

E Vigilância serológica

Uma abordagem na estratégia de recuperação das populações naturais de coelho-bravo

Autores:

Ana M. Lopes

É doutorada em Biodiversidade, Genética e Evolução pela Universidade do Porto e pela Universidade de Lisboa. Desde 2016 é investigadora pós-doutorada do CIBIO/InBIO-UP. A sua investigação tem-se centrado no estudo da evolução da nova variante do vírus da doença hemorrágica do coelho, focando especialmente os aspetos da ligação do vírus ao hospedeiro e os mecanismos virais associados à sua evolução.

Fabiana Neves

É doutorada em Patologia e Genética Molecular pelo Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Nos últimos anos a sua investigação teve foco na caracterização do sistema imunitário dos lagomorfos.

Fábio A. Abade dos Santos

Possui Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pela FMV-UL tendo apresentado a dissertação de mestrado na temática da anatomo-histopatologia e virologia da DHV do coelho-bravo. Exerce atualmente clínica e cirurgia de pequenos animais e exóticos e está a iniciar o doutoramento em ciências veterinárias. Tem formação avançada em cultura industrial, gestão sanitária e controlo veterinário de caça menor e em produção e gestão sustentável de coelho-bravo.

Carina L. Carvalho

É licenciada em Medicina Veterinária pela Universidade de Évora. Exerceu medicina e cirurgia de animais de companhia e espécies exóticas entre 2004 e 2011. É doutorada em Ciências Veterinárias desde 2017 pelo mesmo instituto de ensino superior, tendo abordado o tema "Os leporídeos silvestres como reservatório de agentes infecciosos".

Mónica V. Cunha

É doutorada em Biotecnologia pelo Instituto Superior Técnico, tendo-se especializado em Microbiologia Molecular e Genética Microbiana. É investigadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP e professora convidada da Faculdade de Ciências da Universidade de

Lisboa, desenvolvendo investigação em biologia da infeção e saúde animal.

Margarida D. Duarte

É licenciada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, mestre em Biotecnologia, especialidade Biologia Molecular, pelo Instituto Gulbenkian de Ciência, Universidade Nova de Lisboa (UNL) e doutorada em Biologia pelo Instituto de Tecnologia e Química Biológica, UNL. É investigadora auxiliar no Laboratório de Virologia da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal do INIAV sendo responsável pelo diagnóstico das viroses dos leporídeos, felídeos e canídeos. Investigadora do CIISA da FMV. Principais interesses incluem o vírus da Peste Suína Africana e o vírus da Doença Hemorrágica Viral dos Coelhos.

Pedro J. Esteves

É doutorado em Biologia pela Universidade do Porto, tendo-se especializado em Imunogenética, Virologia e Evolução. É investigador Principal do CIBIO/InBIO-UP e professor convidado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Desde 2006 é líder no CIBIO-UP do grupo de investigação Imunidade e Doenças Emergentes.

Joana Abrantes

É doutorada em Biologia pela Universidade do Porto na área da co-evolução parasita-hospedeiro tendo por modelo o coelho-bravo e doenças de etiologia viral. É investigadora Auxiliar no CIBIO/InBIO-UP no grupo de Imunidade e Doenças Emergentes onde desenvolve investigação na área da Evolução e Virologia. O vírus da doença hemorrágica viral é seu principal foco de interesse.

O coelho-bravo e a doença hemorrágica viral do coelho

O coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) é uma espécie-chave dos ecossistemas mediterrânicos, sendo presa preferencial e, em alguns casos, quase exclusiva de espécies emblemáticas da Península Ibérica, como por exemplo o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*). É também difícil ignorar a sua importância no panorama socioeconómico português, já que o coelho-bravo constitui uma das principais espécies cinegéticas no quadro venatório nacional.

No passado, as populações naturais de coelho-bravo da Península Ibérica foram extremamente abundantes. No entanto, estas populações foram diminuindo paulatinamente, acumulando declínios na ordem dos 80%, em resultado da pressão de predação, degradação e fragmentação do habitat e surtos de etiologia viral, entre outros fatores. De facto, desde os anos 1980, esta espécie tem sido afetada pela doença hemorrágica viral do coelho (DHV), com epizootias sazonais associadas a elevadas taxas de mortalidade [1]. Em 2010, o aparecimento de um novo genótipo (designado inicialmente

RHDV2 ou RHDVb, mas presentemente denominado GI.2), perturbou a ainda frágil recuperação das populações a que se vinha a assistir até então [2,3].

Aparentemente, o GI.2 substituiu o genótipo clássico anteriormente em circulação [4], já que os casos de DHV descritos desde 2012 correspondem ao novo genótipo. O GI.2 causa elevada mortalidade nos coelhos juvenis, contrariamente ao que acontecia com o genótipo clássico, limitando ainda mais o crescimento das populações. Curiosamente, o GI.2 é também capaz de causar mortalidade em várias espécies de lebre que ocorrem na Europa; no entanto até agora não foi descrito qualquer caso de morte por infeção com GI.2 da espécie de lebre presente em Portugal, a lebre-ibérica (*Lepus granatensis*).

O projeto +Coelho

O aparecimento e impacto do GI.2 tornou premente implementar estratégias para a recuperação das populações naturais de coelho-bravo, nomeadamente o ajuste da pressão cinegética e da translocação de animais. Sem uma avaliação sanitária prévia, estas estratégias podem tornar-se ineficazes e colocar em risco as populações de coelho-bravo. Neste sentido, surgiu a necessidade de pôr em prática um projeto de âmbito nacional, multidisciplinar, a fim de mitigar o impacto do GI.2.

O projeto +Coelho pretende identificar e implementar as medidas profiláticas e sanitárias mais adequadas e promover boas práticas de gestão, tendo como objetivos finais inverter o processo de declínio continuado das populações de coelho-bravo, e repor o equilíbrio ecológico desejável. Os objetivos principais deste projeto são: (i) controlar a mortalidade associada à DHV, (ii) fomentar populações viáveis de coelho-bravo do ponto de vista sanitário e genético, (iii) contribuir para o incremento das populações de coelho-bravo através de práticas de gestão adequadas e integradas, e (iv) aumentar a consciência social sobre a importância das boas práticas de gestão dos territórios. Este projeto, financiado pelo Fundo Florestal Permanente, teve início em agosto de 2017 e tem, numa primeira fase, a duração de um ano. No entanto preveem-se também ações de médio e longo prazo. A parceria de nove instituições, que vão desde o setor da caça, à administração pública e ao setor académico, agiliza a articulação entre estruturas públicas e privadas num esforço concertado de recuperação das populações de coelho-bravo. O projeto +Coelho é coordenado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV IP), com a participação da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), o Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), o Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO/InBIO-UP), o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), a Ordem dos Médicos Veterinários, a Federação Portuguesa de Caça (Fençaça), a Confederação Nacional dos Caçadores Portugueses (CNCP), e



Figura 1. Recolha de amostras de sangue de coelhos capturados vivos. Os animais são capturados com recurso a um furão colocado à entrada da toca (a). A captura é feita com recurso a redes (b) aquando da fuga dos coelhos para o exterior (c). O sangue é colhido da veia jugular externa (d).

a Associação Nacional de Proprietários Rurais (ANPC).

Avaliação das populações através de métodos serológicos

Um dos objetivos específicos do projeto +Coelho é selecionar animais naturalmente resistentes à DHV, isto é, animais que contactaram com o vírus e sobreviveram por terem desenvolvido uma resposta imunitária adequada. A análise serológica permite determinar se um animal esteve em contacto com o vírus e adquiriu resistência. A médio/longo prazo, esta vigilância das populações permitirá identificar, através de estudos genómicos, marcadores genéticos de resistência à infeção por GI.2. O CIBIO é responsável pela execução deste objetivo do projeto, com o auxílio do ICNF, ANPC, Fençaça e CNCP na obtenção de amostras.

A recolha de amostras tirou partido da época venatória de 2017-2018, durante a qual se obteve sangue por colheita intra-cardíaca ou, em alternativa, da hemorragia presente na cavidade abdominal, de animais caçados no ato cinegético. No entanto, fora da época venatória, ou em áreas onde a densidade populacional é baixa, é possível recolher sangue de animais capturados vivos, permitindo assim fazer 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 (Figura 1). Para facilitar a recolha de sangue do animal, este é sedado por via intramuscular, sem necessidade de anestesia. O sangue é colhido da veia jugular externa com uma seringa de 1 mL e transferido para um tubo e posteriormente separado o soro sanguíneo por centrifugação. Posteriormente, os animais são mantidos em vigilância clínica durante, aproximadamente, uma hora, sendo 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 [5]. Resumidamente, partículas virais desprovidas de material genético (*virus-like particles*, VLPs) do vírus da doença hemorrágica viral que foram sintetizadas em laboratório são ligadas covalentemente aos poços de uma placa de ELISA. Em seguida coloca-se o soro sanguíneo de leporídeos (coelho-bravo e lebre) e, caso estejam presentes anticorpos específicos para os antígenos da VLP, haverá ligação. 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 o título de anticorpos presentes no soro.

A densidade ótica é depois medida a um comprimento de onda de 450 nm. Entre estes passos são efetuadas lavagens para remoção de anticorpo não ligado, pelo que apenas se produz cor quando estão presentes anticorpos específicos no soro. 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 [6]. Para este trabalho, foram recolhidas e analisadas 689 amostras de coelho-bravo e 79 amostras de lebre-ibérica, num total de 768 amostras. As amostras recolhidas abrangem todo o território do continente português (Figuras 2a e 3a).

Resultados da vigilância serológica

Das 768 amostras analisadas, 220 amostras de coelho-bravo revelaram-se positivas para a presença de anticorpos, correspondendo a 32% do total de amostras de coelho-bravo analisadas. Na Figura 2b 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 estão mais expostas ao vírus, uma vez que houve uma maior percentagem de animais a desenvolver uma resposta imunitária. Apesar da menor

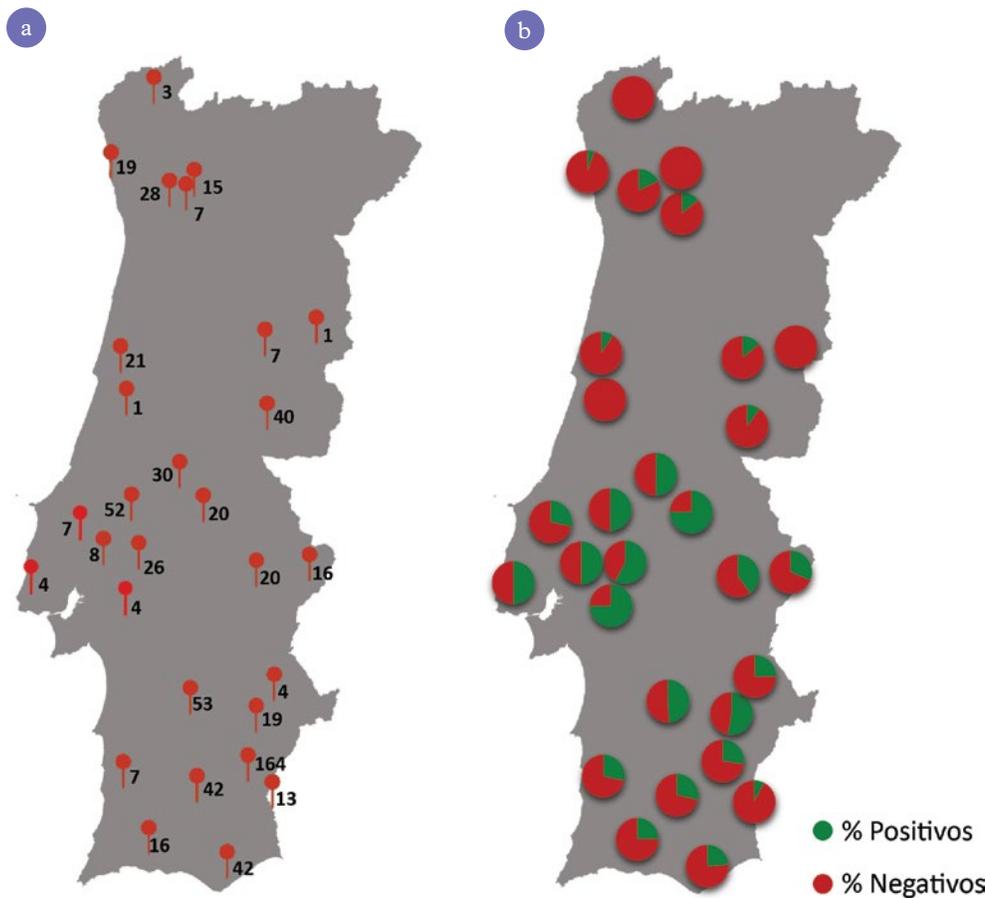


Figura 2. Mapa de Portugal continental com (a) número de soros de coelho-bravo analisados por localidade amostrada, (b) percentagem de soros positivos/negativos por localidade

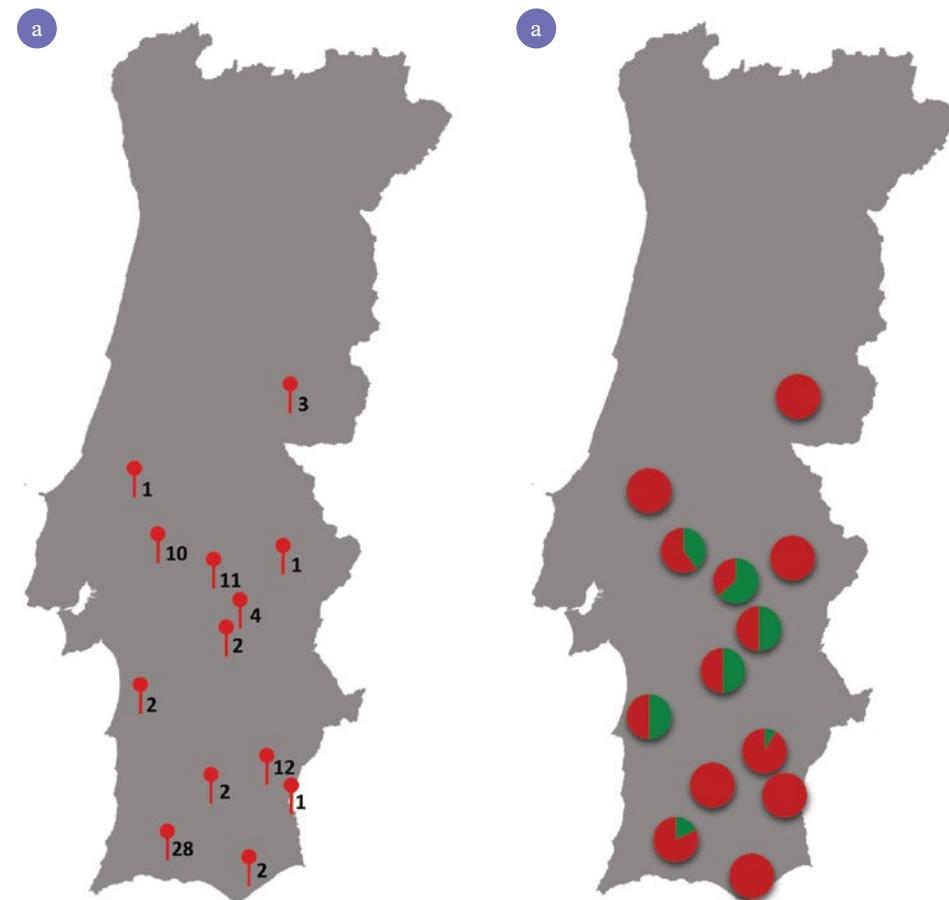


Figura 3. Mapa de Portugal continental com (a) número de soros de lebre-ibérica analisados por localidade amostrada, (b) percentagem de soros positivos/negativos por localidade.

"O projeto +Coelho pretende identificar e implementar as medidas profiláticas e sanitárias mais adequadas e promover boas práticas de gestão, tendo como objetivos finais inverter o processo de declínio continuado das populações de coelho-bravo, e repor o equilíbrio ecológico desejável".

amostragem, nas populações da região Norte, esse valor não ultrapassa os 18% da população (Penafiel).

Relativamente à lebre-ibérica, 21 amostras são positivas, correspondendo a 27% do total de lebres analisadas. A Figura 3b mostra o padrão de seropositividade da lebre-ibérica por local de amostragem, na qual se regista um padrão semelhante ao da Figura 2b, com a região do Alentejo a mostrar maior número de animais positivos, apesar da baixa amostragem comparativamente ao coelho-bravo. Estes resultados são bastante interessantes, uma vez que indicam que, apesar de nunca ter sido detetado o GI.2 na lebre-ibérica (todas as amostras foram negativas à presença do material genético de GI.2), o vírus infeta esta espécie e induz uma resposta do sistema imunitário, não causando, no entanto, mortalidade.

Conclusões

Os resultados decorrentes deste estudo sugerem que nenhuma das populações analisadas se encontra, neste momento, protegida do ponto de vista imunitário. Para que se considere uma população

como protegida contra um agente infeccioso (imunidade de grupo) é necessária uma positividade serológica de, pelo menos, 85% dessa população. Este nível de percentagem de proteção diminui ou elimina a capacidade do vírus se transmitir sistematicamente entre indivíduos, levando ao seu desaparecimento da população. A seroconversão registada nos indivíduos amostrados sugere a infeção por GI.2.

A análise serológica deve ser uma medida de continuidade, isto é, estas populações devem continuar a ser monitorizadas ao longo do tempo para compreender a evolução do grau de proteção das mesmas. Após esta análise será importante sequenciar e comparar o genoma de coelhos infetados que morreram e de coelhos que estiveram em contacto com o vírus e sobreviveram, produzindo anticorpos específicos anti-GI.2. Esta informação permitirá determinar marcadores genéticos de resistência contra este vírus patogénico, o que constituirá uma ferramenta importante no controlo da infeção por GI.2, e consequentemente, na recuperação desta espécie autóctone crucial para as cadeias tróficas da Península Ibérica.

Referências

1. Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ: *Vet. Res.* 2012, 43.
2. Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, *et al.*: *Vet. Rec.* 2011, 168:137-138.
3. Monterroso P, Garrote G, Serronha A, Santos E, Delibes-Mateos M, *et al.*: *Sci. Rep.* 2016, 6:36072.
4. Lopes AM, Correia J, Abrantes J, Melo P, Ramada M, *et al.*: *Viruses* 2015, 7:27-36.
5. Bárcena J, Guerra B, Angulo I, González J, Valcárcel F, *et al.*: *Vet. Res.* 2015, 46:106.
6. Rouco C, Abrantes J, Serronha A, Lopes AM, Maio E, *et al.*: *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, 65:e373-e382.