +351-21-440-3500

Received: 9 September 2020; Accepted: 2 October 2020; Published: 5 October 2020

Abstract: In late 2018, an epidemic myxomatosis outbreak emerged on the Iberian Peninsula leading to high mortality in Iberian hare populations. A recombinant Myxoma virus (strains MYXV-Tol and ha-MYXV) was rapidly identified, harbouring a 2.8 kbp insertion containing evolved duplicates of M060L, M061L, M064L, and M065L genes from myxoma virus (MYXV) or other Poxviruses. Since 2017, 1616 rabbits and 125 hares were tested by a qPCR directed to M000.5L/R gene, conserved in MYXV and MYXV-Tol/ha-MYXV strains. A subset of the positive samples (20%) from both species was tested for the insert with MYXV being detected in rabbits and the recombinant MYXV in hares. Recently, three wild rabbits were found dead South of mainland Portugal, showing skin oedema and pulmonary lesions that tested positive for the 2.8 kbp insert. Sequencing analysis showed 100% similarity with the insert sequences described in Iberian hares from Spain. Viral particles were observed in the lungs and eyelids of rabbits by electron microscopy, and isolation in RK13 cells attested virus infectivity. Despite that the analysis of complete genomes may predict the recombinant MYXV strains' ability to infect rabbit, routine analyses showed species segregation for the circulation of MYXV and recombinant MYXV in wild rabbit and in Iberian hares, respectively. This study demonstrates, however, that recombinant MYXV can effectively infect and cause myxomatosis in wild rabbits and domestic rabbits, raising serious concerns for the future of the Iberian wild leporids while emphasises the need for the continuous monitoring of MYXV and recombinant MYXV in both species.

Keywords: myxomatosis; recombinant myxoma virus; ha-MYXV; European rabbit; *Oryctolagus cuniculus algirus*; species jump; spillover

1. Introduction

In the Mediterranean ecosystems, wild rabbit is an important prey for more than 40 predatory aerial and terrestrial species, some of which are endangered [1]. It also plays a crucial role as a soil "architect", contributing to seed dispersal, and landscaping [2]. Besides its ecological role, the wild rabbit is an important game species economically and socially.

Myxoma virus (MYXV) and rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) are the two major pathogen threats for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and may occasionally be found simultaneously [3]. The etiological agent of myxomatosis is MYXV, a double-stranded DNA *Leporipoxvirus* of the family Poxviridae [4].

Myxomatosis is an endemic disease of South American rabbits and was first described in laboratory rabbits in 1898 in Uruguay [5]. The disease is characterised by the presence of nodules in the skin surrounding the eyes, nose, mouth, ears, and genitalia. Conjunctivitis, accompanied by purulent discharge is frequently found as a signal of disease [6].

Despite these signs being the most commonly found in the classic, nodular or typical form of disease, myxomatosis can also be found as a respiratory form (amyxomatous form), with variable degrees of severity, where cutaneous signals are minor or not observed [7–9]. The origin of this amyxomatous virus is still unclear. Viral mutations and reactivation of subclinical infections are two of the hypotheses proposed [10].

Regardless, the two disease presentations, myxomatosis was considered a rabbit disease during many decades, with some scarce reports in European hares [11,12].

Accordingly, during a National Leporid Surveillance Program (Project +Coelho, Dispatch 4757/17, 31th may), that started in mid-2017, 92 hares and 903 rabbits, collected until October 2018, were analysed for MYXV-DNA using a qPCR directed to the diploid gene M000.5L/R, which is conserved in MYXV and recombinant MYXV strains. Until this date, no hare was positive for any MYXV strain.

The emergence of myxomatosis in the Iberian hare in mid 2018, was caused by a recombinant myxoma virus (first designated as MYXV-Tol, and subsequently ha-MYXV considering its modified tropism towards hares), harbouring an insertion of about 2.8 kbp [13–16]. After this, health surveillance in the Iberian hare within the scope of Project +Coelho (investigating MYXV [17], RHDV2 [18] and LeHV-5 [19]) and in the wild rabbit (investigating MYXV and RHDV2 [18]) was extended to include screening for ha-MYXV as described by Dalton et al. [15].

The detection of a recombinant MYXV in hares, and the apparent segregated circulation of classical MYXV in rabbits and ha-MYXV in hares, initially suggested the adaptation of MYXV to hares in order to efficiently multiply in this species. Given that hare MYXV, originally considered hare specific, is also being detected in rabbits, who succumbed to the disease, a more generalist designation, geographic and species independent, such as rec-MYXV (for recombinant myxoma virus), may be preferable for the future.

Until the cases reported here, in all tested samples, classic MYXV was only found in wild rabbits and recombinant MYXV in Iberian hares. To our knowledge, we are reporting for the first time, the detection of myxomatosis in European rabbit caused by the recombinant MYXV, adding concerns to the already fragile conservation state of the wild rabbit, taking into account its threat of extinction [20].

2. Materials and Methods

2.1. Sample, Necropsy and Histopathology

Two adult wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*), in good body condition, found dead in June 2020 (Male, 15758PT20) and July 2020 (female, 20545PT20, from here named Female 1) in the same hunting reserve in Moura, district of Beja, and one wild rabbit in good body condition, found dead in August 2020 in Samora Correia, district of Santarém (female, 22660PT20, from here named Female 2) were collected and investigated within the scope of a national surveillance program in action since August 2017.

Necropsy was performed according to routine procedures, and samples were collected for bacteriology (liver, spleen and lung), parasitology (gastrointestinal tract and liver), histopathology (lung, liver, spleen, kidney, eyelid and genitalia) and virology (liver, spleen, lung, kidney, eyelid andgenitalia).

For histopathology, skin and genitalia fragments were fixated in 10% neutral buffered formalin (*w*/*v*), routinely paraffin embedded, sectioned at 4 μm, and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E).

2.2. Parasitological and Bacteriological Examination

Parasitological examination of the intestine was carried out resourcing to direct wet mount, sedimentation and filtration techniques. Liver, spleen and lung samples were analysed using standard bacteriological methods. Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae were tested using the ID 32E (Biomerieux®, Lisbon, Portugal) test and the API 20NE kit (Biomerieux®) test respectively. The presence of Streptococcus and Staphylococcus was investigates using the ID 32 STREPT (Biomerieux®) and the ID 32 STAPH kits (Biomerieux®), respectively. The API CORYNE (Biomerieux®) kit was used for the identification of Corynebacteria and coryne-like organisms. For Salmonella, peptone water and Rappaport Vassiliadis semi solid culture media were used. Whenever there was a suspicion of Salmonella, the agarose SMID2 and XLD culture media were used. Other culture media for bacterial identification in the samples included the MacConkey agar and the Blood agar culture media.

2.3. Virological and Serological Examinations

For nucleic acid extraction, fresh samples of liver and spleen, kidney, lung, eyelid and genitalia were homogenised at 20% (*w*/*v*) with phosphate buffered saline (PBS) and clarified at 3000 *g* for 5 min. Total DNA and RNA were extracted from 200 μL of the clarified supernatants, using the MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a BioSprint 96 nucleic acid extractor (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol.

The rabbits were tested for rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) and MYXV by real time PCR targeting the M000.5 L/R gene [17,18]. The 2.8 kbp insert was investigated by the system described by Dalton et al. [15] using primers 9A/9B and 9E/9F that flank the insertion, allowing the amplification of a 3.1 or 4.6 kbp region in recombinant MYXV or a 300 bp region (absence of insert, using the oligomers 9E/9F) in MYXV. Amplification reactions were carried out in a Bio-Rad CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Srl, Redmond, USA), using the One Step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) for RHDV2, and the HighFidelity PCR Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), for MYXV and recombinant MYXV.

A commercial kit (Civtest® Cuni Mixomatosis—Hipra, Girona, Spain) developed for the detection of rabbit MYXV antibodies was validated for hare sera [21] and used to detect MYXV antibodies, following the manufacturer's instructions. For Female 1, serosanguinolent thoracic fluid was used instead of serum due to blood coagulation.

2.4. Sequencing Analysis

The initial PCR products (≈3100 bp or ≈4600 bp) encompassing the 2.8 kbp insert, were visualised in 2% horizontal electrophoresis agarose gel, purified using the NZYGelpure kit (Nzytech, Lisbon, Portugal), and directly sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing by primer walking was carried out, with a total of 12 additional oligomers designed for the purpose (Table 1).

The two nucleotide sequences obtained (15758PT20 and 20545PT20) were assembled using the Seqscape Software v2.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and submitted to GenBank (MT940239 and MT940240).

2.5. Isolation

Isolation of MYXV from the rabbits' tissues (15758PT20, 20545PT20 and 22660PT20) was achieved separately from eyelid, genitalia and lung. Samples were homogenised at 20% (*w*/*v*) in PBS containing penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic), used according to

the manufacturer (Gibco,Massachusetts, EUA). Following centrifugation (3000 *g*, 10 min), the supernatant was filtered through a 0.45-μm-pore-size filter (Millipore Express, Darmstad, Germany) and used to inoculate sub confluent (70%) Rabbit Kidney (RK13) cells (ATCC-CCL-37). RK13 cells were grown in Eagle´s medium supplemented with 5% foetal calf serum (Gibco), penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic used at 1:100, Gibco) and 50 μg/mL gentamicin (Gibco). Cells were maintained at 37 °C under humidified atmosphere with 5% CO_2 and observed daily for cytopathic effect (CPE) by phase contrast microscopy. The supernatant and cell pellet of each passage were tested for the presence of MYXV by qPCR [17].

The isolation of the virus allowed verifying its viability in the rabbit tissues, inferred by the cytopathic effect and in-house immunofluorescence protocol using MYXV positive hare serum (*protocol available on request*). The photographs were taken using an Inverted research microscope, Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Netherlands).

Table 1. Summary of oligomers used for amplification and sequencing.

Primer Name	Sequence (5′-3′)	Position in MK340973 (nt)	Reference
9B (forward)	CGCAGGTCCACGTATAAACC	11458-11477 and 153103-153084	[15]
9A (reverse)	CGAACGTATCATTAGACAATG	16060-16040	
9E (forward)	CTTCGTCTACGCCTCCTACG	12116-12135	
9F (reverse)	GCGTCGTTGTGGTCAGACAGAG	15256-15243	
305R (reverse)	AACCCGCACAACGTAAAGTACC	12420-12399	This manuscript
448F (forward)	GTCATATTCCTGATTTGGGTAATC	12563-12587	
796R (reverse)	AGGAGGAAAAGAACCTATGACAC	12911-12889	
1003F (forward)	GTGTGTACCTGGTGCAGAACC	13118-13138	
1302R (reverse)	TGAAGATGATAATGATGATGAATATCG	13417-13391	
1467F (forward)	TTCATCGTTTATGGGAAAATCTATG	13582-13606	
1819R (reverse)	GAGGGGACAGTTATGGATGTAC	13934-13913	
2028F (forward)	AAGATGCGTCTGTGTAACAATCC	14143-14165	
2325R (reverse)	AACAATGTATACACTCATGACAGTAC	14440-14415	
2458F (forward)	ATGGCCATCGTAAGTTGCCATG	14573-14594	
2847R (reverse)	CAGAGTACTTAGATTTTCTGCTAG	14962-14939	
2954F (forward)	ATCCATTGTTCGTCAGTAGATCG	15069-15091	

2.6. Electron Microscopy

The fragments selected (eyelid and lung) for transmission electron microscopy (TEM) were placed in 10% buffered formalin (*w*/*v*). Samples were then washed and transferred to 0.05M cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde, and post-fixed with aqueous 1% osmium tetroxide (EMS) for 1 hour, fragments were then stained in block with ready-to-use UA-zero (Agar Scientifics, Essex, United Kingdom), after which they were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, infiltrated and embedded in Araldite resin (Agar Scientifics). Polymerisation was performed at 60 °C for 2 days. Ultrathin sections were cut using a Reichert ultracut E ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany), collected to 1% 200 mesh copper grids (Agar Scientifics), and examined in a Jeol 1400plus transmission electron microscope at an accelerating voltage of 120 kV. Digital images were obtained using an AMT XR16 bottom mount digital camera (AMT©, Woburn, MA, USA). The sections were systematically analysed using AMT© software and several high and low magnifications were acquired.

3. Results

3.1. Necropsy and Histopathology

The Male wild rabbit had mild swelling of the eyelids (Figure 1), Female 1 mild swelling of the eyelids and vulva (Figure 2) and Female 2 nodular thickening of the right ear and erosive lesions in the muzzle. Histopathology of the lungs showed focal alveolar oedema with hyaline substance deposits in the alveolar septa in the Male (Figure 3) and infiltration of alveolar septa by mononucleated cells and focal necrosis of alveolar septa with deposits of hyaline substance in Female

1. There was bacterial infiltration in the lung parenchyma of the Male rabbit. The eyelid of the Male presented oedema with epidermal detachment (Figure 4). Due to autolysis, the histopathologic analysis of Female 2 was impaired.



Figure 1. Mild oedema of the eyelid and presence of serous discharge (Male).



Figure 2. Oedema of the vulva (Female 1)**.**

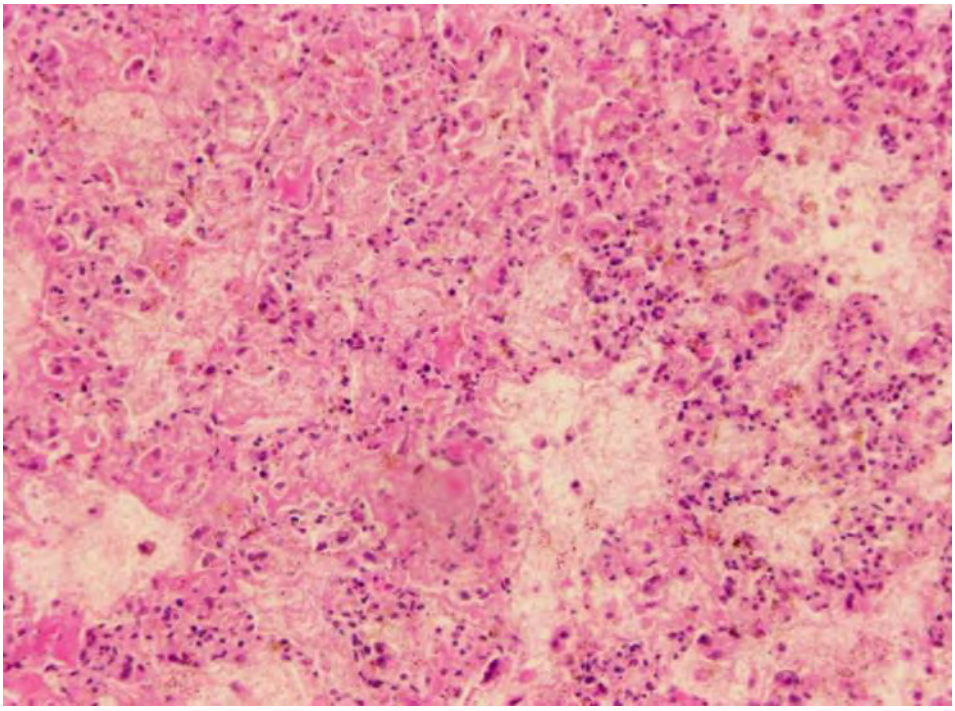


Figure 3. Microscopic finding in Female 1. Infiltration of alveolar septa by mononucleated cells and focal necrosis of alveolar septa with deposits of hyaline substance (H&E, 100×).

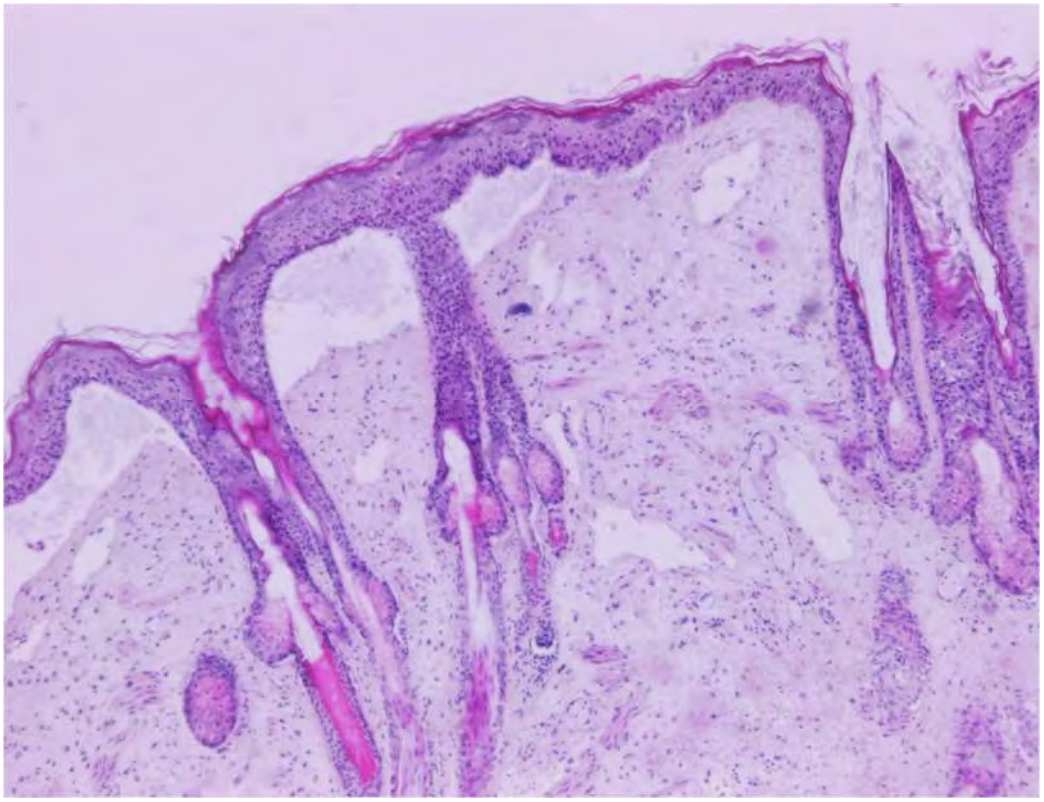


Figure 4. Microscopic finding in Male. Eyelid presenting oedema with epidermal detachment (H&E, 40×).

3.2. Virological, Bacteriological and Parasitological Results

The three animals tested negative for RHDV, RHDV2 and LeHV-5. The Cq values obtained with the qPCR targeting the diploid MYXV gene M000.5L/R in the tissues from both rabbits revealed high viral charges in the liver/spleen (Male = 2.01×10^9 copies/mg; Female 1 = 1.88×10^9 copies/mg; Female 2 = 1.83×10^{10}), lung (Male = 1.3×10^{10} copies/mg; Female = 1.53×10^9 copies/mg; Female 2 = 2.31×10^9), eyelid (Male = 1.13×10^{10} copies/mg; Female 1 = 2.41×10^{10} copies/mg; Female 2 = 1.25×10^{11}), genitalia (Male = 7.47×10^9 copies/mg, Female 1 = 1.30×10^{10} copies/mg; Female 2 = 3.05×10^9) and kidney (Male = not tested; Female 1 = 2.92×10^8 copies/mg; Female 2 = not tested). Only the 4.6 kbp fragment was obtained with the PCR directed [18] to the 2.8 kbp insertion, indicating the presence of recombinant MYXV in the tissues of the rabbits and the absence of classical MYXV.

Serology using a commercial kit (Civtest® Cuni Mixomatosis-Hipra) according to the manufacturer's instructions, showed a high antibody titer in the Male rabbit (RI10 of 19.6) and in the Female 2 (RI10 of 9.2), similar to the RI values of hare positive control serum. Despite that the RI value (< 1.0) obtained for the Female 1 suggests no seroconversion, considering that blood serum was not available, no robust conclusions can be taken.

Bordetella bronchiseptica and *Escherichia coli* were isolated from the lungs of the Male and Female 1, respectively. Faeces from rabbits showed small infestations of *Eimeria spp*. oocysts.

3.3. Molecular Characterisation

Around position ≈61,000 nt of the complete MYXV genome (Lausanne strain), ORFs M060R, M061R, M062R, M063R M064R, M065R and M066R are sequentially located and close together, in different frames, with ORFs M065R and M066R overlapping by 100 nt (Figure 5A).

Sequencing analysis of the 4.6 kbp amplicon confirmed the presence of an additional 2.8kbp region within the M009L gene around nucleotide position 12,336 in the reference MYXV strain AF170726. M009L split into ORF M009L-a containing the original 5′ end, and ORF M009L-b corresponding to the original 3′ end.

In silico analysis of the 4600/2800 bp sequence showed the presence of five ORFs with some degree of similarity with genes M060R, M061R, M064R, M065R and M066R of MYXV strains, but with inverted orientation (Figure 5B).

ORF M066R encodes a 185 aa long protein and is found in MYXV (e.g. AAF14954.1). ORF M066L (the remaining of the complete gene M066R) encodes a putative partial protein of 70 amino acids in the recombinant MYXV from Portugal. Despite being present in MYXV-Tol and ha-MYXV strains from Spain [13,15], this ORF was not annotated previously. M066L is recognised between ORF M065L and ORF M009L-b, sharing 80% similarity with the homologous sequence of ORF M066R in the ha-MYXV. This small ORF overlaps the M009L-b ORF by 21 nucleotides and M065 by 101 nucleotides (Figure 5C).

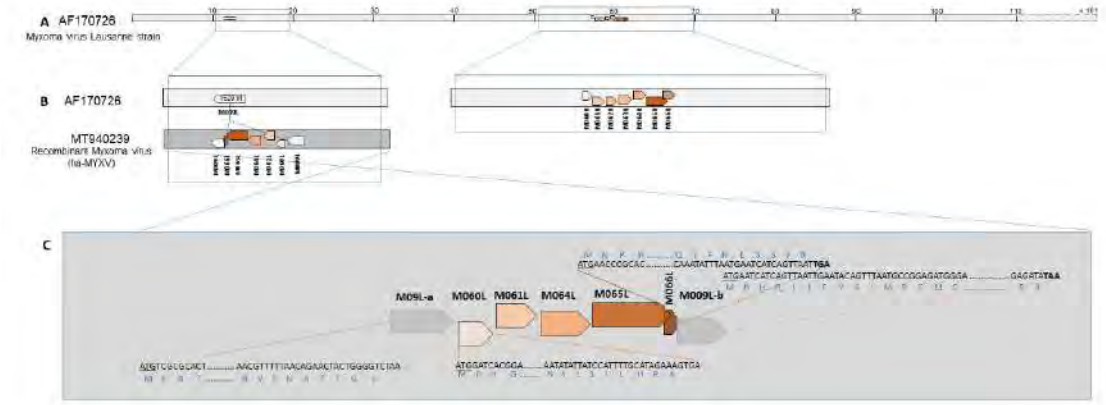


Figure 5. (**A**) Linear genomic organisation of the reference Lausanne strain with the location of ORFs M009L and ORFs M061R and M66R. (**B**) Schematic representation comparing the uninterrupted receptor ORF M009L in the Lausanne strain with the insert in ha-MYXV. (**C**) Detail on the flaking regions of the insert and relative position of the ORFs.

The two nucleotide sequences obtained from the Male and Female 1 wild rabbits were identical to each other and to the homologous sequences from other MYXV-Tol/ha-MYXV (MK836424 and MK340973). The differences between the truncated ORF M066L and the homologous M066R ORFs from MYXV-Tol and ha-MYXV obtained from hares (MK836424 and MK340973), and classical MYXV obtained from rabbits (MK388144, MK388143, MK388142 and MK388141 (MYXV) are shown in Figure S1. In particular, the percentage of similarity between ORF M066L and ORFs M066R despite its species of origin is around 79%.

The M066L sequences obtained are 100% similar to correspondent sequences of recombinant MYXV strains described before (MK836424 and MK340973) in Spain. About 79% of similarity was observed between the M066L and the M066R sequences from other ha-MYXV and MYXV strains.

The putative M066L protein obtained presented 80% identity with M066R protein of MYXV-Tol and ha-MYXV strains described before (MK340973 and MK836424). The same similarity was also observed between the M066L and the M066R sequences from classic rabbit MYXV strains (Figure S2).

3.4. Isolation of the Virus in Cell Culture

The successful isolation of the recombinant MYXV in RK13 cells from a separate eyelid, genitalia and lung samples from the Male rabbit and from the eyelid of the Females rabbits, confirmed its viability and infectiousness, proving that the virus was multiplying in the rabbits' tissues. Viral isolation was confirmed by cytopathic effect (CPE) at day 5 in RK13 subconfluent infected cells, by indirect immunofluorescence of the cells (*protocol available on request*) and by conventional PCR of the cell supernatant.

The characteristic CPE at late stage of infection was observed from day three after inoculation (Figure 6A, C). By qPCR we demonstrated the progressive decrease of the Cq value in DNA samples extracted from cell culture supernatant aliquots, collected at day 1, 5 and 10 *(results not shown)*. To

demonstrate the presence of the viral protein in the RK13 cells, an indirect immunofluorescence test was performed at day 3 (Figure 6B) and day 6 post inoculation, allowing to confirm Myxoma virus foci (Figure 6D).

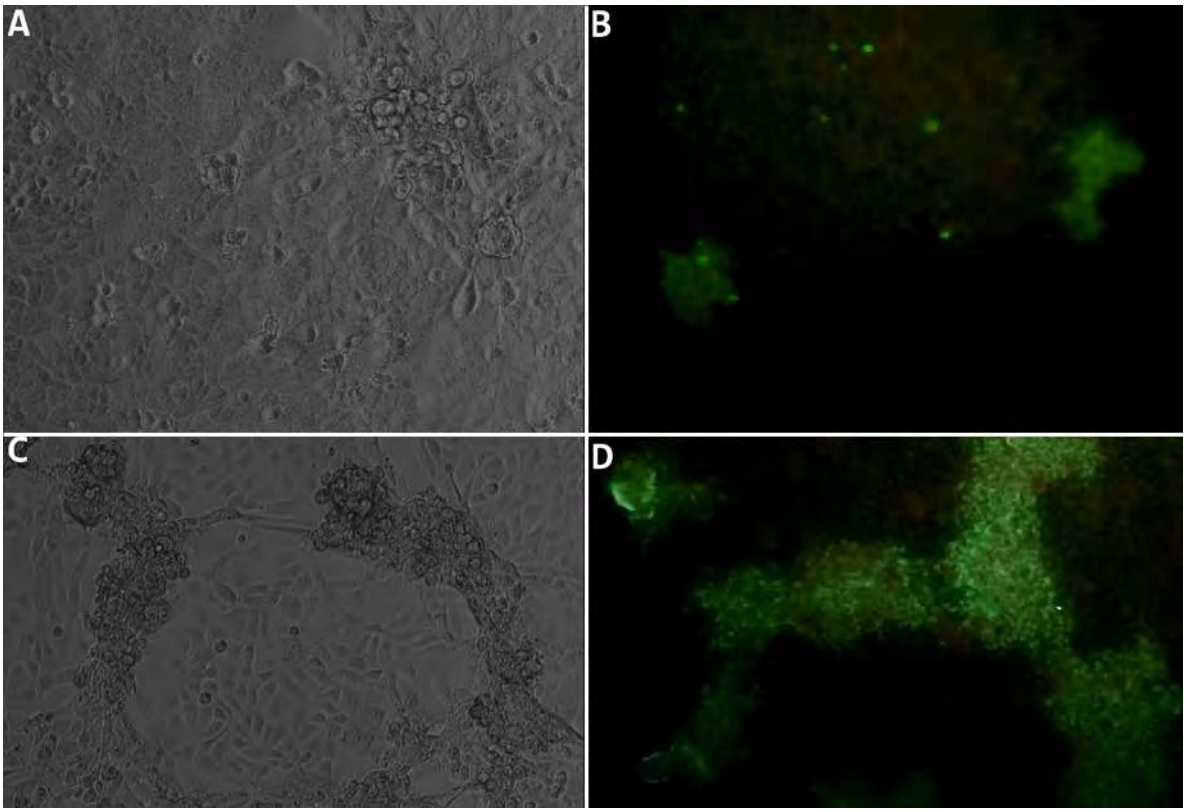


Figure 6. (**A**) Cytopathic effect in RK13 cells infected with an eyelid homogenate of the rabbit Male, three days after the infection, consisting of smaller aggregates of round and refringent cells, surrounded by normal cells (100×). (**B**) Positive indirect immunofluorescence staining (IFI) of recombinant MYXV infected RK13 cells three days after the inoculation (100×) (**C**) Cytopathic effect in RK13 cells infected with an eyelid homogenate of the rabbit male, six days after the infection, consisting of large aggregates of round and refringent cells forming cords over the normal cell layer (100×). (**D**) Positive immunofluorescence staining of the recombinant MYXV infected RK13 cells, six days after the inoculation (100×). Images in B and D (IFI staining) do not correspond to the same zone of the non-stained cells (A and C).

3.5. Transmission Electron Microscopy

Analysis by electron microscopy allowed observing poxvirus-compatible particles in the lung and eyelid. In the eyelid, a higher number of viral particles was observed, especially in epithelial cells (Figure 7). The degree of advanced autolysis of the tissues did not allow a more detailed evaluation of the type of cells mostly infected.

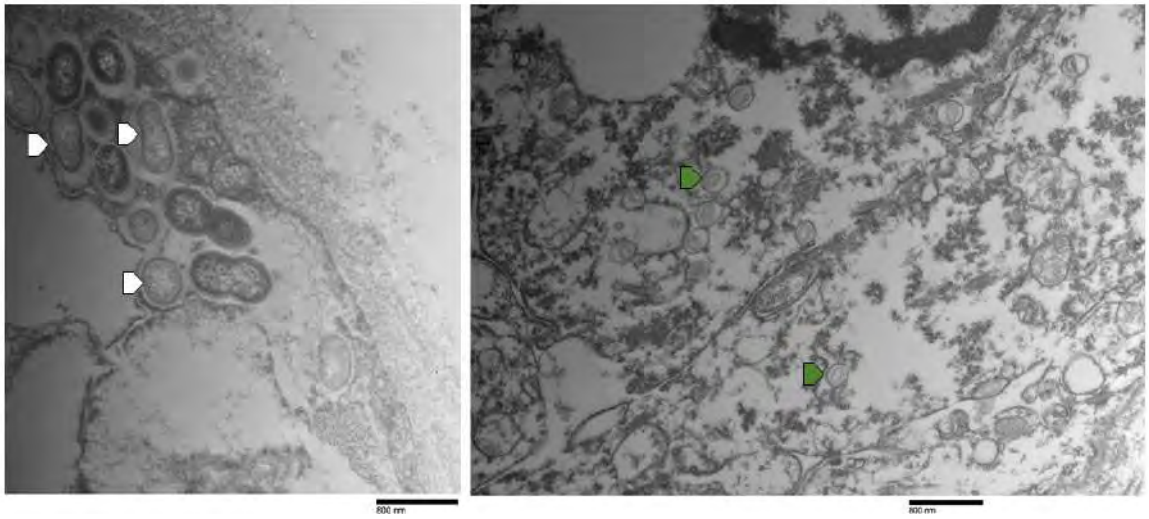


Figure 7. Transmission electron microscopy (TEM) micrographs. On the left, a lung cut from Female 1. At right, an eyelid epithelium cut from Female 1. White arrow heads indicate immature viral particles and green arrow heads indicate apparently mature viral particles. The black bar indicates the scale (800 nm).

4. Discussion

The external signs of myxomatosis in three adult rabbits found dead between June and August 2020 in Alentejo that arrived to the National Reference Laboratory for Animal Diseases (INIAV, I.P.) for investigation corresponded to mild to moderate swelling of the eyelids and genitalia.

Both male and females tested positive to MYXV-DNA by the M000.5 L/R gene qPCR, and by the 2.8 kbp insert PCR, showing infection by the natural recombinant MYXV. None of the rabbits were co-infected with classical MYXV strains, RHDV2, RHDV or LeHV-5.

Most of the wild rabbits that died of myxomatosis, generally arrived to the laboratory with severe swelling of the eyelids and genitals, often accompanied by ocular purulent discharge and very frequently in a state of thinness or cachexia. The high viral loads found in several tissues, and the good body condition of these three wild rabbits, suggest that a shorter course of disease may have taken place. Although further testing is necessary to support this relation, this may imply a possible higher virulence of the natural recombinant MYXV strain towards wild rabbits. With regards to the MYXV strains, the national surveillance plan of wild leporids in action in Portugal since 2017 allowed for the testing of more than 57 infected wild rabbits [22]. A total of 73% of the rabbits found dead with myxomatosis (infected with classic MYXV strains) presented median/poor corporal condition or even cachexia, reflecting the ability of the animals to survive infected for longer periods [22]. A lower adaptation of the recombinant MYXV strains to rabbits, comparing the MYXV classic strains with which rabbits have evolved for more than 50 years [23], may eventually account for these apparent differences.

The detection of a recombinant MYXV circulating in hares, and its apparent segregation from MYXV circulating in rabbits, initially suggested the adaptation of MYXV-Tol and ha-MYXV to hares in order to efficiently multiply in this species.

Sequencing of the 2.8 kbp insert from the two rabbits showed that both recombinant MYXV strains have the same poxvirus gene "cassette" previously described in Iberian hares [3,13,15].

However, we described a putative truncated gene similar to the M066R gene of the myxoma virus that is also present, though not annotated, in the Myxoma virus sequences obtained previously from Iberian hares. As in the MYXV-Tol (MK836424) and ha-MYXV genomes (MK340973), M062R and the M063R are not found in the insert.

The origin of this insert was discussed previously by other authors, and is not a goal of this work. However, the putative protein encoded by ORF M066L is 65.22% to 76.81% similar to homologous ORFs in capripoxviruses, cervidpoxviruses, suipoxviruses, yatapoxviruses but not with the BeAn

58058 virus, appointed previously [13] as a potential donor, or sharing an ancestral donor, of the genetic material found in the insert. On the other hand, the higher similarity of putative protein encoded by M066L with rabbit fibroma virus and with classical Myxoma virus strains, suggests that the insert may have originated from one of these viruses, or a similar virus, not yet described.

During the three months in which the three rabbits were collected, only a small number of found dead rabbits with myxomatosis arrived at the laboratory from mainland Portugal, limiting any inference about the prevalence, frequency and distribution of the recombinant MYXV in the wild. However, since the natural recombinant MYXV emergence in 2018, and according to data collected under the +Coelho project, Beja was the district from which more hares were sampled (52 out of 170) and tested, and was also one of the districts most affected by myxomatosis (34.6% of positivity in the sample).

The detection of the recombinant MYXV in wild rabbits raises serious concerns at different levels, constituting an additional treat to the already fragile wild rabbit, which entered to the IUCN's endangered conservation status last year [20]. If the recombinant MYXV and classical MYXV strains behave as different viruses in rabbit, with no full cross protection between the two, the jump of a recombinant MYXV into the rabbit populations will eventually accelerate the decline of these already diminished wild populations. On the other hand, the fact that the recombinant MYXV affects both the Iberian hare and the wild rabbit, may favour the maintenance of the virus as more hosts are available for virus replication and circulation. The recombinant MYXV may therefore become endemic in the same way that classic strains did, allowing the co-evolution in both species. However, the ability to infect the wild rabbit, may lead the recombinant MYXV to prefer the rabbit host, taking into account the greater dispersion and higher density compared to the Iberian hare, which would facilitate their environment maintenance. Further concerns include the rabbit industry, and the need to evaluate if MYXV or Shope Fibroma virus attenuated vaccines are protective against the recombinant MYXV.

Although vaccination is highly effective in the industry, inducing generally the seroconversion of almost 100% of the animals [24], parenteral vaccination of wild populations is almost impossible. Another major concern arises from the emergence and circulation of this new strain in wild rabbit populations, in which virus-host co-evolution regarding classical MYXV strains occurred over the years [25]. The emergence of new MYXV strains theoretically poses a great risk to the rabbit threatened of extinction.

Since the complete genome sequences were not obtained in this study, there are no certainties that the recombinant MYXV strains found in the three rabbits are identical to MYXV-Tol or ha-MYXV. Therefore, we cannot exclude the existence of other mutations that may have contributed to the ability of the recombinant MYXV to cause disease in rabbits.

5. Conclusions

Almost two years after the emergence of a recombinant MYXV in Iberian hares, our findings bring one new piece into the model of host-myxoma virus co-evolution by demonstrating the pathogenicity of this recombinant virus towards rabbits. It is important to continue monitoring the disease in wild rabbits and hares in order to ascertain the geographic dimension of the spillover phenomena or the spread of this jump of recombinant hare MYXV back to the European rabbit.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1999-4915/12/10/1127/s1, Figure S1: Nucleotide alignment between the M066L from sequence MT940239 with the homologous sequences of M006L from other hare recombinant strains (MK836424 and MK340973) (first to third sequences) and with the M066R from hare and classic MYXV strains from rabbit (fourth to ninth sequences). Figure S2. Alignment of the truncated M066L protein sequence from a natural recombinant MYXV (deduced from sequence MT940239) with the homologous regions of M066R proteins deduced from hare recombinant MYXV strains (MK836424 and MK340973) and classic MYXV strain (MK388144).

Author Contributions: Conceptualisation, F.A.A.S. and M.D.D.; methodology, F.A.A.S, A.P., R.R. and M.D.D., validation, F.A.A.S and M.D.D.; investigation, F.A.A.S., M.M., P.C., P.M.,A.P and M.D.D.; resources, A.P., R.R., C.P., M.M. and M.D.D.; data curation, F.A.A.S., A.P. and M.M.; writing—F.A.A.S. and M.D.D.; writing—review

and editing-F.A.A.S, C.L.C., M.M., C.P., M.C.P., F.P. and M.D. D.; supervision, M.D.D., F.P. and C.P.; funding acquisition, A.P., F.P, C.P. and M.D. D.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), grant SFRH/BD/137067/2018, by Fundo Florestal Permanente (Government of Portugal) in the scope of the Action Plan for the Control of Rabbit Viral Haemorrhagic Disease (+COELHO, Dispatch no. 4757/2017 of 31 May) and by the Interdisciplinary Research Centre on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL) (Portugal) (Project CIISA-UIDP/CVT/00276/2020). FP lab was funded by grant AGL2017-83395-R from the Spanish Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades, cofinanced by FEDER. Funding bodies played no direct role in the design or conclusion of the study.

Acknowledgments: We thank Sebastião Miguel (Hunting manager), João Carvalho (ANPC), Jacinto Amaro (FENCAÇA), Fernando Castanheira Pinto (CNCP), for sample collection. We thank Sandra Carvalho for the immunohistochemistry facilities. We are also grateful to all virology, bacteriology and parasitology teams of INIAV, I.P, Oeiras. We thank Kevin Dalton for review and suggestions. Finally, we also thank all the hunters who participated in fieldwork and sample collection.

Declaration: This study did not use live animals and was carried out within the scope of a National Plan for the Control of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus 2 in rabbits (Dispatch no. 4757/2017 of 31 May), with the legal authorisations from the National Authority-the Institute for Nature Conservation and Forests (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, I.P., ICNF).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Delibes-Mateos, M.; Delibes, M.; Ferreras, P.; Villafuerte, R. Key role of European rabbits in the conservation of the western Mediterranean Basin hotspot. *Conserv. Biol.* **2008**, *22*, 1106–1117, doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00993.x.
2. Staniforth, R.J.; Cavers, P.B. The importance of cottontail rabbits in the dispersal of *Polygonum* Spp. *J. Appl. Ecol.* **1977**, *14*, 261–268.
3. Carvalho, C.L.; Abade dos Santos, F.A.; Fagulha, T.; Carvalho, P.; Mendonça, P.; Monteiro, M.; Duarte, M.D. Myxoma virus and rabbit haemorrhagic disease virus 2 coinfection in a European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*), Portugal. *Vet. Rec. Case Rep.* **2020**, 18–21, doi:10.1136/vetreccr-2019-001002.
4. Murphy, F.A.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Ghabrial, S.A.; Jarvis, A.W.; Martelli, G.P.; Mayo, M.A.; Summers, M. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1995.
5. Sanarelli, G. Das myxomatogene Virus. Beitrag zum Studium der Krankheitserreger ausserhalb der Sichtbaren. (Vorliiufige Mitteilung.). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrankh. Abt. I.* **1898**, *23, 865–873*.
6. Rivers, T.M. Infectious myxomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* **1930**, *51, 965–976*.
7. Marlier, D.; Cassart, D.; Coignoul, F.; Vindevogel, H. Experimental Infection of Specific Pathogen-free New Zealand White Rabbits with Five Strains of Amyxomatous Myxoma Virus. *J. Comp. Pathol.* **1999**, *121*, 369–384.
8. Moss, B. Fields virology. In *Field's Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2001; pp. 2849–2883.
9. Bertagnoli, S.; Marchandeau, S. Myxomatosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2015**, *34*, 549–556.
10. Arthur, C.P.; Louzis, C. A review of myxomatosis among rabbits in France. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **1988**, *7*, 959–976.
11. Barlow, A.; Lawrence, K.; Everest, D.; Dastjerdi, A.; Finnegan, C.; Steinbach, F. Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. *Vet. Rec.* **2014**, *175*, 75–76, doi:10.1136/vr.g4621.
12. Collins, J.J. Myxomatosis in the common hare. *Ir. Vet. J.* **1955**, *9*, 268.
13. Pinto, A.; Matos, A.L. De; Abrantes, M.; Kraberger, S.; Risalde, M.A.; Gort, C.; Mcfadden, G.; Varsani, A.; Esteves, P.J. Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (*Lepus granatensis*). *Viruses* **2019**, *11*, 1–16, doi:10.3390/v11060530.
14. Bocanegra, I.G.; Camacho-Sillero, L.; Risalde, M.A.; Dalton, K.; Caballero-Gómez, J.; Aguero, M.; Zorrila, I.; Gómez-Guillamón, F. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, 1–5, doi:10.1111/tbed.13289.

15. Dalton, K.P.; Martín, J.M.; Nicieza, I.; Podadera, A.; Llano, D.; Casais, R.; Gimenez, S.; Badiola, I.; Agüero, M.; Duran, M.; et al. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, doi:10.1111/tbed.13296.
16. Carvalho, C.; Abade dos Santos, F.A.; Monteiro, M.; Carvalho, P.; Mendonça, P.; Duarte, M.D. First cases of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Portugal. *Vet. Rec. Case Rep.* **2020**, *8*, doi:10.1136/vetreccr-2019-001044.
17. Duarte, M.D.; Barros, S.C.; Henriques, A.M.; Fagulha, M.T.; Ramos, F.; Luís, T.; Fevereiro, M. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. *J. Virol. Methods* **2013**, *196*, 219–224, doi:10.1016/j.jviromet.2013.11.014.
18. Duarte, M.D.; Carvalho, C.L.; Barros, S.C.; Henriques, A.M.; Ramos, F.; Fagulha, T.; Luís, T.; Duarte, E.L.; Fevereiro, M. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods* **2015**, *219*, 90–95, doi:10.1016/j.jviromet.2015.03.017.
19. Abade dos Santos, F.A.; Monteiro, M.; Pinto, A.; Carvalho, C.L.; Peleteiro, M.C.; Carvalho, P.; Mendonça, P.; Carvalho, T.; Duarte, M.D. First description of a herpesvirus infection in genus Lepus. *BioRxiv Prepr.* **2020**, doi: 10.1101/2020.01.21.913723.
20. Villafuerte, R.; Delibes-Mateos, M. *Oryctolagus cuniculus* (errata version published in 2020). In *IUCN Red List Threatened Species 2019: e.T41291A170619657*; International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: Cmbridge, UK, 2019, doi:10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T41291A170619657.en.
21. Abade dos Santos, F.A.; Santos, N.; Carvalho, C.; Martinez, M.; Gortazar, C.; Garc, I.; Duarte, M.; Alves, P. Serology unveils decades-long contact of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, with myxoma or antigenically-related virus. *Authorea* **2020**, doi:10.22541/au.159818365.55937034.
22. Duarte, M.D.; Carvalho, C.L.; Abade dos Santos, F.A.; Gomes, J.; Alves, P.C.; Esteves, P.J.; Abrantes, J.; Lopes, A.M.; P., M.; Serronha, A.; et al. +Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral. *Relatório de Atividades na Época Venatória* **2018,** *1*, 1–156.
23. Kerr, P.J.; Liu, J.; Cattadori, I.; Ghedin, E.; Read, A.F.; Holmes, E.C. Myxoma virus and the leporipoxviruses: An evolutionary paradigm. *Viruses* **2015**, *7*, 1020–1061, doi:10.3390/v7031020.
24. Hipra, L. Serological response to myxomatosis vaccination by different inoculation systems on farm rabbits. *World Rabbit Sci.* **2003**, *11*, 145–156.
25. Best, S.M.; Kerr, P.J. Coevolution of host and virus: The pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology* **2000**, *267*, 36–48, doi:10.1006/viro.1999.0104.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Transboundary and Emerging Diseases

SHORT COMMUNICATION

Recombinant myxoma virus infection associated with high mortality in rabbit farming (*Oryctolaguscuniculus*)

Fábio A. Abade dos Santos, Carina L. Carvalho, Madalena Monteiro, Paulo Carvalho, Paula Mendonça, Maria da Conceição Peleteiro, Margarida D. Duarte

First published: 29 October 2020 | https://doi.org/10.1111/tbed.13899

Abstract

Myxomatosis is an emergent disease in the Iberian hare, having been considered a rabbit disease for decades. Genome sequencing of the strains obtained from Iberian hares with myxomatosis showed these to be distinct from the classical ones that circulated in rabbits since the virus introduction in Europe, in 1952. The main genomic difference in this natural recombinant hare myxoma virus (ha-MYXV) is the presence of an additional 2.8 kb region disrupting the M009L gene and adding a set of genes homologous to the myxoma virus (MYXV) genes M060R, M061R, M064R, M065R and M066R originated in Poxviruses. After the emergence of this recombinant virus (ha-MYXV) in hares, in the summer of 2019, the ha-MYXV was not detected in rabbit surveys, suggesting an apparent species segregation with the MYXV classic strains persistently circulating in rabbits. Recently, a group of six unvaccinated European rabbits (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*) from a backyard rabbitry in South Portugal developed signs of myxomatosis (anorexia, dyspnoea, oedema of eyelids, head, ears, external genitals and anus, and skin myxomas in the base of the ears). Five of them died within 24–48 hr of symptom onset. Molecular analysis revealed that only the recombinant MYXV was present. This is the first documented report of a recombinant hare myxoma virus in farm rabbits associated with high mortality, which increases the concern for the future of both the Iberian hare and wild rabbits and questions the safety of the rabbit industry. This highlights the urgent need to evaluate the efficacy of available vaccines against this new MYXV.

animals

MDPI

Brief Report

A Potential Atypical Case of Rabbit Haemorrhagic Disease in a Dwarf Rabbit

Fábio A. Abade dos Santos [1,2,3,*], Carolina Magro [4], Carina L. Carvalho [2], Pedro Ruivo [5], Margarida D. Duarte [1,2] and Maria C. Peleteiro [1]

1 Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal; margarida.duarte@iniav.pt (M.D.D.); mcpelet@fmv.ulisboa.pt (M.C.P.)
2 Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal; carina.carvalho@iniav.pt
3 Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain
4 VetOeiras. Hospital Médico-Veterinário, Estrada de Oeiras n18-20, 2780-114 Oeiras, Portugal; carolinamagrovet@gmail.com
5 Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes (IMM), Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 1070-312 Lisbon, Portugal; ruivo_pedro@hotmail.com
* Correspondence: fabio.abade@iniav.pt

Simple Summary: We report an unusual clinical case in a pet rabbit vaccinated against rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV, GI.1), that developed a prolonged hepatic disease, and was diagnosed RHDV2 (GI.2) positive post-mortem. This finding is a warning to all veterinarians that rabbit haemorrhagic disease should also be considered for differential diagnosis despite the history of RHDV vaccination and the need to update vaccination programs against the current RHDV2 circulating strains.

Abstract: Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is a highly contagious infectious disease of European wild and domestic rabbits. Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV, GI.1) emerged in 1986 in Europe, rapidly spreading all over the world. Several genotypes of RHDV have been recognised over time, but in 2010, a new virus (RHDV2/RHDVb, GI.2) emerged and progressively replaced the previous RHDV strains, due to the lack of cross-immunity conferred between RHDV and RHDV2. RHDV2 has a high mutation rate, similarly to the other calivirus and recombines with strains of RHDV and non-pathogenic calicivirus (GI.4), ensuring the continuous emergence of new field strains. Although this poses a threat to the already endangered European rabbit species, the available vaccines against RHDV2 and the compliance of biosafety measures seem to be controlling the infection in the rabbit industry Pet rabbits, especially when kept indoor, are considered at lower risk of infections, although RHDV2 and myxoma virus (MYXV) constitute a permanent threat due to transmission via insects. Vaccination against these viruses is therefore recommended every 6 months (myxomatosis) or annually (rabbit haemorrhagic disease). The combined immunization for myxomatosis and RHDV through a commercially available bivalent vaccine with RHDV antigen has been extensively used (Nobivac® Myxo-RHD, MSD, Kenilworth, NJ, USA). This vaccine however does not confer proper protection against the RHDV2, thus the need for a rabbit clinical vaccination protocol update. Here we report a clinical case of hepatitis and alteration of coagulation in a pet rabbit that had been vaccinated with the commercially available bivalent vaccine against RHDV and tested positive to RHDV2 after death. The animal developed a prolonged and atypical disease, compatible with RHD. The virus was identified to be an RHDV2 recombinant strain, with the structural backbone of RHDV2 (GI.2) and the non-structural genes of non-pathogenic-A1 strains (RCV-A1, GI.4). Although confirmation of the etiological agent was only made after death, the clinical signs and analytic data were very suggestive of RHD.

Keywords: European rabbit; *Oryctolagus cuniculus*; pet rabbit; rabbit haemorrhagic disease; atypical clinical course; subacute

check for updates

Citation: Abade dos Santos, F.A.; Magro, C.; Carvalho, C.L.; Ruivo, P.; Duarte, M.D.; Peleteiro, M.C. A Potential Atypical Case of Rabbit Haemorrhagic Disease in a Dwarf Rabbit. *Animals* **2021**, *11*, 40. https://dx.doi.org/10.3390/ani11010040

Received: 26 October 2020
Accepted: 21 December 2020
Published: 28 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Keywords: European rabbit; *Oryctolagus cuniculus*; pet rabbit; rabbit haemorrhagic disease; atypical clinical course; subacute

1. Introduction

Originating in the Iberian Peninsula [1], the European rabbit was widely introduced first in Europe, and subsequently in all other continents except Antarctica. The European domestic rabbit has been used as an important meat and fur resource. Artificial selection of small breeds of this species (*Oryctolagus cuniculus*), weighing less than 2 kg, also generated an increasingly popular pet-rabbit trade. Pet rabbits can be affected by the same diseases found in the rabbit industry or wild rabbit populations. However, the indoor lifestyle decreases the risk of contact with common rabbit diseases such as myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease (RHD).

RHD is a highly contagious infectious disease caused by a virus from the Caliciviridae family, genus *Lagovirus*, which targets hepatocytes and cells of the mononuclear phagocytic system (e.g., Kuppfer cells and alveolar macrophages) [2,3]. The disease was first identified in 1984 in China and quickly spread to other continents, evolving into different genotypes (GI.1a (RHDVa or G6), GI.1b (G1), GI.c (G2) and GI.1d (G3-G5) [4,5]). Along with myxomatosis, this disease led to an abrupt decrease in the European rabbit wild populations [6].

In 2010, a distinct virus (both genetic and antigenically) related to RHDV emerged in France [7]. This new virus, referred to as RHDV2 or RHDVb, induced a disease very similar to that caused by RHDV strains and it became also known as *Lagovirus europaeus* GI.2 [5].

More recently, natural recombinant RHDV2 strains were identified containing the structural proteins of RHDV2 (VP60 and minor protein-encoding genes), but the non-structural proteins from either non-pathogenic calicivirus (NP-CV GI.4 and GI.3)). Furthermore, the non-structural proteins from the RHDV strains (GI.1b) were also found in RHDV2 recombinants [8]. Figure 1 represents the genomic organization of RHDV2 RNA.

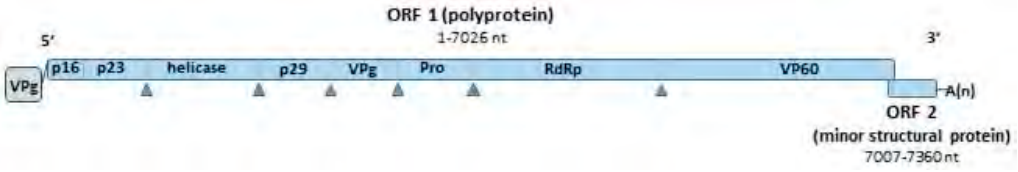


Figure 1. Simplified schematic representation of the genomic RNA of RHDV2. Nucleotide positions were calculated from sequence KF4429642. The genome includes two ORFs. ORF1 encodes a polyprotein that is cleaved to form the non-structural proteins p16, p23, the helicase, p29, VPg, a protease and the viral polymerase, and the major structural protein VP60. ORF 2 encodes a minor structural protein VP10.

Different clinical presentations and disease progression can occur with RHDV2 [9–12] and those variations can be associated with strain. The incubation period of RHD ranges between 1 and 3 days. In peracute forms, sudden death may occur within 12 hours after infection. In acute and subacute forms of RHD, different clinical signs can be observed, such as anorexia, mucosal congestion, neurologic signs, cyanosis, dyspnoea, foamy haemorrhagic epistaxis, haemorrhage and others [13]. In chronically infected rabbits, the onset of anorexia, lethargy and jaundice usually precedes death in about 1 to 3 weeks [13]. Chronic clinical course are more frequent in rabbits infected by RHDV2 than by RHDV.

Haemorrhagic diathesis is found during the disease, with disseminated intravascular coagulation (DIC), associated with alterations in blood coagulation and terminating in multi-organ failure and death [14]. The pathogenesis of DIC in RHD is still unknown. The DIC is assumed to occur by a distortion of both external and internal blood coagulation activation paths, leading to extended One-Stage Prothrombin Time (OSPT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) [15–17]. During the disease, a thrombocytopenia and reduced platelet aggregation is observed, alteration of the activity of coagulation factors

V, VII and X, as well as increased volume of soluble fibrin and its degradation products (D-dimers) [15–17].

During an RHDV2 outbreak, more than 10% of the infected rabbits may show a chronic or subclinical evolution of the disease, with severe and generalised jaundice, loss of weight, and lethargy. These animals often die some weeks later, due to liver disease [18]. Although the study of the disease has been expanded by animal experimentation, the characterisation of natural infection is far less known [10,11,19,20].

The terms peracute, acute and chronic are of clinical use but not always reflected in distinct necropsy findings and specific histopathological patterns, meaning that it is possible to find sudden death associated with peracute widespread hepatocellular necrosis or with more chronic changes such as inflammation or fibroplasia [10].

Veterinarians should be aware that despite necropsy and histopathology findings may be suggestive of RHD, since microscopic changes are usually present and, in many cases, macroscopic changes can also be seen [10], laboratory confirmation is always required for a conclusive diagnosis.

Laboratory testing can be done by molecular methods (e.g., RT-PCR), ELISA or electron microscopy. However, the rapid and debilitating evolution of the disease, together with the shortage of direct access to these techniques by clinicians, poor reporting of RHD in pet rabbits and possible lack of awareness among clinicians, contributes to the almost non-existent knowledge of the prevalence of RHD in pets in Portugal.

After the emergence of RHDV2 in 2010, this virus rapidly replaced the previous strains that soon were no longer reported in Europe. The humoral immunity acquired by natural- or vaccine-induced RHDV strains do not confer proper cross-protection against RHDV2 strains [21,22]. Until 2016, when ERAVAC, Hipra, Girona, Spain was commercialised, all vaccines available against RHDV2 were directed to the industrial market (sold in multi-dose bottles), and therefore not adequate for vaccination of pet rabbits. In November 2019, a new single-dose bottle vaccine against myxoma virus, RHDV and RHDV2 was also made available in Europe (Nobivac® Myxo-RHD Plus, MSD, Kenilworth, NJ, USA).

2. Clinical Presentation

We present the case of a 2-year-old spayed female Netherland dwarf rabbit. This rabbit was dewormed yearly with fenbendazole, (Panacur®, Merck Animal Health, Giralda Farms, Madison, WI, USA, 20 mg/kg) and twice a year with a 15 mg selamectin spot-on (Stronghold®, Zoetis, Belgium vaccinated yearly (Nobivac®Myxo-RHD, MSD, Kenilworth, NJ, USA), and was kept indoors with an owner residing in the Oeiras District, Portugal. At the age of 18 months, the patient was presented for annual vaccination. Physical examination at that point was unremarkable and the rabbit was clinically normal.

In February 2020, 2 months after the previous visit, the rabbit presented for anorexia, coprostasis and lethargy. The physical examination only revealed a painful condition as the rabbit exhibited bruxism (teeth grinding) after cranial abdominal palpation. The rest of the physical examination was unremarkable and the rabbit weighed 1580 g at the time. A complete blood count (CBC, detailed in Table 1) revealed leukopenia (2.53 K/µL) with heteropenia (0.71 K/µL) and thrombocytopenia (40 K/µL). Alanine aminotransferase (ALT) levels were elevated (240 U/L), indicating liver damage and radiographs showed a more radio-opaque cranial abdomen. The patient was admitted and started on standard intravenous fluid therapy with NaCl 0.9%, was administered buprenorphine (0.03 mg/kg IV TID) for analgesia and provided nutritional support (Oxbow's herbivore critical care), recovering appetite about 6 hours later.

Table 1. Summary of the rabbit haematological and biochemical parameters and respective reference values retrieved from Carpenter's 4th ed of the Exotic animal formulary [23] and Idexx's reference values of the ProCyte Dx* Haematology Analyzer (as of IDEXX VetLab* Station software version 4.48) and Catalyst one Biochemistry analyser, the equipment used in this study.

Haematology	February	March	June	Reference Values	
				Carpenter, 2018	Idexx Lab., 2017
Haematocrit (%)	30.9	36.3	37.6	30–50	29.4–40.9
Haemoglobin (g/dL)	10.7	11.8	13.3	8–17.5	9.8–13.2
Erythrocytes ($\times 10^6/\mu L$)	5.21	5.67	6.45	4–8	4.45–6.71
MCV (fL)	59.3	64.0	58.3	58–75	58.1–69.6
MCH (pg)	20.5	20.8	20.6	17.5–23.5	18.9–22.1
MCHC (g/dL)	34.6	32.5	35.4	29–37	31.6–33.6
Reticulocytes (%)	2.4	**5.4**	1.4	2–4	-
Reticulocytes (K/µL)	122.4	**306.7↑**	88.4	-	69.5–242.7
Platelets ($10^3/\mu L$)	**40↓**	370	**97↓**	290–650	219–521
WBC ($10^3/\mu L$)	**2.53↓**	5.15	**1.86↓**	5–12	4.54–10.22
Heterophils (%)	**28.1↓**	**28.8↓**	47.9	35–55	-
Lymphocytes (%)	**64.4↑**	60.0	41.9	25–60	-
Monocytes (%)	4.7	5.4	4.8	2–10	-
Eosinophils (%)	0.8	0.8	0.0	0–5	-
Basophils (%)	2.0	5.0	5.4	2–8	-
Heterophils (K/µL)	**0.71↓**	1.48	**0.89↓**	-	0.96–3.34
Lymphocytes (K/µL)	1.63	3.09	**0.78↓**	-	1.49–5.21
Monocytes (K/µL)	**0.12↓**	**0.28↓**	**0.09↓**	-	0.31–0.99
Eosinophils (K/µL)	**0.02↓**	**0.04↓**	**0.00↓**	-	0.05–2.12
Basophils (K/µL)	**0.05↓**	**0.26↓**	**0.10↓**	-	0.56–2.12
Biochemistry					
Glucose	**194↑**	-	**164↑**	75–150	75–145
Creatinine (CREA)	1.0	-	1.2	0.5–2.6	0.8–1.8
BUN	12	-	22	15–50	10–24
BUN/CREA	12	-	18	-	-
PHOS	-	-	3.7	2.3–6.9	1.2–4.9
CA	-	-	11.7	8–14.8	5.6–12.0
TP	6.6	-	**7.7↑**	5.4–7.5	5.5–7.2
ALB	4.4	-	4.4	2.5–5	2.7–4.6
GLOB	2.2	-	**3.3↑**	1.5–3.5	1.5–2.8
ALB/GLOB	2.0	-	1.3	-	-
ALT	**240↑**	-	**586↑**	14–80	31–53
ALKP	99	-	104	4–70	70–145
GGT	-	-	2	-	-
TBIL	-	-	0.9	0–0.75	0.3–0.8
CHOL	-	-	30	12–16	35–53

The values highlighted in bold represent the main deviations observed and the arrows indicate if the values are above (↑) or below (↓) the references.

Ultrasound revealed a slightly heterogeneous liver with a hypoechoic caudate lobe and a kidney stone considered meaningless for this case. There were no obvious signs of vascular compromise. However, shaving the abdomen for the ultrasound exam revealed a large haematoma that extended from the neck to forelimbs, thorax and upper-half of the abdomen. This was assumed to have originated from the jugular blood collection carried out in the previous day, despite the seemingly atraumatic puncture.

Throughout the 5th day of hospitalisation, the patient maintained a pattern of cutaneous haemorrhagic dyscrasia, with vascular fragility, easy bruising and requiring the need for prolonged compression of puncture sites. Coagulation tests were carried out and both prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were prolonged, at 25 and 195 s, respectively.

abdomen. This was assumed to have originated from the jugular blood collection carried out in the previous day, despite the seemingly atraumatic puncture.

Throughout the 5th day of hospitalisation, the patient maintained a pattern of cutaneous haemorrhagic dyscrasia, with vascular fragility, easy bruising and requiring the need for prolonged compression of puncture sites. Coagulation tests were carried out and both prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were prolonged, at 25 and 195 s, respectively.

A CT scan showed no signs of hepatic abnormalities or vascular compromise. The patient was started on injectable vitamin K1 (10 mg/kg SC SID) and kept on buprenorphine (0.03 mg/kg SC TID) and IV NaCl 0.9% at a rate of 5 mL/h. Bruising was fully reabsorbed by the 8th day and the patient was sent home. Before release, the physical exam was unremarkable. The rabbit was bright and alert and had fully recovered his appetite, weighing at the time 1500 g. No more blood collections were possible due to lack of venous accesses, secondary to multiple hematomas and bruising in the previous blood collection sites. Two weeks later, in March 2020, follow up blood tests were performed, including a CBC. The CBC and the evaluation hemogram were unremarkable, as reticulocytosis was considered a normal finding given the events in the previous hospitalisation. No other clinical follow up could be performed due to limitations and lockdown policies associated with the COVID-19 pandemic.

In June 2020, the rabbit was readmitted due to anorexia, lethargy, constipation and abdominal discomfort. The rabbit had lost 80 g, weighing 1420 g, for the first time mildly hyperthermic (39.4 °C) was registered. The blood panel revealed severe leukopenia (1.86 K/µL) associated with heterophilia (1.89 K/µL) and lymphopenia (0.78 K/µL). Thrombocytopenia (97 K/µL) was also observed. ALT was then 586 U/L and there was also the elevation of total bilirubin (0.9 mg/dL) and total proteins (7.7 g/dL) due to hyperglobulinemia (3.3 g/dL) (Table 1). The blood draw resulted once again in cutaneous haemorrhagic dyscrasia and therefore the rabbit was started on vitamin K1 (10 mg/kg SC BID), enrofloxacin (5 mg/kg SC SID), buprenorphine (0.03 mg/kg SC TID), metoclopramide (0.5 mg/kg SC BID), lactulose (0.5 mL/kg PO BID) and aggressive fluid therapy. Ultrasound was compatible with severe hepatitis and peri-lobular peritonitis (Figure 2), with mesenteric reactivity and free fluid in the abdomen. The rabbit was in the hospital for 3 days showing no signs of improvement. The temperature kept increasing reaching a peak of 40.2 °C on the second day of hospitalisation, after which it started dropping and the rabbit became progressively hypothermic. On the 3rd day of hospitalization, the temperature dropped to 36.9 °C, despite the active heating efforts. The rabbit became lethargic, jaundiced and developed vertical nystagmus. The death occurred about 6 h after the onset of these symptoms.



Figure 2. Ultrasound is compatible with hepatitis. The image on the left shows peri-lobular mesenteric reactivity (arrow). On the right, free fluid in the abdomen is visible (arrow).

Throughout the clinical evolution of this case, several differential diagnoses were considered. These included hepatic lipidosis, hepatic coccidiosis, liver lobe torsion, bacterial, fungal, and parasitic hepatitis, Encephalitozoon cuniculi infection, Tyzzer's disease and neoplasia. All these possibilities were excluded by the rabbit's clinical history, semestral coprology results and deworming history, along with the blood works, radiographs, ultrasounds, CT scan and post mortem data.

The necropsy findings reinforced that the inflammatory and/or infectious process was the most likely differential diagnosis for this patient.

3. Material and Methods

3.1. Necropsy and Histopathology

The necropsy was performed according to routine procedures, and samples were collected for bacteriology (liver, spleen and lung), histopathology (liver, spleen, stomach, small intestine, pancreas and kidney) and virology (liver). All analyses followed routine procedures.

Histopathology fragments were fixed in 10% neutral buffered formalin, routinely paraffin-embedded, sectioned at 4 µm, and stained with Haematoxylin and Eosin (H&E).

3.2. Molecular Analysis

For nucleic acid extraction, a fresh sample of liver was homogenized at 10% (*w*/*v*) with phosphate-buffered saline (PBS) and clarified at 3000 g for 5 min. Total nucleic acids were extracted from 200 µL of the clarified supernatants, using the MagAttract 96 cador Pathogen Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a BioSprint 96 nucleic acid extractor (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol.

The rabbit was tested for rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by conventional PCR [24] and rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) and myxomavirus (MYXV) by real-time PCR [25,26]. Amplifications were carried out in a Bio-Rad CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Srl, Redmond, WA, USA), using the One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) for RHDV2, and the NZYTaq II 2x Colourless Master Mix (Nzytech, Lisbon, Portugal) for MYXV.

cDNA was synthesised with the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations, using either oligo(dT)12-18 and random hexamers. Amplification of full VP60 gene and partial RdRp gene was achieved using primers, kits and protocols available in appendix Table S1.

The PCR products were visualised in 2% horizontal electrophoresis agarose gel, purified using the NZYGelpure kit (NZYTECH), and directly sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit on a 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analysed and assembled into consensus sequences using the Seqscape Software v2.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)., The final 2176 nucleotide sequence including the VP60 complete gene (1740 nt-long) and a 436 nt-long region of the RdRp gene, was deposited in GenBank database and given the accession number MT829254.

3.3. Phylogenetic Analysis

To further investigate the relation of this strain to other recombinants characterised previously in Portugal [8], a phylogenetic analysis was carried out by Maximum Likelihood (ML) resourcing to the R software (R Development Core Team, 2009) [27]. Three types of multiple sequence alignments (msa) were used for phylogenetic inference, encompassing a 436 nt region within the RdRp gene, the complete 1740 nt vp60 gene sequences, and the 2176 nt long sequence comprising the two regions mentioned.

Multiple sequence alignments (msa) were generated by MUSCLE through the R software (R Development Core Team, 2009). For each alignment, the appropriate substitution model for ML analysis was determined using the function modeltest. For RdRp tree, the Hasengawa–Kishino–Yano (HKY) model [28] an allowance for the incorporation of invariant sites (I) (HKY+I), showed the lower AIC value and was used to infer phylogenetic relationships. For the ML phylogenetic tree based on the full vp60 gene (1740 nt long) the General Time Reversible (GTR) model [29] with a discrete gamma distribution (+G), (GTR+G) showed the lower AIC value was used to infer phylogenetic relationships. For the ML phylogenetic tree based on a 2176 nt long sequence comprising the terminal 436 nt long region within the RdRp gene and the complete vp60 gene the General Time Reversible (GTR) model [29] with a discrete gamma distribution (+G) and/or an allowance for the incorporation of invariant sites (+I) (GTR+G+I) showed the lower AIC value and was used to infer phylogenetic relationships.

for the incorporation of invariant sites (+I) (GTR+G+I) showed the lower AIC value and was used to infer phylogenetic relationships.

4. Results

4.1. Necropsy and Histopathology

The necropsy revealed liver congestion and marked lobular pattern, presence of a small amount of free peritoneal fluid and congested lungs with haemorrhagic foci. Both kidneys showed areas of surface retraction accounting for about 20% of the total surface.

The following microscopic lesions were observed: **Liver**: severe generalized perilobular haemorrhagic necrosis (Figures 3 and 4). Discrete infiltration by mononucleated inflammatory cells, mainly macrophages and lymphocytes, around portal triads. Fine pigment in the cells of the portal bile ducts. **Spleen**: diffuse necrosis of the entire red pulp revealed by deposition of fibrinoid acidophilic material drawing serpiginous patterns in the parenchyma (Figure 5). The regular presence of lymphoid follicles around central arterioles. **Pancreas**: interlobular oedema and necrosis of adipocytes, both intra- and interlobular. No changes were present in the secretory cells. **Stomach**: no significant changes were observed. **Small intestine**: Necrotic enteritis, particularly in the duodenum, with loss of villi and deposition of fibrin in the proximal mucosa (Figure 6). **Kidneys**: the areas of surface retraction in both kidneys corresponded to segmental fibrosis affecting cortex and medulla. In these areas, there was a loss of tubules and glomeruli, which were moderately congested. No microbial agents were identified in any organ and the results of the microbiological analysis were also negative.

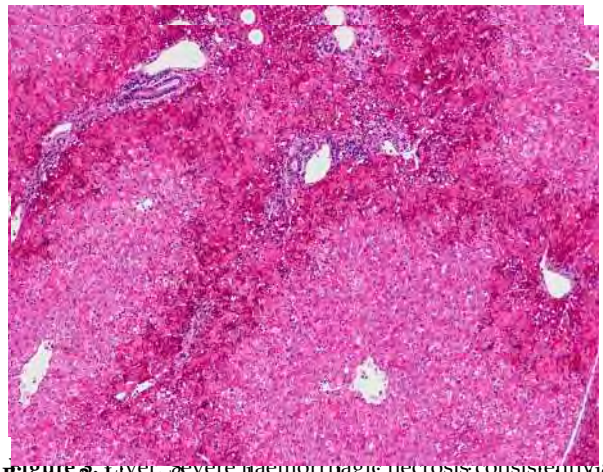


Figure 3. Liver. Severe haemorrhagic necrosis consistently affects perilobular areas or acinar zone 1, conspicuous due to the bright red colour close to the portal areas (H&E, 40×).

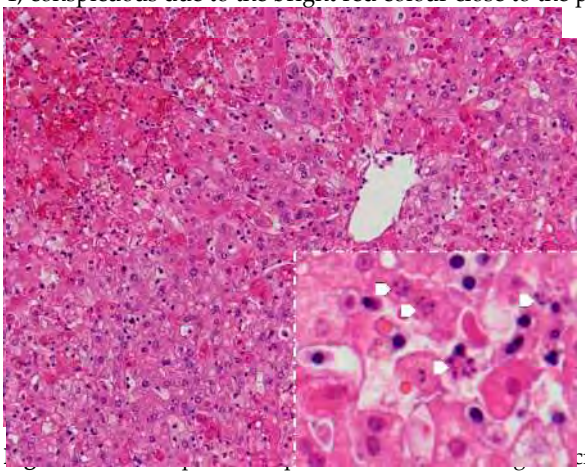


Figure 4. Liver. Apart from perilobular haemorrhagic necrosis, single-cell necrosis is present in dispersed hepatocytes in acinar zones 2 and 3, which surround the periacinar vein in the upper right. Inset-magnification of the acinar zones 2 and 3, showing various cells with the fragmentation of the nucleus-karyorrhexis (arrows) (H&E, 100×, inset 400×).

right. Inset-magnification of the acinar zones 2 and 3, showing various cells with the fragmentation of the nucleus-karyorrhexis (arrows) (H&E, 100×, inset 400×).

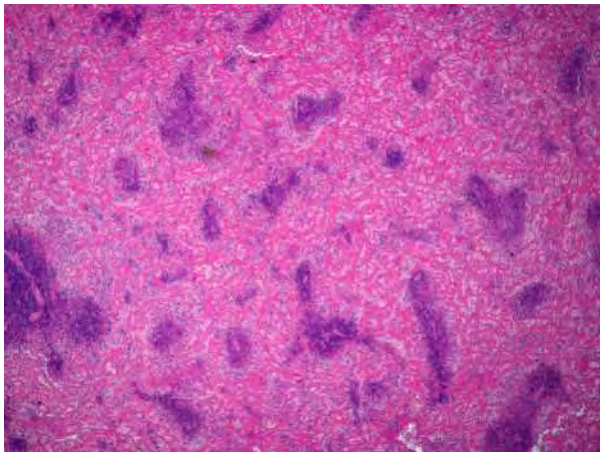


Figure 5. Spleen. Severe diffuse fibrinoid necrosis of the red pulp. The eosinophilic material fibrinoid material is very abundant between the lymphoid tissue that surrounds blood vessels (H&E, 40×).

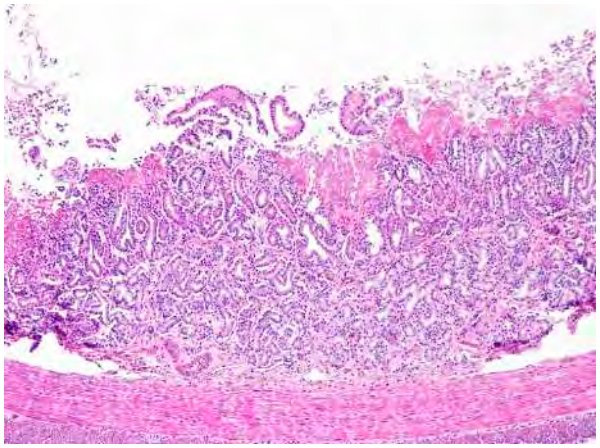


Figure 6. Duodenum. Necrotic enteritis affecting the upper mucosa. Note the absence of villi and the eosinophilic deposits of fibrin in the upper mucosa. The intestinal glands are disorganized and the inflammatory infiltrate of the mucosal lamina propria by mononuclear cells (lymphocytes mostly) is scant (H&E, 100×).

4.2. Virology

Investigations for MYXV and RHDV (genotypes GI.1b (former G1) to GI.1a (former RHDVa or G6)) [19] were negative. However, the RT-qPCR specific for RHDV2 revealed a high viral load in the liver (approximately 9.0×10^{11} copies of RHDV2 RNA per mg of liver), higher than the usual viral load found in infected rabbit liver, including both vaccinated and unvaccinated rabbits [30]. The amplification of the RdRp partial gene and VP60 complete gene was successful, generating amplicons within the expected sizes (available in access number MT829254).

4.3. Phylogenetic Analysis

BLAST analysis of VP60 nucleotide sequence showed 96.88% similarity with RHDV2 sequences characterised earlier in 2013 from mainland Portugal, namely with three strains (KF44962, KF44963 and KF44964) collected from wild rabbits originating from the south region, Alentejo and Algarve. BLAST analysis of the partial RdRp gene showed 96.56% similarity with a recombinant RHDV2/NP1 strain (MG763952) collected from a wild rabbit from the north of mainland Portugal in 2015.

BLAST analysis of the 2176 nt long sequence revealed higher similarity with sequence KF442964, obtained from a wild rabbit from South of mainland Portugal sampled in 2013.

BLAST analysis of the 2176 nt long sequence revealed higher similarity with sequence KF442964, obtained from a wild rabbit from South of mainland Portugal sampled in 2013.

The tree based on the 3′ end sequence of RdRp gene (fragment 436 bp), confirmed that the RHDV2 strain from the dwarf rabbit shared high similarity with the homologous region of the RdRp from other RHDV2 recombinants classified as GI.4 (NP1)/RHDV2 (Figure 7A). The VP60 gene base tree and phylogenetic analysis including the complete fragment showed that the dwarf sequence RHDV2/is isolated branch and does not group within the defined clusters (Figure 7B and Figure 7C).

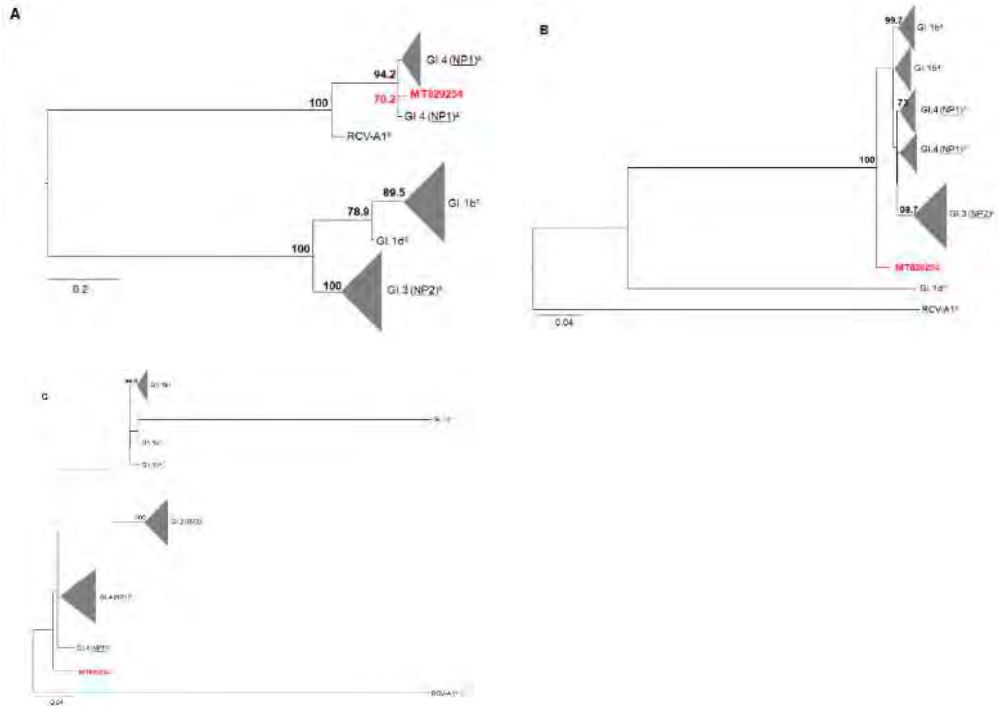


Figure 7. Phylogenetic analysis. (**A**) Maximum likelihood analysis using 14 RdRp gene partial (436 nt) nucleotide sequences, namely GI.4 (NP1–non-pathogenic caliciviruses similar to RCV-A1 are the most likely donors of non-structural proteins) representatives (a-MG763940, MG763941, MG763954 and a′-MG763952), GI.1b (G1) representatives (c-MG763939, MG763938, MG763947 and MG763953), GI.3 (NP2-non-pathogenic caliciviruses similar to GBAnd1 are the most likely donors of non-structural proteins) representatives (e-MG763942, MG763949, MG763943 and MG763945; GI.1d (G3-G5) representatives (d-MH190418) and non-pathogenic rabbit calicivirus Australia 1 (RCV-A1) representatives (b-EU871528). (**B**) Maximum likelihood analysis using 14 complete VP60 gene nucleotide sequences including, GI.1b representatives (a-MG763939 and MG763938 and a′-MG763953 and MG763947), GI.4 (NP1) representatives (b-MG763952 and MG763954 and b′-MG763946 and MG763944), GI.3 (NP2) representatives (c-MG763949, MG763942, MG763945 and MG763943; GI.1d representatives (d-MH190418) and RCVA-A1 representatives (e-EU871528). (**C**) Maximum likelihood analysis using 14 sequences comprising the terminus of the RdRp gene and the complete VP60 gene, namely GI.1b representatives (a-MG763939 and MG763938 and a′-MG763953 and MG763947), GI.1 (NP1) representatives (b-MG763952 and MG763954 and b′-MG763946 and MG763944), GI.3 (NP2) representatives (c-MG763949, MG763942, MG763945 and MG763943), GI.4 (NP1) representatives (d-MG763954, MG763946, MG763944 and d′-MG763952) GI.1d representatives (b-MH190418) and RCVA1 representatives (e-EU871528). The nomenclature used is in accordance with Silvério et al., 2018 [8], Abrantes et al., 2020 [31]. Designations only used by Silvério et al., 2018 are underlined in the phylogenetic trees.

Robustness of the tree nodes was assessed by bootstrapping 1000 times. Only bootstrap (BS) values greater or equal to 70 are shown. The graphical representation and edition of the phylogenetic trees were performed with FigTree v1.3.1 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

5. Discussion

Rabbit haemorrhagic disease affects both domestic and wild rabbits causing a systemic disease usually with a lethal outcome. After its emergence, RHDV2 evolved quickly, with some variation of amino acids in the capsid protein but maintaining the original

RHDV2 antigenic profile. Despite this, several RHDV2 recombinants containing the non-structural protein genes of other rabbit lagoviruses (such as GI.1b (G1) and GI.4 or GI.3 (NP-CV)) have been identified in Europe [8]. These include the structural protein (VP60 and VP10) encoding genes of RHDV2 combined with the non-structural protein-encoding genes of GI.1b (RHDV genogroup G1 strain), non-pathogenic rabbit caliciviruses Australia 1 (RCV-A1)-like viruses (GI.4) or other non-pathogenic lagoviruses (GI.3) [8,32,33].

Here we describe an RHDV2 infection in a 2-year-old dwarf rabbit that could have developed an atypical form of RHD before the eventual fatality, four months after the presentation of first signs compatible with the disease. The conclusive diagnosis of RHDV2 was only made post-mortem, making it impossible to claim that the clinical picture observed between February and June was due to RHDV2 infection. However, the clinical signs and the results of the diagnostic investigations (ultrasound hepatic and peri-hepatic changes, an elevated marker of liver injury-ALT, raised total bilirubin and jaundice, hyperglobulinemia and poor coagulation (namely severe subcutaneous haemorrhage and increased prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT)) are all compatible with Rabbit Haemorrhagic Disease. Moreover, no other possible cause for the clinical signs was found. Most of the previous clinical signs, along with a normal hemogram, a leukogram revealing leukopenia and thrombocytopenia have been previously associated with rabbit haemorrhagic disease in a review by Bonvehí et al., 2019 [34].

The atypical development of the clinical course, much longer than the usual, could have resulted from deficient cross-immunity conferred by RHDV vaccination, leading to a subacute disease.

Despite RHDV vaccines do not confer full protection against RHDV2, rabbits vaccinated with RDHV cannot be assumed as immunologically naive against RHDV2 as non-vaccinated animals. The cross-immunity between RHDV and RHDV2 is reported as deficient but not as inexistent [9]. Therefore, it is expected that RHDV-vaccinated animals do not show a primary immune response to RHDV2 infection, since cross-reactive responses (RHDV-RHDV2) to particular epitopes may be beneficial to the protective response, even if deficient.

In fact, the studies on RHDV/RHDV2 cross-immunity are limited to a few strains that emerged soon after 2010. For this reason, the current circulating RHDV2 strains may have different pathogenic characteristics that may explain an unusual presentation in RHDV vaccinated in rabbits. The vaccine used contains a recombinant myxoma virus that expresses the VP60 protein of RHDV, thus can never be responsible for inducing RHD in rabbits. Also, the strain isolated in this animal (RHDV2) is completely different from the one contained in the vaccine (RHDV).

The origin of this infection is unknown. However, in Oeiras district, there are a few populations of wild rabbit that may have been a source of infection for this animal through arthropod vectors. Infection in a hospital context is not probable, considering that there was no case of RHD in that hospital in the last year and that strict disinfection guidelines for spaces and equipment are followed.

The virus identified in this rabbit was confirmed to be a recombinant strain, with the structural backbone of RHDV2 and the non-structural genes of non-pathogenic RCV-A1 strains (GI.4). The clinical course was suggestive, but non-pathognomonic, of rabbit haemorrhagic disease. Post-mortem lesions identified in the liver, spleen and intestine are compatible with an acute clinical course of the disease with fatal outcome. Kidney lesions, on the contrary, are typical of a chronic process, but their severity was not enough to consider renal insufficiency as the cause for the clinical signs.

No studies are evaluating a longer clinical course of the disease caused by RHDV2 recombinant strains such as the one detected in this rabbit. Further studies are necessary to better understand the possibility of different genotypes generating different clinical courses of disease. This case is an important warning to all veterinarians drawing attention to the fact that RHD is an important differential diagnosis to be considered in some clinical

settings, and that it is critical to revise and update the vaccination programs towards RHDV2 infection.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/2076-2615/11/1/40/s1, Table S1: Oligonucleotides and protocols used in this study for amplification and sequencing.

Author Contributions: Conceptualization, F.A.A.d.S. and M.C.P.; methodology, F.A.A.d.S., C.M., C.L.C., M.D.D. and M.C.P.; validation, F.A.A.d.S., M.D.D. and M.C.P.; investigation, F.A.A.d.S., C.M., C.L.C. and M.C.P.; resources, M.D.D. and M.C.P.; data curation, F.A.A.d.S. and C.L.C.; writing—original draft preparation, F.A.A.d.S., C.M., C.L.C., M.D.D. and M.C.P.; writing—review and editing, P.R., M.D.D. and M.C.P.; supervision, M.D.D. and M.C.P.; funding acquisition, M.D.D. and M.C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Most of the field and laboratory work referred to in this manuscript was supported by the FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia IP, Grant SFRH/BD/137067/2018, Grant UIDB/00276/2020. (and Project Fight-two: PTDC/CVT-CVT/29062/2017-PT2020), by Fundo Florestal Permanente (Government of Portugal) in the scope of the Action Plan for the Control of Rabbit Viral Haemorrhagic Disease (+COELHO, Dispatch no. 4757/2017 of 31 May, ref no. 2017014300001) andby Interdisciplinary Research Centre on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (CIISA, FMV-UL) (Portugal). Funding bodies played no direct role in the design or conclusion of the study.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article [and/or] its supplementary materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Le Pendu, J.; Abrantes, J.; Bertagnoli, S.; Guitton, J.-S.; Le Gall-Reculé, G.; Lopes, A.M.; Marchandeau, S.; Alda, F.; Almeida, T.; Célio, A.P.; et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 1658–1666. [CrossRef] [PubMed]
2. Lees, A.C.; Bell, D.J. A conservation paradox for the 21st century: The European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mamm. Rev.* **2008**, *38*, 304–320. [CrossRef]
3. Neimanis, A.; Larsson Pettersson, U.; Huang, N.; Gavier-Widén, D.; Strive, T. Elucidation of the pathology and tissue distribution of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Res.* **2018**, *49*, 46. [CrossRef] [PubMed]
4. OIE, 2019: Rabbit Haemorrhagic Disease (Technical Disease Card). 1–7. Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RHD.pdf (accessed on 3 October 2020).
5. Ramiro-Ibáñez, F.; Martín-Alonso, J.M.; García Palencia, P.; Parra, F.; Alonso, C. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res.* **1999**, *60*, 21–28.
6. Villafuerte, R.; Calvete, C.; Blanco, J.C.; Lucientes, J. Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia* **1995**, 651–660. [CrossRef]
7. Le Gall-Recule, G.; Zwingelstein, F.; Boucher, S.; Le Normand, B.; Plassiart, G.; Portejoie, Y.; Decors, A.; Bertagnoli, S.; Guerin, J.-L.; Marchandeau, S. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* **2011**, *168*, 137–138. [CrossRef]
8. Silvério, D.; Lopes, A.M.; Melo-ferreira, J.; Magalhaes, M.J.; Ponterroso, P.; Serronha, A.; Maio, E.; Alves, P.C.; Esteves, P.J.; Abrantes, J. Insights into the evolution of the new variant rabbit haemorrhagic disease virus (GI. 2) and the identification of novel recombinant strains. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 983–992. [CrossRef]
9. Le Gall-Reculé, G.; Lavazza, A.; Marchandeau, S.; Bertagnoli, S.; Zwingelstein, F.; Cavadini, P.; Martinelli, N.; Lombardi, G.; Guérin, J.L.; Lemaitre, E.; et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 81. [CrossRef]
10. Harcourt-Brown, N.; Silkstone, M.; Whitbread, T.J.; Harcourt-Brown, F.M. RHDV2 epidemic in UK pet rabbits. Part 1: Clinical features, gross post mortem and histopathological findings. *J. Small Anim. Pract.* **2020**, *61*, 419–427. [CrossRef]
11. Abade dos Santos, F.A.; Carvalho, C.; Nuno, O.; Correia, J.J.; Henriques, M.; Peleteiro, M.C.; Fevereiro, M.; Duarte, M.D. Detection of rabbit Haemorrhagic disease virus 2 during the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) eradication from the Berlengas archipelago, Portugal. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 336. [CrossRef]
12. Abade dos Santos, F.A. *Quadro Anatomo-Histopatológico e Diagnóstico Molecular da Doença Hemorrágica Viral em Coelho-Bravo*; Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon: Lisbon, Portugal, 2018.
13. Barthold, W.S.; Griffey, S.M.; Percy, D.; Rabbit, H. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2016; ISBN 9781118824245.

14. Trzeciak-Ryczek, A.; Tokarz-Deptuła, B.; Deptuła, W. The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD. *Acta Biochim. Pol.* **2015**, *62*, 169–171. [CrossRef] [PubMed]
15. Plassiart, G.; Guelfi, J.-F.; Ganiere, J.-P.; Wang, B.; Andre-Fontaine, G.; Wyers, M. Hematological Parameters and Visceral Lesions Relationships in Rabbit Viral Hemorrhagic Disease. *J. Vet. Med. Ser. B* **1992**, *39*, 443–453. [CrossRef] [PubMed]
16. Park, J.H.; Lee, Y.S.; Itakura, C. Fibrin(ogen)-related antigens in rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res. Vet. Sci.* **1997**, *63*, 123–127. [CrossRef]
17. Ueda, K.; Park, J.H.; Ochiai, K.; Itakura, C. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn. J. Vet. Res.* **1992**, *40*, 133–141. [PubMed]
18. Rocchi, M.S.; Dagleish, M.P. Diagnosis and prevention of rabbit viral haemorrhagic disease 2. *In Pract.* **2018**, *40*, 11–16. [CrossRef]
19. Soliman, M.; Rhaman, M.; Samy, M.; Mehana, O.; Nasef, S. Molecular, Clinical and Pathological Studies on Viral Rabbit Hemorrhagic Disease. *Alex. J. Vet. Sci.* **2016**, *48*, 20. [CrossRef]
20. Duarte, M.D.; Carvalho, C.L.; Abade dos Santos, F.A.; Gomes, J.; Alves, P.C.; Esteves, P.J.; Abrantes, J.; Lopes, A.M.; Lopes, P.M.; Serronha, A.; et al. +Coelho: Avaliação Ecossanitária das Populações Naturais de Coelho Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral. Master's Thesis, University of Lisbon, Lisboa, Portugal, 2018.
21. Montbrau, C.; Padrell, M.; Ruiz, M.C. Efficacy and Safety of a New Inactivated Vaccine against the Rabbit Haemorrhagic Disease Virus 2-Like Variant (RHDV-2). 2012, Volume 1984. Available online: https://www.hipra.com/wcm/connect/hipra/d0be8fc3-788a-4910-a47e-64709166ad1c/Efficacy+and+safety+of+a+new+inactivated+vaccine+against+RHDV-2.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18_GG50HI40O8ABD0Q8OC940F2000-d0be8fc3-788a-4910-a47e-64709166ad1c-lAmNnR1 (accessed on 25 September 2020).
22. Office International des Epizooties. OIE Rabbit Haemorrhagic Disease. In *OIE Terrestrial Manual 2018*; Office International des Epizooties: Paris, France, 2018; pp. 1389–1406. Available online: www.oie.int (accessed on 15 September 2020).
23. Fisher, P.; Graham, J. Chapter 10—Rabbits. In *Exotic Animal Formulary*, 5th ed.; Carpenter, J.W., Marion, C.J., Eds.; Elsevier Saunders: St. Louis, MI, USA, 2018; pp. 494–531. ISBN 978-0-323-44450-7.
24. Tham, K.M.; Barnes, S.M.; Hunter, S.N. Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. *Virus Genes* **1999**, *18*, 235–242. [CrossRef]
25. Duarte, M.D.; Carvalho, C.L.; Barros, S.C.; Henriques, A.M.; Ramos, F.; Fagulha, T.; Luís, T.; Duarte, E.L.; Fevereiro, M. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods* **2015**, *219*, 90–95. [CrossRef]
26. Duarte, M.D.; Barros, S.C.; Henriques, A.M.; Fagulha, M.T.; Ramos, F.; Luís, T.; Fevereiro, M. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000. 5L/R. *J. Virol. Methods* **2014**, *196*, 219–224. [CrossRef]
27. R Development Core Team R. *A Language and Environment for Statistical Computing*; R Found. Stat. Comput.: Vienna, Austria, 2008; ISBN 3-900051-07-0.
28. Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **1985**, *22*, 160–174. [CrossRef]
29. Tavaré, S.; Miura, R.M. Lectures on mathematics in the life sciences. *Am. Math. Soc.* **1986**, 57–86.
30. Carvalho, C.L.; Duarte, E.L.; Monteiro, M.; Botelho, A.; Albuquerque, T.; Fevereiro, M.; Henriques, A.M.; Barros, S.S.; Duarte, M.D. Challenges in the rabbit haemorrhagic disease 2 (RHDV2) molecular diagnosis of vaccinated rabbits. *Vet. Microbiol.* **2017**, *198*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]
31. Abrantes, J.; Droillard, C.; Lopes, A.M.; Lemaitre, E.; Lucas, P.; Blanchard, Y.; Marchandeau, S.; Esteves, P.J.; Le Gall-Reculé, G. Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus Lagovirus europaeus/GI.2. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
32. Lopes, A.M.; Blanco-Aguiar, J.; Martín-Alonso, A.; Leitão, M.; Foronda, P.; Mendes, M.; Gonçalves, D.; Abrantes, J.; Esteves, P.J. Full genome sequences are key to disclose RHDV2 emergence in the Macaronesian islands. *Virus Genes* **2018**, *54*, 1–4. [CrossRef]
33. Dalton, K.P.; Arnal, J.L.; Benito, A.A.; Chacón, G.; Martín Alonso, J.M.; Parra, F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J. Virol. Methods* **2018**, *251*, 118–122. [CrossRef]
34. Bonvehí, C.; Ardiaca, M.; Montesinos, A.; Juan, C.; Gómez, A.; Teso, B.; Barbero, S.; Ekei, S. Clinicopathologic findings of naturally occurring Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 infection in pet rabbits. *Vet. Clin. Pathol.* **2019**, *48*, 89–95. [CrossRef]